



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**JUCIENE DE MATOS BRAZ**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR  
A ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania sp.* EM  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

**ARACAJU,  
2015**

**JUCIENE DE MATOS BRAZ**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA  
CELULAR A ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE  
*Leishmania sp.* EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE  
VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Drº. Roque Pacheco de Almeida

**ARACAJU,**

**2015**

**JUCIENE DE MATOS BRAZ**

**AVALIAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA CELULAR  
A ANTÍGENOS RECOMBINANTES DE *Leishmania sp.* EM  
PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
**Orientador: Prof. Drº. Roque Pacheco de Almeida**

\_\_\_\_\_  
**1º Examinador: Prof. Drª. Cristiane Bani Corrêa**

\_\_\_\_\_  
**2º Examinador: Prof. Drª. Patricia Rodrigues Marques de Souza**

**PARECER**

-----  
-----  
-----  
-----  
-----

# DEDICATÓRIA

À Deus: “...porque dEle é a sabedoria e a força; Ele muda os tempos e as horas; Ele dá sabedoria aos sábios e ciência aos entendidos. Ele revela o profundo e o escondido...” (Dn. 2. 20-22)

# EPÍGRAFE

“Saber não é suficiente, é preciso aplicar. Boa vontade não é suficiente, é preciso fazer.”  
(Johann Goethe)

## AGRADECIMENTOS

À minha mãe Maria de Lourdes Gomes Santos e ao meu pai José Erivaldo Braz dos Santos pessoas simples, mas cuja sabedoria adquirida por observarem os justos preceitos do nosso Deus determinou as etapas da minha vida com orientações corretas e precisas. São meus heróis que me apoiam e incentivam nas horas difíceis e alegres. AMO VOCÊS!

Obrigada meus queridos irmãos-amigos Tercio Braz, Gidel Braz, Joab Braz, Tamares Gomes, Talita Braz e aos meus sobrinhos que amo muito Sarah Braz e Lorenzo Braz pelo apoio, compreensão, ajuda e por fazer meus dias mais prazerosos!

Ao meu namorado Douglas Brito pela força, apoio e incentivo.

Ao professor Dr<sup>o</sup>. Roque Pacheco de Almeida pela orientação, apoio e confiança depositada na minha capacidade de desenvolver esse trabalho, obrigada!

Aos meus orientadores de iniciação científica Prof Dr<sup>o</sup> Paulo Leopoldo e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Tatiana Rodrigues, agradeço pela ajuda, críticas e sugestões durante o mestrado.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Amélia Maria Ribeiro de Jesus pelo incentivo, críticas e sugestões valiosíssimas!

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Priscila Lima pela ajuda nesse estudo orientando-me e ajudando-me nos experimentos de avaliação de produção de citocinas.

Aos meus irmãos em Cristo da Assembleia de Deus no Augusto Franco e São Conrado pelas amizades que formei e pela acolhida de cada um!

À Universidade Federal de Sergipe (UFS) em especial o Laboratório de Biologia Molecular (LBM) pelo ambiente criativo, agradável e amigável que proporciona. Tenho aprendido com cada um de vocês a ser cientista, cozinheira: Meiriely Lima, Aline Barreto, Fabrícia Alvisi, Luana Celina, Micheli Luize, Marcio Bezerra, Mônica Rueda, Rodrigo Cazzaniga, Ricardo Louzada, Roseane Nunes, Thaís Carvalho, Cecília Varquez, Lucas Magalhães e demais...enfim obrigada por tudo!

Às agências de fomento para a realização desta pesquisa: CNPq, CAPES, FAPITEC; e ao IDRI pela colaboração nesta pesquisa.

## RESUMO

Avaliação da resposta imunológica celular a antígenos recombinantes de *Leishmania sp.* em pacientes com leishmaniose visceral. Juciene de Matos Braz, Aracaju/SE, 2015.

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença negligenciada, fatal que afeta a população pobre nos países em desenvolvimento. Há falha no controle da transmissão da doença devido à demora no diagnóstico, tratamento e toxicidade das drogas utilizadas, necessitando de novas estratégias. Dentre as estratégias seria de extrema importância o desenvolvimento de uma vacina a fim de minimizar a frequência dos casos e eliminar a doença. Nesse estudo, avaliamos a resposta imune celular a 10 antígenos recombinantes (SMT, CPB, NH, A2, KMP11, VIZ92, NS, A2MAT, 8NSA e NSA) bem assim ao antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA), dosando as seguintes citocinas: IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-27, TNF- $\alpha$ . Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de 37 indivíduos: LV ativa, LV curado, DTH+ e controles sadios foi estimulado com os antígenos acima por 72 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub>. Ressaltamos que não houve alteração significativa de outras citocinas, além do IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, em resposta aos demais antígenos recombinantes não destacados nos resultados deste estudo. Assim, observamos concentração elevada de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  acompanhados de resposta ao IL-10 em indivíduos mais protegidos em resposta ao estímulo dos antígenos: CPB, VIZ92 e 8NSA; destacamos que em relação ao antígeno CPB tem-se concentração significativa de IFN- $\gamma$  no grupo DTH+ se comparado ao grupo LV ativa e correlação direta entre as concentrações de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre estes dois grupos. Sugerimos que os antígenos CPB, VIZ92 e 8NSA possam estar associados à indução de resposta protetora e ser promissores para utilização em imunoterapia e imunoprofilaxia.

**Palavras chave:** Leishmaniose visceral; resposta imune; antígenos; candidatos a vacina; citocinas

## ABSTRACT

Evaluation of the cellular immune response against recombinant *Leishmania sp.* antigens in patients with visceral leishmaniasis. Juciene de Matos Braz, Aracaju/SE, 2015.

Visceral Leishmaniasis or kala-azar is a neglected, fatal disease that affects the poor population in developing countries. There is failure to control disease transmission due to delay in diagnosis, treatment and toxicity of drugs used, requiring new strategies. Among the strategies, it would be of utmost importance the development of a vaccine in order to minimize the frequency of cases and eliminate the disease. In this study, we evaluated the immune response to 10 recombinant antigens (SMT, CPB, NH, A2, KMP11, VIZ92, NS, A2MAT, 8NSA and NSA) as well as the soluble antigen of *Leishmania* (SLA), dosing the following cytokines: IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-27, TNF- $\alpha$ . PBMC from 37 subjects: active VL, cured VL, DTH+ and healthy controls were stimulated with the antigens mentioned above for 72 hours at 37/5% CO<sub>2</sub>. There was no significant change of other cytokines, besides INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10, in response to the recombinant antigens not highlighted in the results of this study. We observed a high concentration of IFN- $\gamma$  and/or TNF- $\alpha$  accompanied by the response to IL-10 in most protected individuals in response to the stimulus of the antigens: CPB, VIZ92 and 8NSA; we highlight that regarding the antigen CPB, there is a significant concentration of IFN- $\gamma$  in the DTH+ group compared to the active VL group, and direct correlation between IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  concentrations between these two groups. We suggest that antigens CPB, VIZ92 and 8NSA may be associated with the induction of protective responses and may be promising for use in immunotherapy and immunoprophylaxis.

**Keywords:** Visceral leishmaniasis; immune response; antigens; vaccine candidates; cytokines

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela1.</b> Característica demográfica e laboratorial dos participantes.....	30
--	----

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Curva dose resposta representativa de concentrações nos grupos LV curado e DTH+ e controles saudáveis, Aracaju/SE.....34
- Figura 2.** Produção de citocinas ao SLA nos grupos LV ativa, LV curado, DTH+ e controle saudável, Aracaju/SE.....35
- Figura 3.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa, LV curado, DTH+ e controle saudável, Aracaju/SE. ....36
- Figura 4.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa, LV curado, DTH+ e controle saudável, Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25µg/ml de antígeno CPB, Aracaju/SE.....37
- Figura 5.** Correlação direta entre as concentrações de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em células mononucleares em resposta ao estímulo do antígeno CPB no grupo LV ativa e DTH+, Aracaju/SE.....38
- Figura 6.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa, LV curado, DTH+ e controle saudável, Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25µg/ml de antígeno VIZ92, Aracaju/SE.....39
- Figura 7.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa, LV curado, DTH+ e controle saudável, Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25µg/ml de antígeno 8NSA, Aracaju/SE.....40

## LISTA DE ABREVIATURAS

BALB/c- Camundongos Albinos  
C57B/6- “C57 black 6”; C57 preto 6  
CD- “cluster of differentiation”; célula dendrítica  
CpG oligodeoxinucleotídeo (ODN)- Trifosfato de deoxinucleotídeo de citocina “C” seguido de um trifosfato deoxinucleotídeo de guanina “G”  
CXCL- Ligante de quimiocina  
DNA- Ácido Desoxirribonucleico  
DTH- Hipersensibilidade Tardia  
HbR- Receptor de Hemoglobina  
HIV- Vírus da Imunodeficiência Humana  
HLA- Antígeno Leucocitário Humano  
IgM- Imunoglobulina M  
IL- Interleucina  
INF- $\gamma$ - Interferon *gama*  
LC- Leishmaniose cutânea  
LeIF- Fator de Iniciação e Alongamento  
LM – Leishmaniose Mucosa  
LV- Leishmaniose Visceral  
MPL- Monofosforil Lipídio A  
MPL-SE- Emulsão de Monofosforil Lipídio A  
mRNA- Ácido Ribonucleico Mensageiro  
MS- Ministério da Saúde  
NK- Natural Killer  
PAMPs- Padrões Moleculares associados ao Patógeno  
CMSP- Células Mononucleares do Sangue Periférico  
PRRs- Receptores de Reconhecimento associados ao Patógeno  
SLA- Antígeno Solúvel de *Leishmania*  
TGF- $\beta$ - Fator de transformação do crescimento *beta*  
Th- “T helper”; T auxiliares  
TLRs- Receptores do Tipo Toll  
TNF- $\alpha$ - Fator de Necrose Tumoral *gama*  
Treg- T reguladoras

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>15</b>
2.1 Aspectos gerais, susceptibilidade e espectro .....	15
2.2 Ciclo biológico e transmissão dos parasitos de <i>Leishmania</i> .....	16
2.3 Imunopatogênese na LV humana .....	17
2.4 Vacinas na LV humana .....	19
2.4.1 Em modelos animais .....	19
2.4.2 Em humanos .....	21
2.5 Adjuvantes.....	22
2.6 Modalidades terapêuticas .....	24
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>25</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>26</b>
<b>5 RESULTADOS .....</b>	<b>30</b>
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>41</b>
<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>8 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>45</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>46</b>
<b>APÊNDICES E ANEXOS .....</b>	<b>54</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral ou calazar é uma doença negligenciada, potencialmente fatal se não tratada, que afeta a população pobre em países em desenvolvimento (KUMAR; ENGWERDA, 2014). Há falha no controle da doença devido à demora do diagnóstico, tratamento e toxicidade das drogas. Assim, novas estratégias, a exemplo de desenvolvimento de uma vacina e imunoterapia seria importante para o melhor controle da doença (BARRETO *et al.*, 2011). Estima-se que 200.000 a 400.000 novos casos de Leishmaniose Visceral (LV) ocorrem no mundo a cada ano e mais de 90% dos novos casos ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (OMS, 2014). No Brasil, o Ministério da Saúde avalia que a mortalidade da doença em 2013 foi de 7,1% e em Aracaju notificou-se 369 casos sendo 250 casos acometendo o sexo masculino entre os anos de 2008 a 2013 (SINAN/SES, 2014).

A leishmaniose visceral é causada por parasitos obrigatórios intracelulares que replicam suas formas amastigotas e infectam preferencialmente os macrófagos. Os órgãos comumente afetados durante a doença são a medula óssea, fígado e baço. Os sintomas clínicos incluem: hepatoesplenomegalia, febre prolongada, perda de massa muscular, anemia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, pancitopenia e perda de peso (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

O resultado da infecção da doença com os parasitos de *Leishmania* é a incapacidade do macrófago funcionar como uma célula efetora, causando prejuízos imunes e lesão tecidual. Nesse sentido, a citocina IL-10 promove a persistência do parasito sendo indicativa da patogênese na LV (GAUTAM *et al.*, 2011). Por outro lado, o controle da infecção depende de uma resposta imune celular bem sucedida em que o INF- $\gamma$  é produzido principalmente por células T CD4+ e natural killer (NK) estimuladas por IL-12. Para Ansari *et al.*, 2011 outras citocinas como a IL-27 e IL-21 implicam na progressão da doença através da regulação positiva da IL-10. Assim, este autor considera a IL-27 uma citocina chave envolvida na regulação do balanço entre a imunidade e a patologia na LV humana.

A busca por uma vacina para leishmaniose foi objetivo de diversos estudos, utilizando inicialmente parasitos vivos, autoclavados, purificados (GREENBLATT, 1980; HANDMAN, 2001; TITUS *et al.*, 1995). Posteriormente, os estudos têm focalizado na busca de antígenos específicos, purificados e recombinantes (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011; GOTO *et al.*, 2007; GHOSH; ZHANG;

MATLASHEWSKI, 2001; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006; SKEIKY *et al.*, 1998). Afim de preencher essa lacuna, no presente estudo, testamos a resposta imunológica *in vitro* a antígenos recombinantes que foram testados como candidatos a vacina para leishmaniose em modelos animais, mas com eficácia desconhecida em humanos. Avaliamos o perfil de proteção e/ou susceptibilidade a esses antígenos em quatro grupos de indivíduos, a saber: pacientes com LV antes do tratamento e após a cura, DTH+ e controles saudáveis que perfazem um total de 37 indivíduos. Nossa hipótese é que a resposta imune aos antígenos poderá identificar marcadores de doença ou antígenos indutores de resposta protetora.

No presente estudo, observamos concentração elevada de INF- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  acompanhados de resposta ao IL-10 em indivíduos mais protegidos em resposta ao estímulo dos antígenos: CPB, VIZ92 e 8NSA e sugerimos que esses antígenos possam estar associados à indução de resposta protetora e ser promissores para utilização em imunoterapia e imunoprofilaxia.

Ressaltamos que não houve alteração significativa de outras citocinas em resposta aos demais antígenos recombinantes que não foram destacados neste estudo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Aspectos gerais, susceptibilidade e espectro da LV

A LV é causada no velho mundo por *L.donovani* e *L.infantum* e no novo mundo por *L.chagasi* (sinônimo de *L. infantum*). Mais de 90% dos novos casos ocorrem em sete países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal, Sudão do Sul e Sudão. A LV é endêmica em 98 países (ALVAR *et al.*, 2012) e estima-se que a cada ano ocorram 200.000 a 400.000 novos casos e 20.000-30.000 mortes (OMS, 2014). A doença associa-se com desequilíbrios sociais relacionados à pobreza incluindo a malnutrição, deslocamentos populacionais, condições precárias de habitação e a falta de recursos sócio econômicos. Além disso, possui frequência aumentada no sexo masculino com 63,9% dos casos. No Brasil 3253 casos notificaram-se em 2013 e a região Nordeste concentrou nesse mesmo ano 53,6% dos eventos. Ainda segundo dados do SVS/MS (2014) a taxa de letalidade foi de 7,1% em 2013. Em Aracaju/SE entre os anos de 2008 a 2013 notificou-se 369 casos e destes 157 foi o número de casos confirmados, sendo 104 ocorrendo em indivíduos do sexo masculino (SINAN/SES, 2014).

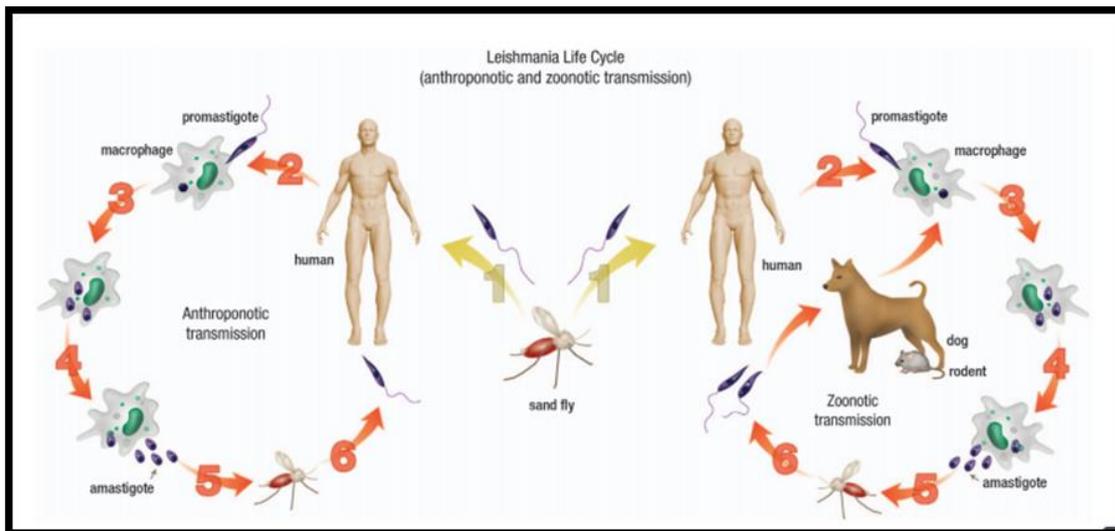
O resultado da infecção da doença por parasitos de *Leishmania* é determinado pela resposta imune, estado nutricional, genética do hospedeiro, espécie do parasito e a presença de coinfeção com HIV. Todavia os fatores genéticos parecem não afetar a população indiana (MEHROTRA *et al.*, 2011). Outra evidência é que a malnutrição é o maior fator de risco especialmente em zonas rurais (NYLÉN; SACKS, 2007), pois esta possui impacto negativo na imunidade inata e adaptativa. Além disso, infecções helmínticas são comuns em áreas rurais o que pode favorecer a replicação dos parasitos de *leishmania*. Segundo Ostyn *et al.*, 2011 fatores epidemiológicos, tais como residir em áreas próximas de casos anteriores de LV são riscos para o desenvolvimento da LV. Adiciona-se a esses elementos listados que os pacientes com LV são imunossuprimidos que favorece a infecções secundárias oportunistas como o HIV (TOQEER *et al.*, 2012).

Os sintomas compreendem dor de cabeça, febre, tonturas, vômitos, sangramento gengival, dor muscular, perda de peso, hepatoesplenomegalia, anemia com leucopenia e linfadenopatia (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Mas, salienta-se que a maioria das pessoas infectadas com *L.donovani* e *L.infantum* possivelmente não desenvolverão os sinais e sintomas da LV (NYLÉN; KUMAR, 2012). Ou seja, muitos indivíduos são subclínicos ou assintomáticos à infecção por *leishmania* e isto pode ser atribuído ao desenvolvimento de respostas imunes eficaz contra o parasito (OSTYN *et al.*, 2011). Os

obstáculos que representam a infecção assintomática e as lacunas existentes é essencial para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes para o controle da LV.

## **2.2 Ciclo biológico e transmissão dos parasitos de *Leishmania***

A LV é uma infecção zoonótica comum nas Américas que é causada por *L. infantum*, um parasito transmitido por fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomya* quando as formas promastigotas são inoculadas na pele ao realizarem o repasto sanguíneo (LAINSON; SHAW, 1987). Assim, durante o repasto sanguíneo flebotomíneos fêmeas infectadas com promastigotas metacíclicas são introduzidas na derme do hospedeiro mamífero. Em seguida, neutrófilos são recrutados para o lado da infecção e podem escapar da lise do complemento entregando os parasitos para o macrófago, mecanismo conhecido como “cavalo de tróia” (KHADEM; UZONNA, 2014). A maioria dos parasitos são lisados pelo complexo de ataque à membrana do sistema complemento, os demais são fagocitados pelos macrófagos quando transformam-se nas formas amastigotas e nesse ambiente dividem-se por divisão binária. Então, elucidando, as formas promastigotas ativamente invadem os macrófagos ou são fagocitados por estes (CHHAJER; ALI, 2014). Os macrófagos quando repletos de parasitos rompem-se e as amastigotas passam agora a infectar novos macrófagos e células dendríticas disseminando-se e migrando para o baço, fígado e medula óssea (KHADEM; UZONNA, 2014). Em um novo repasto sanguíneo flebotomíneos ingerem macrófagos infectados que alcançam o intestino, espalham as formas amastigotas e estas por sua vez convertem-se nas formas promastigotas, multiplicam-se, modificam sua conformação procíclica em metacíclica, migram para o intestino anterior ou médio e logo após para a probóscide (CHHAJER; ALI, 2014). Desde então, podem ser transmitidos para um outro hospedeiro humano, transmissão antrozoonótica, ou para reservatórios animais, transmissão zoonótica (KUMAR; ENGWERDA, 2014).



Fonte: Kumar; Engwerda, 2014

### 2.3 Imunopatogênese na LV humana

A resposta imune adaptativa na infecção por *leishmania* é ineficiente durante a fase aguda da doença visceral. Células T de pacientes com LV quando estimuladas por antígenos solúveis de *leishmania*, *in vitro*, não produzem  $\text{INF-}\gamma$  e produzem IL-10, denotando padrão tipo Th2 ou T regulador. Todavia, no soro de pacientes com LV há concentrações elevadas de citocinas de padrão misto Th1/Th2/Th17/Treg, além de outras moléculas inflamatórias e antiinflamatórias, incluindo  $\text{INF-}\gamma$ , IL-10 e quimiocinas (NYLÉN *et al.*, 2007). Wolday *et al* (2000) mostrou que CMSP de pacientes com *leishmania* produziam baixos níveis de IL-12 e  $\text{INF-}\gamma$  e altos níveis de IL-4 e IL-10 quando estimulados com SLA.

O bloqueio da IL-10 em um ensaio celular *ex vivo* no tecido do baço de pacientes mostrou aumento na produção de  $\text{INF-}\gamma$  e  $\text{TNF-}\alpha$  associado com significativa redução do crescimento do parasito (GAUTAM *et al.*, 2011) indicando que a IL-10 é fundamental na patogênese da LV. Outro estudo com neutralização da IL-10 revelou produção de  $\text{INF-}\gamma$  (SINGH *et al.*, 2012). Estudos apontam que as células Treg acumuladas na medula óssea de pacientes foram fonte de IL-10 podendo suprimir a imunidade antiparasitária (RAI *et al.*, 2012).

Além do IL-10, o  $\text{TGF-}\beta$  também é produzido durante a fase aguda da LV e tem função supressiva sobre a resposta de macrófagos por diminuir a produção de óxido nítrico. Ou seja, a produção de  $\text{TGF-}\beta$  por células Treg contribui para a patogênese da doença e consequente susceptibilidade (NAKAMURA *et al.*, 2004).

Ansari *et al* (2011) demonstrou a presença de níveis elevados de IL-27 na circulação e aumento de mRNA acumulado no baço de pacientes com LV, bem como um aumento da expressão de IL-21 em mRNA. Além disso, a literatura esclarece que a IL-27 pode inibir a diferenciação de células Th17 que são importantes para migração, recrutamento e ativação de neutrófilos (NYLÉN; KUMAR, 2012). Na mesma direção, dados corroboram e acrescentam que a IL-27 não só inibe a diferenciação de células Th17 como também a produção da IL-17 (LIU; ROHOWSKY-KOCHAN, 2011). Associa-se a IL-27 o papel de amplificar a produção de IL10 por indução da IL-21 (SPOLSKI *et al.*, 2009).

Por outro lado, IL-12 é uma imunorreguladora que inicia e mantém a resposta protetora além de desempenhar um papel importante na indução da produção de IFN- $\gamma$ . O controle da infecção depende de uma resposta imune bem sucedida em que o INF- $\gamma$ , produzido por células T CD4+ e NK ajuda na resolução da infecção. Além dessa citocina, o TNF- $\alpha$  exibe papel protetor por sinergismo com o INF- $\gamma$  intervindo no controle da infecção. Logo, embora o INF- $\gamma$  seja claramente necessário em mediar resposta protetora, este sozinho não é suficiente para induzir proteção (BODGAN; SOLBACH; ROLLINGHOFF *et al.*, 1990). Carvalho *et al* (1992) demonstrou que CMSP de indivíduos com infecção assintomática respondem normalmente aos estímulos com produção de IL-2, IFN- $\gamma$  e IL-12. De fato, a imunidade celular depressora é uma característica da LV em humanos. Em contraste, o sangue total de pacientes curados da LV é capaz de proliferar e produzir INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (SINGH *et al.*, 2012).

Ainda não está estabelecido o papel dos anticorpos na patogênese. Porém, sabe-se que a doença em humanos está associada, no plasma, a altos níveis e complexos imunes que podem liderar a produção de IL-10 nos macrófagos contribuindo para o estabelecimento da patogênese (BUXBAUM; SCOTT, 2005). Embora os elevados níveis de anticorpos anti-leishmania IgG, IgM, IgE, e subclasses de IgG sejam bem documentados na doença seu preciso papel na proteção é controverso e necessita ser reavaliado (RYAN *et al.*, 2002). Provavelmente, o INF- $\gamma$  regula positivamente IgG1 e IgG3 enquanto que IL-4 e IL5 estimula a produção de altos níveis IgG, IgM, IgE e subclasses de IgG, como o IgG 4 em humanos (OZBILGE *et al.*, 2006). Apesar disso, anticorpos não são relevantes para induzir proteção na ausência de uma apropriada resposta celular. Em geral, ambas células CD4+ e CD8+ são imperativas afim de mediar o controle do parasito.

## 2.4 Vacinas na LV humana

### 2.4.1 Em modelos animais

Diferentes estratégias de vacinação contra a leishmaniose são examinadas em modelos animais partindo do pressuposto que a cura e proteção contra a reinfeção estão associadas às células Th1 e T CD8+. Alguns desses métodos analisados inclui a leishmanização (GREENBLATT, 1980; HANDMAN, 2001), parasitos vivos atenuados (TITUS *et al.*, 1995), proteínas recombinantes (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011; GOTO *et al.*, 2007; GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006; SKEIKY *et al.*, 1998).

Compreender a patogênese da infecção por *leishmania* e a geração de respostas protetoras nos eventos imunológicos, em conjunto com o sequenciamento do genoma tem traçado novos caminhos para a pesquisa de vacinas na leishmaniose visceral. Contudo, apesar dos esforços, ainda não há um candidato capaz de proporcionar o nível de proteção necessária para um programa de eliminação da doença.

Uma revisão de Gunnavaram *et al* (2014) identifica estudos empregando antígenos recombinantes com eficácia protetora na infecção por *L. donovani* em modelos experimentais. Uma outra possível vacina mencionada utilizando antígenos de proteína adaptado para a LV, a chamada vacinologia reversa, propõe identificar antígenos que induzam células T CD4+ e CD8+ relacionadas à proteção (AEBISCHER, 2014).

A proteína recombinante quer sozinhas ou combinadas com um adjuvante tem sido testada como vacinas na infecção por *Leishmania* em modelos experimentais e em estudos pré-clínicos. O produto recombinante é acessível em larga escala, tem baixo custo e as respostas induzidas após a vacinação pode ser potencializado com um adjuvante apropriado (REED *et al.*, 2009; DUTHIE *et al.*, 2011). Entre alguns destes antígenos inclui-se um estudo com células dendríticas derivadas de medula óssea utilizando o KMP-11 que é um peptídeo de *L. infantum* e oligonucleótidos CPG sendo capazes de induzir proteção num modelo murino de leishmaniose visceral (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011). Um outro estudo com camundongos C57BL/6 imunizados com o esterol 24-c-metiltransferase (SMT) em associação com o MPL caracterizou-se pela produção de INF- $\gamma$  *in vitro*, indicando que SMT/MPL podem ser candidatos a vacinas contra a LV (GOTO *et al.*, 2007). Outro dado sugere que a

proteína A2 específico de amastigota protege camundongos contra a infecção por *L. donovani* e resultou em um misto de resposta humoral Th1/Th2 (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001). Imunizações em camundongos BALB/c utilizando a proteinase cisteína B (CPB) demonstrou induzir anticorpos IgG2A sugerindo um padrão de resposta imune protetora (RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006). Outra proteína recombinante é o fator de iniciação e alongamento (LeIF) de *L. braziliensis* que conduz a um perfil de citocinas favorável à erradicação do parasito, mediada por IL-12 (SKEIKY *et al*, 1998).

Dessa forma, estes antígenos recombinantes são testados em modelos animais para a sua imunogenicidade e eficácia protetora, porém poucos evoluíram para ensaios clínicos em primatas não humanos, cães ou em estudos pré-clínicos humanos. Assim, devido ao polimorfismo genético na resposta imune de mamíferos, vacinas com multicomponentes provocam uma melhor resposta protetora. Por isso, os preparativos poliprotéicos como a Leish-111f, Leish-110f, KSAC vieram à existência evidenciando melhor proteção contra LV. Nesse sentido, antígenos de proteínas foram formulados pela fusão do KSAC composto por KMP-11, SMT, A2 e CPB sendo que cada componente desta proteína foi capaz de conferir proteção individualmente na doença (RAFATI *et al.*, 2005; BASU *et al.*, 2005; GOTO *et al.*, 2007; GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006). Dois desses antígenos individuais, SMT e o CPB, melhoraram a maioria da proteção fornecida pelo KSAC no modelo de LV. Os autores sugerem ser possível produzir uma vacina prática com custo-efetividade capaz de proteger humanos e cães contra múltiplas espécies de *Leishmania* (GOTO *et al.*, 2011).

Além das proteínas, o DNA também é utilizado como um meio de administração de vacina contra a LV. Assim, A2 quando administrada como vacina de DNA resultou em proteção em camundongos BALB/C com indução de resposta imune celular e humoral (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001). Basu *et al* (2005) e Bhaumik *et al* (2009) utilizando KMP-11 como vacina de DNA em hamsters e em BALB/C, respectivamente, decorreu em significativa proteção com regulação negativa de IL-10. Camundongos BALB/C desafiados com *L. chagasi* empregando as proteínas A2 e NH originou resposta protetora (somente para A2) com aumento de INF- $\gamma$  e diminuição de IL-4 e IL-10 (ZANIN *et al.*, 2007). Abordagens clássicas, moleculares e alternativas também são utilizadas em estudos de vacinas na leishmaniose como revisado por Joshi *et al* (2014). No geral, essas pesquisas em modelos experimentais sugerem que vacinas

de DNA podem induzir atividade imunomodulatória em pacientes com LV resultando na cura da doença.

#### 2.4.2 Em humanos

Apesar dos bons resultados obtidos em modelos animais observa-se discrepância entre em estudos pré-clínicos *in vitro* no homem, incluindo a não geração de células T multifuncionais. Uma abordagem no entendimento da resposta sistêmica induzida pelas vacinas candidatas e na seleção das mais promissoras, surge com a chamada “System biology”. Esta nova abordagem traz a possibilidade de analisar em indivíduos com a forma assintomática da infecção por *leishmania* e em pacientes curados de LV, de forma mais abrangente, as mudanças que ocorrem em resposta às moléculas candidatas. Assim, seria possível analisar diversos elementos da resposta imune inata, adaptativa, expressão de moléculas solúveis e celulares, utilizando múltiplas ferramentas tecnológicas que avaliam DNA, RNA e proteômica, combinada com análise de bioinformática, em uma abordagem multifuncional, afim de identificar respostas-chave associadas à proteção no hospedeiro, como ressaltado na revisão de Gannavaram *et al* (2014).

Num ensaio clínico avaliou-se a segurança e imunogenicidade da Leish-F1 + MPL-SE para utilização na prevenção da LV. Os resultados indicam que a vacina Leish-F1 + MPL-SE é segura e imunogênica em indivíduos com e sem história de infecção prévia por *L. donovani* (CHAKRAVARTY *et al.*, 2011). É definida como a primeira vacina para leishmaniose em ensaios clínicos humanos e concluiu a fase 1 e 2 de segurança e testes de imunogenicidade em humanos.

Outro estudo avalia a habilidade e eficiência em liberar citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias de seis candidatos a vacina em CMSP de pacientes curados e controles saudáveis. Entre os candidatos testados, um maior número de pacientes curados distinguiu o CPB e o SMT capazes de gerar intensa resposta de INF- $\gamma$  (KUMAR *et al.*, 2010).

Analisando uma população de área endêmica da Índia utilizando 11 antígenos como candidatos a vacina mensurou-se o sangue total de pacientes com LV ativa, curados e controles endêmicos saudáveis positivos e negativos e os resultados mostram um balanço de citocinas pro-inflamatórias (INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e a IL-10. Os dados propõem que pacientes curados para LV e controles endêmicos positivos reconhecem 5

antígenos com alta porcentagem de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em indivíduos curados e DTH+ (R71, N52, L37, J41, M22 (SINGH *et al.*, 2012).

Esses mesmos antígenos foram testados em uma população peri-urbana no Brasil em pacientes com LV, controles saudáveis positivos (DTH+) e negativos (DTH-) mostrou que 7 de 11 antígenos (R71, L37, N52, L302.06, M18, J41 e M22) produziram INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em indivíduos DTH+ acompanhado da IL-10 (STOBER *et al.*, 2012). Essas pesquisas apoiam a hipótese de que a produção de citocinas em cultura de CMSP dos indivíduos curados e DTH+ comparados com os casos de LV ativa fornecerá conhecimento de potenciais candidatos vacinais.

## 2.5 Adjuvantes

A imunidade inata forma a primeira linha de defesa contra a invasão de patógenos e vários receptores do tipo toll (TLRs) como o TLR2 e TLR3 (FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006) TLR4 e TLR9 (MUKHERJEE *et al.*, 2012), TLR7 (PAUN *et al.*, 2011) contribuem para a detecção e reconhecimento da *leishmania* por várias células imunes inatas. A identificação de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e seus receptores de reconhecimento associados ao patógeno (PRRs), revolucionaram a pesquisa de vacinas. Interações entre PRRs e seus PAMPs iniciam uma cascata de sinalização intracelular que conduzem à produção de citocinas, quimiocinas, mediadoras de indução de respostas inflamatórias e antiparasitárias. Esse processo ativa uma resposta imune adaptativa sob medida para o micróbio invasor. Estes PAMPs, especificamente os que se ligam aos TLRs, são a base de muitos adjuvantes (REED *et al.*, 2009; DUTHIE *et al.*, 2011). A descoberta da capacidade dos adjuvantes em aumentar a resposta imunológica de doenças específicas, empregando antígenos recombinantes tem destacado os programas de vacinas.

Antígenos candidatos a vacinas apresentados com adjuvantes apropriados pode induzir resposta imune adequada. O monofosforil lipídio A (MPL) sinaliza pela via do TLR4 a produção de células T efectoras. O MPL foi avaliado pela primeira vez contra a leishmaniose em um estudo profilático em modelo murino de LC com *L. mexicana* (AEBISCHER *et al.*, 2000). Em estudos posteriores reformularam o MPL numa emulsão de óleo-água (MPL-SE) o que ajudou a melhorar a sua eficácia (COLER; REED, 2005). Várias investigações provam que o MPL-SE induz um forte perfil protetor, com níveis elevados de IFN- $\gamma$  e baixos níveis de citocinas como a IL-4 e IL-

10. Além disso, este adjuvante tem eficácia equivalente nos modelos murinos de LC e LV (COLER *et al.*, 2007; GOTO *et al.*, 2007). O MPL evidenciou ser um potente adjuvante e aparentemente não tóxico, seguro e aprovado para uso humano. É amplamente utilizado em ensaios clínicos para várias doenças (câncer e doenças infecciosas) e mais de 100 mil doses do adjuvante foram aplicadas em seres humanos (DIDIERLAURENT *et al.*, 2009).

Imiquimod igualmente pode aumentar a resposta imune protetora mediando, através da IL-12, a geração de IFN- $\gamma$  dos macrófagos (WAGNER *et al.*, 1999). Divulgou-se que o tratamento com imiquimod em macrófagos infectados com *L. donovani* resultou na morte de amastigotas intracelulares dependente da produção de NO pelos macrófagos tratados (BUATES; MATLASHEWSKI, 1999). Estruturalmente imiquimod assemelha-se a uma cadeia simples de RNA e é capaz de ativar macrófagos via TLR7 (HEMMI *et al.*, 2002). Dadas as propriedades adjuvantes do imiquimod em uso tópico no tratamento de doenças infecciosas, foi avaliado no modelo experimental do LC em camundongos BALB/c. Constatou-se, então, que a aplicação tópica de imiquimod antes da imunização subcutânea com antígeno bruto de *leishmania* contribuiu para a proteção, em comparação à imunização com o antígeno sozinho (ZHANG; MATLASHEWSKI, 2008).

Por outro lado, explorou-se as propriedades adjuvantes de CPG oligodeoxinucleotídeo (CPG ODN) em vacinas experimentais de doenças como o linfoma, a hepatite, a malária, a gripe, leishmaniose, antes da descoberta do seu receptor inato o TLR9 (MOLDOVEANU *et al.*, 1998; ZIMMERMANN *et al.*, 1998; HEMMI *et al.*, 2000). O modelo de camundongo de LC foi empregado para mostrar a capacidade do CPG em exibir uma forte resposta relacionada à proteção acompanhado, portanto, de produção de IFN- $\gamma$ , condição atraente para uma vacina em LC (YANG *et al.*, 2010). A vacinação com CPG ODN induziu alta frequência de células T multifuncionais, especialmente no modelo LC sugerindo ser bons adjuvantes na terapia e profilaxia (RAMAN *et al.*, 2012).

A interleucina-12, originalmente chamada de fator estimulador de células natural killer, revelou que pode estimular a produção de IFN- $\gamma$  a partir de células T e células natural killer (MANETTI *et al.*, 1993). O envolvimento da IL-12 na promoção de resposta protetora *in vivo* evidenciou-se em camundongos na LC (SYPEK *et al.*, 1993). A utilização de IL-12 como um adjuvante foi posteriormente examinada em vários modelos, incluindo o modelo murino de LC (METZGER, 2010).

## 2.6 Modalidades terapêuticas

O tratamento dos indivíduos que desenvolveram o calazar inclui atualmente as quimioterapias e vários fatores limitam seu uso: elevado custo, toxicidade, resistência do parasito à droga e coinfeção da *leishmania*-HIV que aumenta a urgência de novas abordagens terapêuticas afim de controlar a doença (CHAKRAVARTY; SUDAR, 2010). Usados na prática clínica, os antimoniais pentavalentes causa vários efeitos colaterais tais como a cardiotoxicidade, pancreatites e nefrotoxicidade (MATOUSSI *et al.*, 2007; GASSER *et al.*, 1994; ZAGHLOUL; AL-JASSER, 2004). A maior limitação do uso do desoxicolato de Anfotericina B é a hospitalização prolongada e o acompanhamento rigoroso devido à nefrotoxicidade. Por outro lado, sua formulação lipossomal é usada como primeiro tratamento de escolha em países como Europa e EUA, conforme citado numa revisão publicada por Roatt *et al.*, 2014. No Brasil, o Ministério da Saúde expandiu seu uso devido ao seu perfil de segurança e atividade antileishmanicida (SINHA *et al.*, 2010) e tem sido incluído no tratamento de pacientes coinfectados (MS, 2013). A primeira droga oral, a miltefosine, é efetiva para a LV com efeitos colaterais como os distúrbios gastrointestinais, contudo a teratogenicidade é o maior problema (SUNDAR; OLLIARO, 2007).

Porém, na ausência de uma vacina e medidas de controle efetivas para o vetor a imunoterapia tem sido pesquisada como opção de tratamento e controle da LV. Dentre uma dessas alternativas cita-se as citocinas que tem funções autócrinas e parácrinas agindo localmente ou a distância suprimindo ou aumentando a imunidade. Dados de Murray *et al* (2003) evidenciaram a utilidade das citocinas quando o receptor de anticorpo monoclonal anti-IL10 (anti-IL10 mAb) provocou a morte dos parasitos induzindo a geração de óxido nítrico por mecanismo dependente de sintase. Em pacientes do Brasil, Kênia e Índia pesquisas com terapias combinadas com INF- $\gamma$  recombinante humano e antimoniais pentavalentes sugerem cura clínica se comparado apenas com a droga (BADARO *et al.*, 1990; SUNDAR; MURRAY, 1995). Outra opção são as células dendríticas baseada na imunoterapia combinadas com antimônio revelando ser efetiva contra a LV em murinos (GHOSH *et al.*, 2003). Embora estas observações deem suporte à imunoterapia como uma alternativa promissora à quimioterapia convencional grandes desafios necessitam ser esclarecidos e uma delas é a segurança dessa opção de tratamento com agentes biológicos como a *leishmania*.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

3.1.1 Avaliar a resposta imune celular de pacientes com LV, curados, DTH+ e controles saudáveis frente aos antígenos recombinantes de *Leishmania sp.*

*Hipótese: a resposta imune aos antígenos poderá identificar marcadores de doença ou antígenos indutores de resposta protetora*

#### 3.2 Específicos

3.2.1 Avaliar *in vitro* a resposta imune celular de pacientes com LV, obtidas tanto antes do tratamento quanto após a cura frente aos estímulos de antígenos recombinantes de *Leishmania sp.*

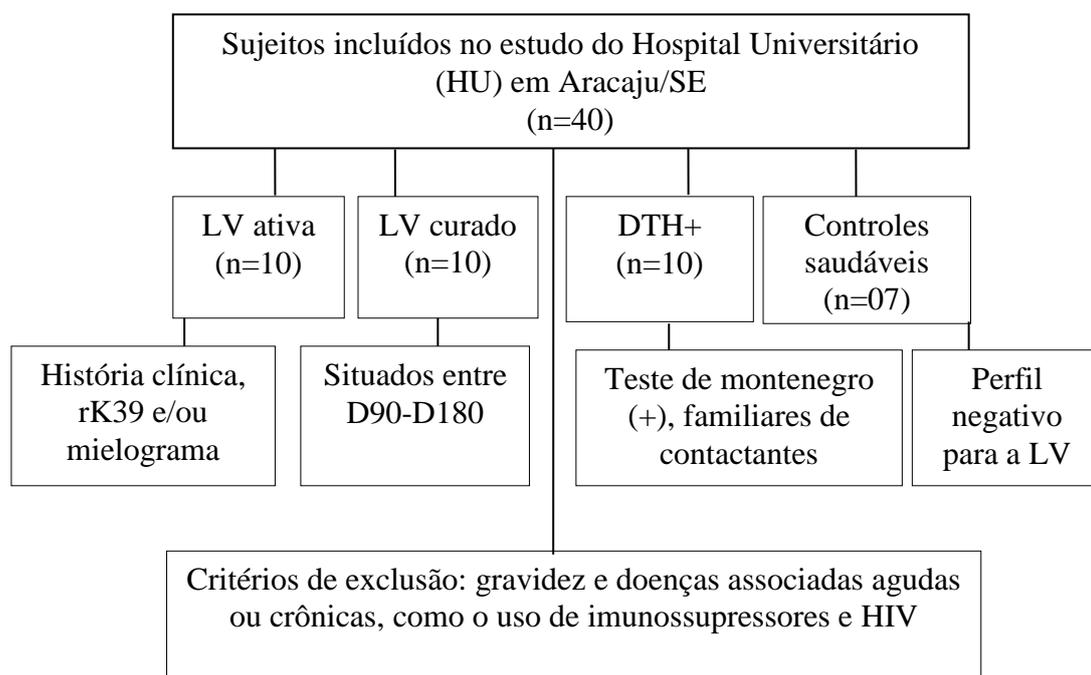
3.2.2 Avaliar *in vitro* a resposta imune celular de pacientes na forma assintomática frente aos diferentes antígenos recombinantes de *Leishmania sp.*

3.2.3 Avaliar *in vitro* a resposta imune celular de indivíduos controles saudáveis frente aos diferentes antígenos recombinantes de *Leishmania sp.*

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Sujeitos, desenho do estudo, considerações éticas

A coleta das amostras de sangue foi realizada no período de 2013 a 2014 no Hospital Universitário (HU) em Aracaju/SE, referência para o tratamento da Leishmaniose Visceral. Os critérios de inclusão são os sinais e sintomas clínicos da doença: febre, perda de peso, anemia, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia, além de confirmação positiva do teste sorológico rK39 (KalazarDetect® Rapid Test: InBiosInternational Inc., Seattle, WA) e aspirado de medula óssea. Os critérios de exclusão são: gravidez e doenças associadas agudas ou crônicas, como o uso de imunossupressores e HIV. O total de 37 participantes do estudo, foram caracterizados em quatro formas clínicas: **a)** LV ativa (n=10) com história clínica, parasitologia confirmada por aspirado de medula óssea e respondentes ao tratamento; **b)** LV curado situados entre D90-D180 (n=10); **c)** Sujeitos DTH+ (n=10) que tinham história clínica negativa de LV e teste de Montenegro positivo aplicado na pele, via intradérmica, com área de endurecimento mensurada após 48-72h utilizando a técnica da caneta esferográfica. Diâmetros  $\geq 5$ mm é considerado positivo indicando exposição prévia à *Leishmania*. Esses indivíduos representam contactantes de familiares que foram expostos, porém são assintomáticos; **d)** Controles saudáveis com perfil negativo para a LV (n=07).



Os indivíduos são provenientes da cidade de Aracaju e adjacências, Sergipe, Brasil. O estudo faz parte de um projeto maior e foi aprovado pelo comitê de ética do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, CAAE-0123.0.107.000-11. Todos os indivíduos que participaram da pesquisa e os responsáveis menores de 18 anos, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), Apêndice A e B. A avaliação clínica e imunológica dos familiares de pacientes com LV foi obtida através da aplicação de questionário (Apêndice C).

Nenhum dos sujeitos curados e DTH+ desenvolveram a forma clínica da LV durante 1 ano de seguimento. A caracterização clínica e demográfica dos participantes do estudo é sumarizada na tabela 1.

## **4.2 Antígenos**

Antígenos previamente caracterizados e usados neste estudo: SMT (GenBank: XP\_001469832.1), CPB (GenBank: CAD12393.1), NH (GenBank: XP\_001464969.1), A2 (GenBank:S69693.1), KMP-11 (GenBank: XP\_001469032.1). As proteínas recombinantes foram caracterizadas em estudos prévios (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; GOTO *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2010). O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) preparou-se a partir de promastigotas de *L. donovani* por sonicação previamente descrito (GOTO *et al.*, 2009). Salientamos que neste estudo piloto empregamos antígenos que ainda não foram referenciados na literatura (VIZ92, NS, A2MAT, 8NSA e NSA) obtidos do IDRI, Seattle, Washington com quem mantemos colaboração.

## **4.3 Separação de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)**

As células mononucleares foram obtidas a partir do sangue heparinizado, diluído 1:2 em salina a 0,9%, e separação através de um gradiente de densidade o Ficoll-Hipaque (Pharmacia AB, Upsalla, Sweden), em uma proporção de 100µl para cada 10ml de sangue diluído e centrifugação a 1.500 rpm por 35 minutos à temperatura ambiente. O anel de células mononucleares foi aspirado da interfase e as células foram lavadas 3 vezes com salina 0,9% e centrifugadas a 1.250 rpm por 10 minutos e ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Grand Island, New York, USA).

Posteriormente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços fundo chato a 37<sup>0</sup> C em 5% CO<sub>2</sub> por 72 horas.

#### **4.4 Curva dose resposta**

Na intenção de determinar a dose final dos antígenos a ser utilizada nos experimentos subsequentes resolvemos quantificar o INF- $\gamma$ , após o estímulo e 72 horas de incubação das células mononucleares, pela técnica do ELISA, nos grupos LV curado, DTH positivo e controles saudáveis, em número de 3 sujeitos cada um, submetidos à dosagem de duas concentrações: 25 $\mu$ g/ml e 50  $\mu$ g/ml. Nos experimentos subsequentes utilizamos a dose de 25 $\mu$ g/ml, Fig. 01.

#### **4.5 Estimulação do sangue periférico com antígenos**

A estimulação final do experimento realizou-se com antígenos (SMT, CPB, NH, A2, KMP-11, VIZ 92, A2 MAT, 8NSA e NSA) na concentração de 25  $\mu$ g/ml, após a realização da curva dose resposta. Esses antígenos foram provenientes do Instituto de Pesquisas de doenças infecciosas (IDRI), EUA com quem mantemos colaboração. Além desses foram utilizados o antígeno solúvel de *leishmania* (10 $\mu$ g/ml), fitohemaglutinina (PHA, SIGMA) na concentração de 10  $\mu$ g/ml, e o derivado purificado da proteína (PPD) do *Mycobacterium tuberculosis* (10 $\mu$ g/ml) com controles positivos. Posteriormente, células do sangue periférico foram incubadas em 5% CO<sub>2</sub>, 37°C durante 72 h e os sobrenadantes das células foram coletados e estocados a -80<sup>0</sup>C até o momento da dosagem das citocinas.

#### **4.6 Dosagem de citocinas em cultura de CMSP**

A dosagem das citocinas IL-1 $\beta$ , IL-12p70, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-27, TNF- $\alpha$  foi determinada usando o imunoensaio de 7-miliplex com beads magnéticas (HTH17MAG-14K-07, Merck Millipore, Massachusetts, USA), realizada de acordo com as instruções do fabricante, Millipore, Darmstadt, Germany.

#### **4.7 Análise estatística**

Os dados foram inseridos em um banco no programa Excell (versão 2011). Teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov foi realizado e os dados não seguiram a distribuição de Gauss. Devido à falta de normalidade diferenças estatísticas entre 2 pares de grupos foram determinados pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. Correlações entre os valores de citocinas foram realizados pelo teste de Spearman. Os gráficos e análises foram realizadas no programa GraphPad Prism versão 4.0, 2005. Consideramos os dados estatisticamente significativos quando o  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Dados demográficos e laboratoriais dos participantes do estudo

Todos os pacientes com doença ativa tiveram confirmação diagnóstica pelo teste Sorológico rK39 e/ou mielocultura. A tabela 1 descreve as características demográficas e hematológicas dos pacientes participantes do estudo. Dentre os indivíduos estudados em relação a idade e ao sexo, não observamos diferenças. No que diz respeito aos dados hematológicos, o grupo com LV ativa apresenta desordens hematológicas que são restauradas após o tratamento. Nenhum dos indivíduos, incluindo os curados e DTH+, desenvolveram a forma clínica da LV durante 1 ano de seguimento. No sumário dos dados, os indivíduos DTH positivos não apresentaram anormalidades clínicas nem laboratoriais.

**Tabela 1.** Característica demográfica e laboratorial dos participantes

	Controles endêmicos		LV ativa	LV curado
	Controles saudáveis	DTH+		
<b>N</b>	07	10	10	10
<b>Idade (anos)</b>	33,5 ± 13,2	28,7 ± 10,3	28,5 ± 12,7	35 ± 8,06
<b>Sexo %</b>				
(M/F)	5/2	7/3	6/4	7/3
<b>Linfócito (/mm<sup>3</sup>)</b>	NA	3,1 ± 1,2	1,8 ± 0,4	4,1 ± 3,0
<b>Neutrófilo (/mm<sup>3</sup>)</b>	NA	4,0 ± 1,3	1,9 ± 0,8	3,7 ± 2,3
<b>Eritrócitos (/mm<sup>3</sup>)</b>	NA	4,9 ± 0,4	3,6 ± 0,8	4,4 ± 0,7
<b>Hemoglobina (g/dl)</b>	NA	13,5 ± 1,2	9,3 ± 1,7	12,8 ± 1,4
<b>Plaquetas (/mm<sup>3</sup>)</b>	NA	252 ± 51	175 ± 50	203 ± 63

**Nota:** Dados de média ± DP; NA= não aplicável

## 5.2 Produção de citocinas ao SLA relacionado com o estado da doença

### 5.2.1 Produção de INF- $\gamma$

A fim de investigar a produção de INF- $\gamma$  estimulamos o sangue periférico com antígeno solúvel de *L. donovani* em quatro diferentes grupos de indivíduos. Na comparação das respostas ao longo de 72 horas pós estimulação entre os grupos os resultados de média e desvio padrão mostraram que o grupo assintomático DTH+ ( $1033 \pm 1321$  pg/ml;  $p=0,0046$ ) e LV ativa ( $154 \pm 156$  pg/ml;  $p=0,013$ ) revelaram significativa resposta ao INF- $\gamma$  comparando ao grupo controle sadio ( $28 \pm 53$  pg/ml), (Fig. 2a).

### 5.2.2 Produção de TNF- $\alpha$

De interesse é a observação da geração significativa de TNF- $\alpha$  (Fig. 2b) nos grupos LV ativa ( $622 \pm 774$  pg/ml;  $p=0,002$ ), grupo DTH+ ( $972 \pm 1143$  pg/ml;  $p=0,012$ ) e LV curado ( $1077 \pm 1303$  pg/ml;  $p=0,009$ ) se comparado ao controle saudável ( $42 \pm 72$  pg/ml).

### 5.2.3 Produção de IL-10

Quando comparadas as concentrações de IL-10 (Fig. 2c) no grupo DTH positivo ( $481 \pm 458$  pg/ml;  $p=0,0004$ ), LV curado ( $547 \pm 851$  pg/ml;  $p=0,0068$ ) e LV ativa ( $311 \pm 261$  pg/ml;  $p=0,025$ ) observamos diferenças significativas quando comparado ao grupo controle saudável ( $28 \pm 60$  pg/ml).

### 5.3 Produção de citocinas frente ao estímulo de antígenos específicos

Neste ensaio analisamos a produção de citocinas em CMSP frente a dez antígenos em grupos caracterizados (Tabela 1). Mensuramos o INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  em cada um dos 10 antígenos e a IL-10 como citocina regulatória. Salientamos que o background foi subtraído das análises.

Afim de obtermos uma impressão geral do comportamento dos antígenos recombinantes que podem ser utilizados para imunoprofilaxia e/ou imunoterapia, quando o anel de células foi estimulado por 72 horas, plotamos os dados referentes a produção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10. Nas Figuras 3a, 3b e 3c observamos produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  proeminente em indivíduos mais protegidos se comparado ao grupo LV ativa, ainda que acompanhados de produção de IL-10 nos diferentes antígenos destacando-se o CPB, VIZ92 e 8NSA. Nas demais análises com outras citocinas em resposta aos demais antígenos recombinantes, não houve alteração significativa.

#### 5.3.1 Produção de INF- $\gamma$

Assim, ao compararmos as concentrações de INF- $\gamma$  em culturas de células após 72 horas de estímulo ao CPB observamos produção significativa no grupo mais protegido, DTH+ ( $685 \pm 948$  pg/ml;  $p=0,035$ ) se comparado ao grupo LV ativa ( $101 \pm 129$  pg/ml) (Fig 4a).

Por outro lado, ao estímulo do VIZ92 e 8NSA (Fig. 6a e 7a, respectivamente) não observamos diferenças significativas entre os grupos.

#### 5.3.2 Produção de TNF- $\alpha$

Analisando o perfil do TNF- $\alpha$  observamos que ao antígeno CPB (Fig. 4b), não houve diferenças significativas entre os grupos.

Destacamos que ao estímulo do VIZ92 (Fig. 6b) houve produção significativa no grupo LV curado ( $1885 \pm 2225$  pg/ml;  $p= 0,033$ ) se comparado ao grupo controle saudável ( $295 \pm 315$  pg/ml).

Da mesma forma, quando as células mononucleares foram estimuladas com o 8NSA (Fig. 7b) distinguimos produção significativa desta citocina no grupo curado

( $3232 \pm 2812$  pg/ml;  $p= 0,043$ ) em relação ao grupo controle saudável ( $657 \pm 458$  pg/ml).

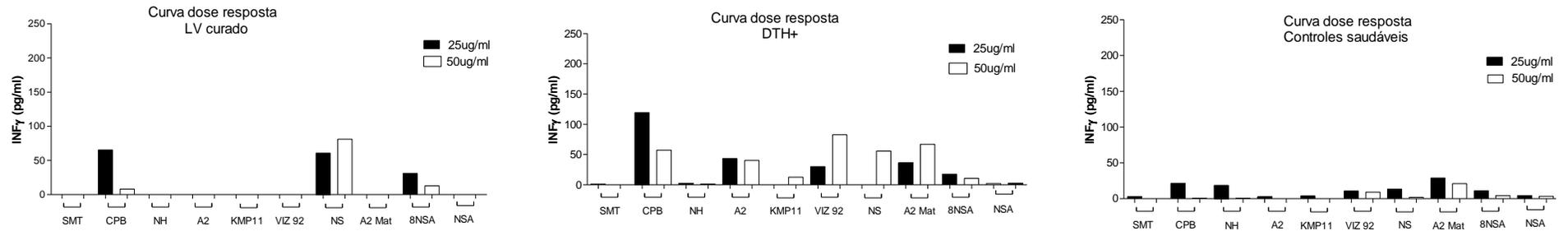
Destacamos que houve correlação direta entre as concentrações de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em resposta ao estímulo CPB nos grupos LV ativa e DTH+ (Fig. 5) ( $r$  de Spearman =  $0,63$ ;  $p= 0,0028$ ).

### 5.3.3 Produção de IL-10

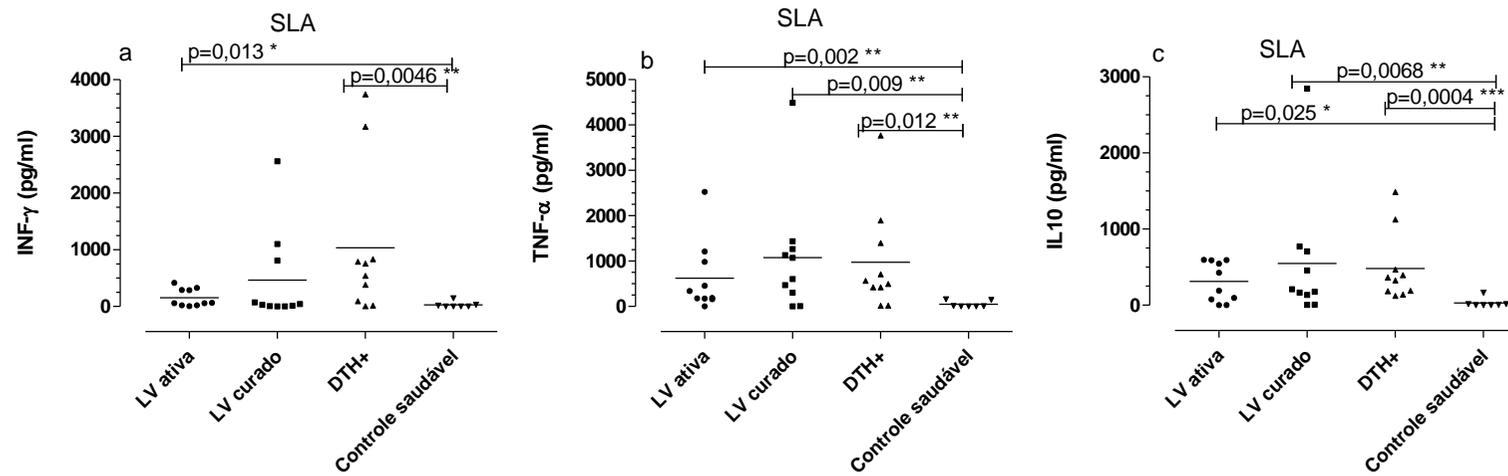
Quando o anel de células mononucleares do sangue periférico foi estimulado com o antígeno CPB (Fig. 4c) observamos produção significativa da citocina regulatória no grupo DTH+ ( $452 \pm 463$  pg/ml;  $p= 0,043$ ) se comparado ao grupo LV ativa ( $158 \pm 277$  pg/ml).

No tocante ao antígeno VIZ92 (Fig. 6c) também é possível observar produção significativa no grupo mais protegido DTH+ ( $565 \pm 534$  pg/ml;  $p= 0,018$ ) em relação ao grupo LV ativa ( $174 \pm 294$  pg/ml).

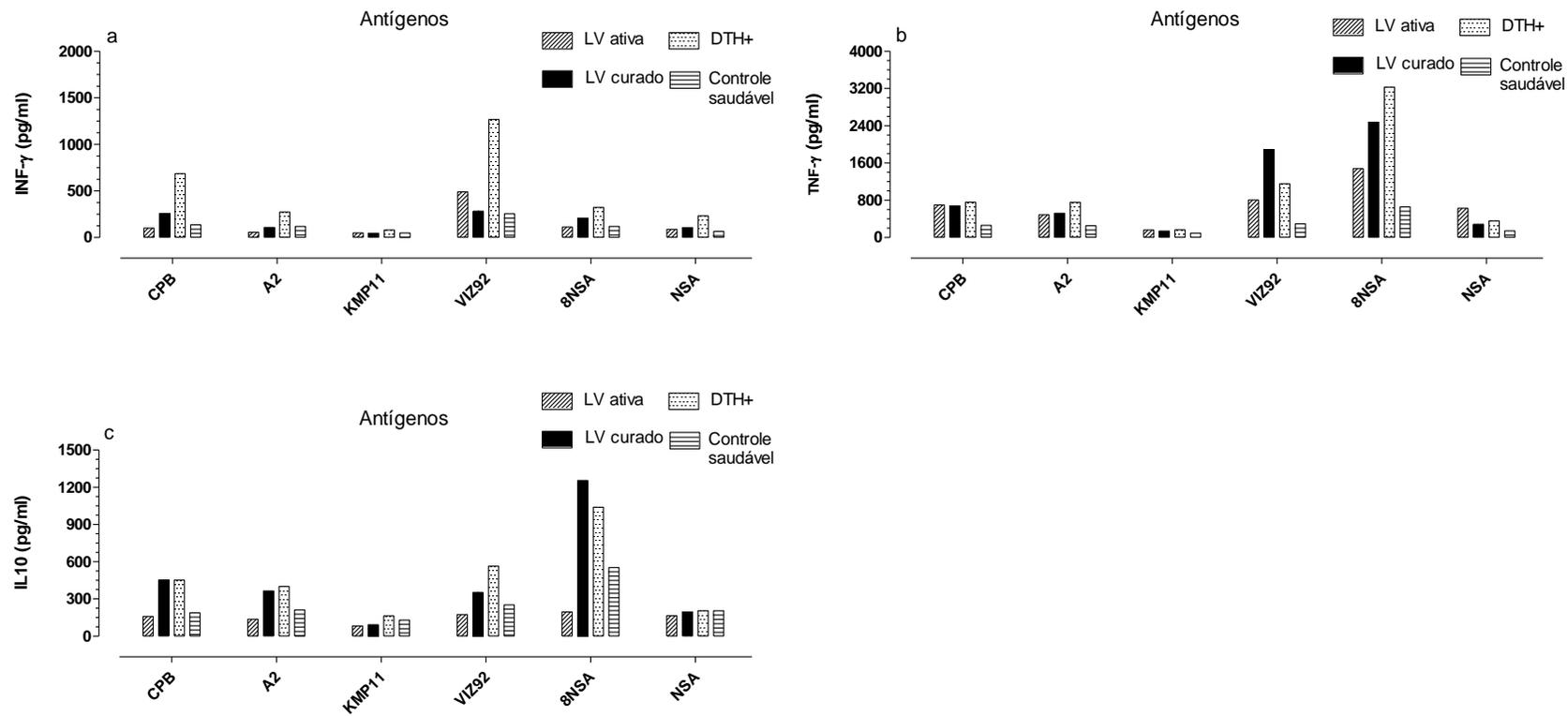
Em relação ao antígeno 8NSA (Fig. 7c), visualizamos produção significativa no grupo DTH+ ( $1039 \pm 509$  pg/ml;  $p=0,0002$ ), LV curado ( $1255 \pm 1714$  pg/ml;  $0,0021$ ) e controle saudável ( $553 \pm 446$  pg/ml;  $p= 0,033$ ) em relação ao grupo LV ativa ( $195 \pm 208$  pg/ml).



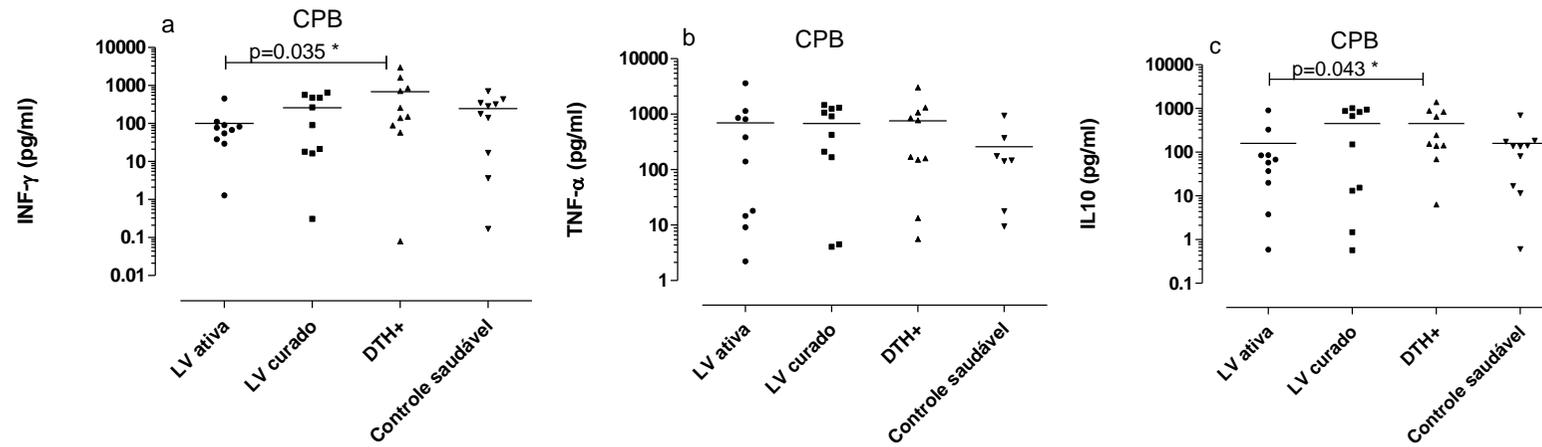
**Figura 1.** Curva dose resposta representativa de concentrações nos grupos LV curado (n=03) e DTH+ (n=03) e controles saudáveis (n=03), Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25µg/ml e 50 µg/ml de antígenos afim dar continuidade aos experimentos com concentração final de 25 µg/ml. Os sobrenadantes foram colhidos pós 72 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> para a dosagem de INF-γ por ELISA.



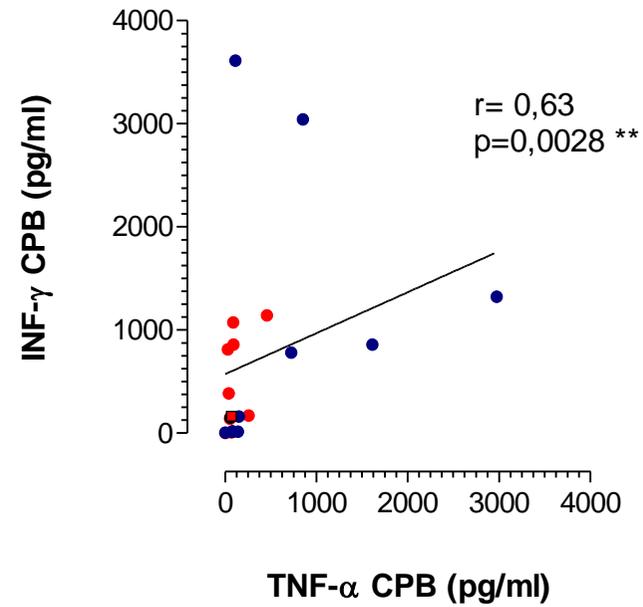
**Figura 2.** Produção de citocinas ao SLA nos grupos LV ativa (n=10), LV curado (n=10), DTH+ (n=10) e controle saudável (n=07), Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 10 $\mu$ g/ml de antígeno solúvel de *L. donovani*. Os sobrenadantes foram colhidos pós 72 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> para a dosagem por Luminex de INF- $\gamma$  (a), TNF- $\alpha$  (b) e IL-10 (c). Os valores de  $p$  foram determinados por diferenças entre os grupos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. \* indica  $p<0,05$ , \*\*  $p<0,01$ , \*\*\*  $p<0,001$ .



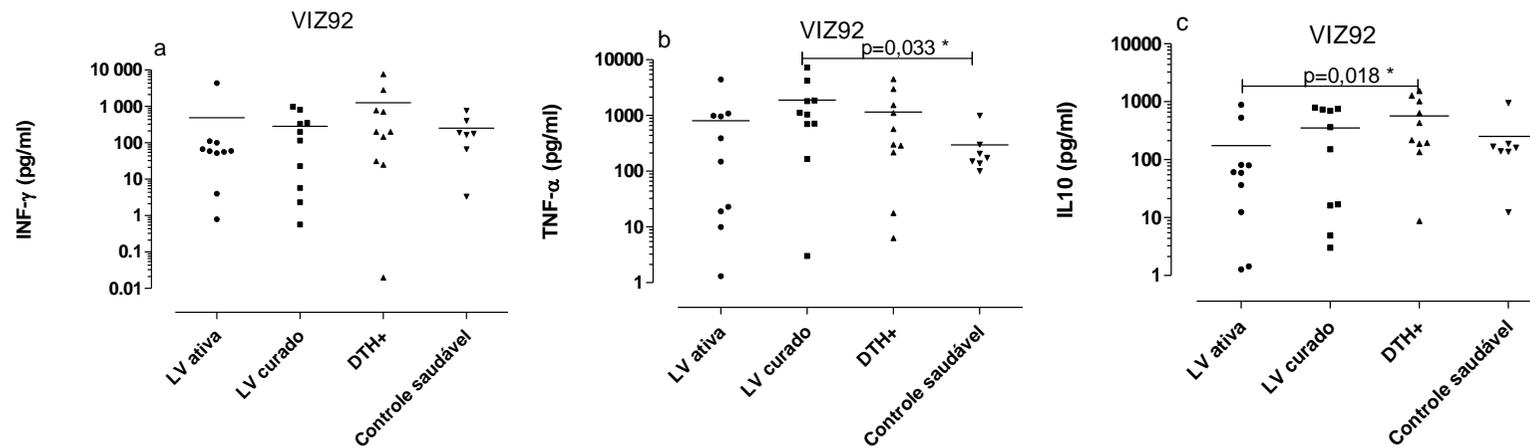
**Figura 3.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa (n=10), LV curado (n=10), DTH+ (n=10) e controle saudável (n=07), Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25 $\mu$ g/ml com antígenos recombinantes. Os sobrenadantes foram colhidos pós 72 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> para a dosagem por Luminex de INF- $\gamma$  (a), TNF- $\alpha$  (b) e IL-10 (c).



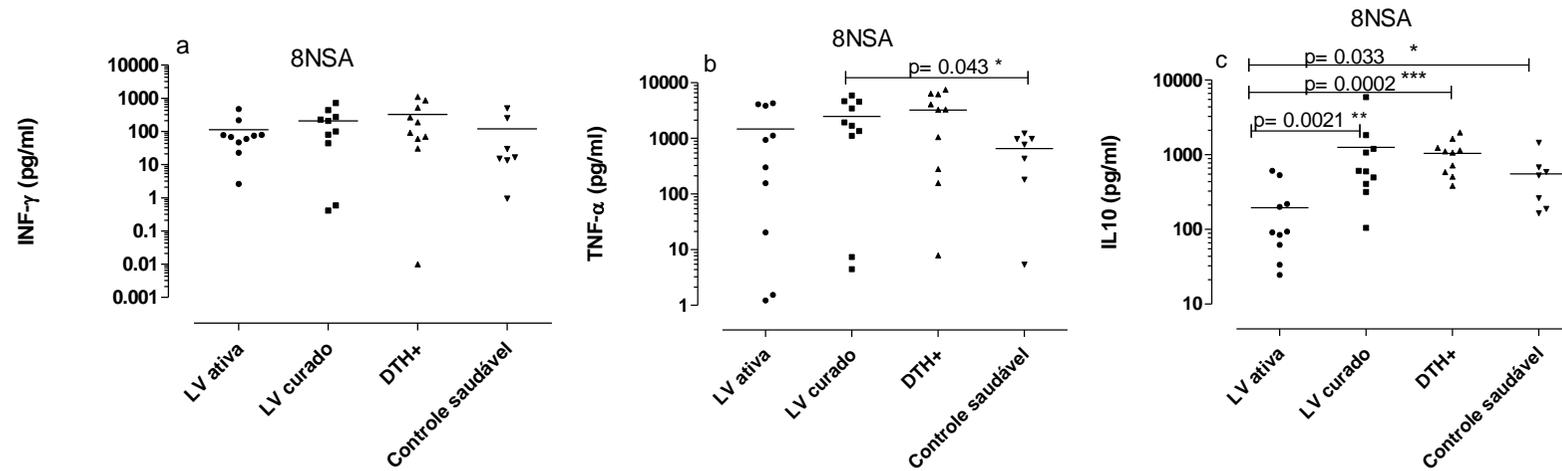
**Figura 4.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa (n=10), LV curado (n=10), DTH+ (n=10) e controle saudável (n=07), Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25µg/ml de antígeno CPB, Aracaju/SE. Os sobrenadantes foram colhidos pós 72 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> para a dosagem por Luminex de INF-γ (a), TNF-α (b) e IL-10 (c). Os valores de *p* foram determinados por diferenças entre os grupos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. \* indica *p*<0,05.



**Figura 5.** Correlação direta entre as concentrações de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  em células mononucleares em resposta ao estímulo do antígeno CPB no grupo LV ativa, n=10 (bolas vermelhas) e DTH+, n=10 (bolas azuis), Aracaju/SE. O valor de  $p$  foi determinado por diferenças entre os grupos pelo teste de correlação de Spearman. \*\* indica  $p < 0,01$



**Figura 6.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa (n=10), LV curado (n=10), DTH+ (n=10) e controle saudável (n=07), Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25 $\mu\text{g/ml}$  de antígeno VIZ92, Aracaju/SE. Os sobrenadantes foram colhidos pós 72 horas a 37°C/5% de  $\text{CO}_2$  para a dosagem por Luminex de  $\text{INF-}\gamma$  (a),  $\text{TNF-}\alpha$  (b) e IL-10 (c). Os valores de  $p$  foram determinados por diferenças entre os grupos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. \* indica  $p < 0,05$ .



**Figura 7.** Produção de citocinas nos grupos LV ativa (n=10), LV curado (n=10), DTH+ (n=10) e controle saudável (n=07), Aracaju/SE. Células do sangue periférico foram estimuladas com 25 $\mu$ g/ml de antígeno 8NSA, Aracaju/SE. Os sobrenadantes foram colhidos pós 72 horas a 37°C/5% de CO<sub>2</sub> para a dosagem por Luminex de INF- $\gamma$  (a), TNF- $\alpha$  (b) e IL-10 (c). Os valores de *p* foram determinados por diferenças entre os grupos pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. \* indica  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$ .

## 6 DISCUSSÃO

A análise dos antígenos que induzem resposta imune celular em indivíduos com proteção natural ou após tratamento e cura pode ser uma estratégia para identificar bons candidatos para imunoprofilaxia e/ou imunoterapia. Visando identificar citocinas produzidas em culturas de células de grupos de indivíduos caracterizados e estimuladas com antígenos recombinantes, que podem derivar diferentes respostas de células T, uma variedade de antígenos tem sido investigada na LV em modelos animais com resposta imunológica adaptativa protetora associado ao padrão Th1 (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011; GOTO *et al.*, 2007; GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006; ZANIN *et al.*, 2007; RAFATI *et al.*, 2005), mas poucos têm sido investigados em ensaios clínicos humanos (DUTHIE *et al.*, 2012; CHAKRAVARTY *et al.*, 2011).

Sendo assim, a proposta deste estudo foi avaliar a resposta imune em células mononucleares do sangue periférico estimulados aos antígenos recombinantes em quatro grupos de indivíduos caracterizados, a saber: LV ativa, LV curado, DTH+ e controles saudáveis. Nossa hipótese é que a resposta imune aos antígenos poderá identificar marcadores de doença ou antígenos indutores de resposta protetora.

Em nosso ensaio os sujeitos curados frente ao SLA, juntos, produziram ambas as citocinas pró-inflamatórias (INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ), e esse padrão de sinergismo é capaz de induzir a morte dos parasitos de *Leishmania* em macrófagos humanos (GANNTT *et al.*, 2001) e esta capacidade de expressar simultaneamente as citocinas pode ser benéfico contra novas infecções. Nesse grupo, na proporção que produziram INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  também secretaram a IL-10 em resposta ao SLA, que geralmente associa-se à supressão imune durante a doença, regulando negativamente a resposta Th1 (GHALIB *et al.*, 1993). A produção de INF- $\gamma$  em indivíduos curados indica que as células T de memória circulantes foram estimuladas durante a doença.

Ainda em relação ao SLA, os indivíduos com LV ativa induziram resposta ao INF- $\gamma$  pois distingue-se significativamente do controle sadio. Os indivíduos saudáveis que responderam ao SLA a provável explicação seria a reatividade cruzada das células de memória, respostas inespecíficas aos antígenos pois não incluímos controles não-endêmicos em nosso estudo. Estudos prévios observam falha na liberação de INF- $\gamma$  pós estimulação em CMSP, pela técnica do ELISA, nesse grupo populacional (CARVALHO *et al.*, 1985; NYLEN *et al.*, 2007) e esta anergia poderia ser a principal

razão de susceptibilidade. Recentemente, ensaios de QuantiFERON no sangue total (GIDWANI *et al.*, 2011) demonstrou altos níveis de INF- $\gamma$  nos pacientes com LV ativa.

No nosso desenho experimental encontramos produção de INF- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10 quando em diferentes estímulos, inclusive em indivíduos mais protegidos (LV curado e DTH+) ainda que análises mais aprofundadas de uma única célula utilizando a técnica de citometria de fluxo é necessária afim de resolver padrões de expressão de citocinas em células T.

Em nossa análise nenhum dos grupos apresentaram refratariedade na resposta quando estimulados, ao menos que isoladamente um ou outro indivíduo apresentou irresponsividade. Em estudos variados os antígenos SMT, CPB, NH, A2, KMP-11 em modelos animais revelaram-se protetores contra a LV (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011; GOTO *et al.*, 2007; GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006; ZANIN *et al.*, 2007). No grupo de indivíduos curados, Kumar *et al* (2010) mostrou que os antígenos SMT, CPB, A2 e NH estimularam a produção de INF- $\gamma$  se comparado ao KMP-11 que apresentou déficit em produzir respostas positivas, ou seja, os indivíduos foram refratários ao estímulo. A deficiência de respostas do padrão Th1 pode ser devido à ineficiência dos antígenos solúveis, em *ex vivo*, para as células T CD8+ (KOVACSOVICS-BANKOWSKI *et al.*, 1993).

No presente estudo, a dose empregada de antígenos (25 $\mu$ g/ml) sugere que o ensaio foi eficiente e imparcial à detecção de respostas para antígenos de células T CD8+ citotóxicas. O perfil de doses utilizadas em modelos animais mostra uma variabilidade de respostas entre 10 $\mu$ g/ml e 44  $\mu$ g/ml com proteínas empregadas neste presente estudo (revisado em JOSHI *et al*, 2014). Estudos anteriores em sujeitos humanos os autores sugerem que a dose de antígenos recombinantes usada (10 $\mu$ g/ml) pode ser a causa de respostas indetectáveis. Nesse mesmo estudo, os autores indicam que a as respostas foram indetectáveis devido à dose usada (10 $\mu$ g/ml) e que, portanto, deveria ser aumentada (KUMAR *et al*, 2010).

Neste estudo piloto, analisando os antígenos capazes de exibir resposta imune protetora em indivíduos DTH+ destacamos o CPB, VIZ92 e 8NSA ainda que a produção de INF- $\gamma$  não seja proeminente mas a associação com TNF- $\alpha$  é um resultado promissor mesmo que acompanhados de produção de IL-10. Rafati e colaboradores (2006) demonstraram que a co-injeção de dois genes que expressam a cisteína proteinase Tipo I (CPb) e Tipo II (CPa) induziu uma resposta protetora e duradoura em

cães contra a infecção por *L. infantum*. Análises em uma população de área endêmica na Índia e Brasil utilizando 11 antígenos, diferentes dos que utilizamos em nosso estudo, com sangue total de pacientes com LV ativa, curados e controles endêmicos saudáveis positivos e negativos, os resultados mostram um balanço de citocinas pro-inflamatórias (INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) e inclusive a produção de IL-10. Esses dados apontam que 5/11 antígenos possam ser utilizados como candidatos vacinais (STOBER *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2012). Ponderamos que esses dados poderão ser representativos, numa área endêmica para *L. infantum chagasi* do nordeste do Brasil, onde observamos antígenos que quando estimulados são produtores de INF- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  em indivíduos protegidos. Frisa-se aqui que dentre os antígenos que ainda não foram referenciados na literatura em ensaios *in vitro* com pacientes de LV (VIZ92, NS, A2MAT, 8NSA e NSA), o VIZ92 e o 8NSA parecem ser bons preditores de proteção.

Frisamos que ao estímulo do CPB a produção de INF- $\gamma$  foi significativa em indivíduos naturalmente resistentes se comparado ao grupo com doença aguda, após 72 horas de estímulo, e que houve correlação entre a produção de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , sugerindo uma ativação de células da resposta imune Th1 no grupo com a forma aguda da doença assim como em indivíduos com proteção natural.

Na tentativa de explicar a variabilidade em resposta aos diferentes antígenos especulamos que pode ser um reflexo do tamanho da amostra, história de exposição, e/ou disparidades nos alelos HLA para os epítomos de ligação do MHCII dos distintos antígenos para enfim serem reconhecidos pelos receptores de células T (TCRs) dos indivíduos. Assim, proteínas imunogênicas são assim denominadas por possuírem epítomos de HLA que são reconhecidos por células T. Porém, se as proteínas apresentam peptídeos que se ligam a várias formas alélicas de MHC não significa que serão reconhecidos pelos TCRs. Por extensão, é possível supor que as proteínas imunogênicas e indutoras de resposta imune celular específica sejam menos imunogênicas em outras populações devido a diferenças étnicas e/ou genéticas. Sendo assim, diversas populações podem responder de forma diferenciada a uma determinada proteína provavelmente devido a diversidades alélicas de HLA.

Assim como isoladamente observamos proteção entre os antígenos avaliados nesse estudo, o complexo de multiepítomos poderá ser ainda mais eficiente. É possível supor essa análise com base em um estudo formulado pela fusão do KSAC composto por KMP-11, SMT, A2 e CPB sendo que cada componente desta proteína foi capaz de conferir proteção individualmente na doença (RAFATI *et al.*, 2005; BASU *et al.*, 2005;

GOTO *et al.*, 2007; GOTO *et al.*, 2009; GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001; RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006). Os autores sugerem ser possível produzir uma vacina prática com custo-efetividade capaz de proteger humanos e cães contra múltiplas espécies de *Leishmania* (GOTO *et al.*, 2011).

Salienta-se que mais estudos são necessários afim de avaliar cuidadosamente as diferenças de respostas e associação entre o balanço de citocinas para cada antígeno nos grupos avaliados e como proporcionam proteção (GURUNATHAN *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2011), visto que este é preliminar pelo número limitado de indivíduos.

Resultados do nosso estudo demonstrou que alguns antígenos individualmente têm sido mostrados como protetores assim como em modelos animais. Isto sugere que para uso em humanos poderá ser um complexo multi-epítomos de antígenos. Ao avaliar a resposta imune, os dados apresentados aqui numa área endêmica para *L. infantum chagasi* do nordeste do Brasil, aliado ao aumento do número de indivíduos e em colaboração com estudos empregando os mesmos antígenos melhor evidenciarão os considerados protetoras. De fato, a avaliação da resposta imune de indivíduos com calazar e naturalmente resistentes poderá identificar antígenos indutores de IFN- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  potencialmente protetores à infecção, assim como antígenos que suprimem a produção de IFN- $\gamma$ , os quais podem ser potencialmente utilizados com adjuvantes que modifiquem essa resposta. Dessa forma, esse estudo contribuirá para um melhor entendimento do papel desses antígenos e trará subsídios para o desenvolvimento de alternativas imunoproláticas e/ou imunoterapêuticas.

## **7 CONCLUSÕES**

- Observamos concentração elevada de INF- $\gamma$  e/ou TNF- $\alpha$  acompanhados de resposta ao IL-10 em indivíduos mais protegidos em resposta ao estímulo dos antígenos: CPB, VIZ92 e 8NSA;
- Destacamos que em relação ao antígeno CPB tem-se concentração significativa de INF- $\gamma$  no grupo DTH+ se comparado ao grupo LV ativa e correlação direta entre as concentrações de INF- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  entre estes grupos;
- Sugerimos que os antígenos CPB, VIZ92 e 8NSA possam estar associados à indução de resposta protetora e ser promissores para utilização em imunoterapia e imunoprofilaxia;

## **8 PERSPECTIVAS**

- Avaliar a multifuncionalidade celular da resposta imunológica aos antígenos mais promissores

## REFERÊNCIAS

AEBISCHER, T., WOLFRAM, M., PATZER, S. I., ILG, T., WIESE, M., AND OVERATH, P. Subunit vaccination of mice against new world cutaneous leishmaniasis: comparison of three proteins expressed in amastigotes and six adjuvants. **Infect. Immun.** 2000;68(3):1328–1336.

AEBISCHER, T. Leishmania spp. proteome data sets: a comprehensive resource for vaccine development to target visceral leishmaniasis. **Frontiers Immunology.** 2014;260(5).

AGALLOU, M., MARGARONI, M., AND KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infantum* KMP-11 and CpG oligonucleotides induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine.** 2011;29(31):5053-64.

ALVAR, J., VÉLEZ, I. D., BERN, C., HERRERO, M., DESJEUX, P., CANO, J., JANNINI, J., BOER, M. D. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One.** 2012; 35671(7):1-12.

ANSARI, N. A., KUMAR, R., GAUTAM, S., NYLÉN, S., SINGH, O. P., SUNDAR, S., SACKS, D. IL-27 and IL-21 Are Associated with T Cell IL-10 Responses in Human Visceral Leishmaniasis. **J. Immunol.** 2011;186(7):3977–3985.

BADARO, R., FALCOFF, E., BADARO F. S., CARVALHO, E. M., PEDRAL-SAMPAIO, D., BARRAL, A., CARVALHO, J. S., BARRAL-NETTO, M., BRANDELY, M., SILVA, L., BINA, J. C., TEIXEIRA, R., FALCOFF, R., ROCHA, H., HO, J. L., JOHNSON, W. D. JR. Treatment of visceral leishmaniasis with pentavalent antimony and interferon gamma. **N. Engl. J. Med.** 1990;322:16–21.

BARRETO, M. L., TEIXEIRA, M. G., BASTOS, F. I., XIMENES R. A. A., BARATA R. B., RODRIGUES L. C. Sucessos e fracassos no controle de doenças infecciosas no Brasil: o contexto social e ambiental, políticas, intervenções e necessidades de pesquisa. **The Lancet.** 2011;Séries.

BASU, R., *et al.* 2005. Kinetoplastid membrane protein-11 DNA vaccination induces complete protection against both pentavalent antimonial-sensitive and -resistant strains of *Leishmania donovani* that correlates with inducible nitric oxide synthase activity and IL-4 generation: evidence for mixed Th1- and Th2-like responses in visceral leishmaniasis. **J. Immunol.** 174:7160–7171.

BOGDAN, C., MOLL, H., SOLBACH, W., ROLLINGHOFF, M. Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **Eur. J. Immunol.** 1990;20(5):1131–1135.

BUATES, S., MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **J. Infect. Dis.** 1999;179(6):1485–1494.

BUXBAUM, L., SCOTT, P. Interleukin 10- and Fcc Receptor-Deficient Mice Resolve *Leishmania mexicana* Lesions. **Infect. Immun.** 2005;73(4):2101–2108.

CARVALHO, M. E., BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., BARRAL-NETTO, M., BADARO, R., ROCHA, H., JOHNSON, JR W. D. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania (donovani) chagasi*. **J Infect Dis.**1992;165(3):535–40.

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

CHAKRAVARTY, J., SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.** 2010;2(2):167–176.

CHAKRAVARTY, J., KUMAR, S., TRIVEDI, S., RAI, V. K., SINGH, A., *et al.* A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine.** 2011;29:3531–3537.

CHAPPUIS F., SUNDAR S., HAILU A., GHALIB ,H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J., BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology.** 2007;5(11):873-82.

CHHAJER, R., ALI, N. Genetically modified organisms and visceral leishmaniasis. **Frontiers in immunology.** 2014;(5):213.

COLER, R. N., GOTO, Y., BOGATZKI, L., RAMAN, V., REED, S. G. Leish-111f, a recombinant polyprotein vaccine that protects against visceral leishmaniasis by elicitation of CD4+ T cells. **Infect. Immun.** 2007;75(9):4648–4654.

COLER, R. N., REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitol.** 2005;21(5):244–249.

DIDIERLAURENT, A. M., MOREL, S., LOCKMAN, L., GIANNINI, S. L., BISTEAU, M., CARLSEN, H., KIELLAND, A., VOSTERS, O., VANDERHEYDE, N., SCHIAVETTI, F., LAROCQUE, D., VANMECHELEN, M., GARÇON, N. AS04, an alu- minumsalt- and TLR4 agonist-based adjuvant system, induces a transient localized innate immune response leading to enhanced adaptive immunity. **J. Immunol.** 2009;183(10):6186–6197.

DUTHIE, M. S., WINDISH, H. P., FOX, C. B., REED, S. G. Use of defined TLR ligands as adjuvants within human vaccines. **Immunol. Rev.** 2011;239(1):178–196.

DUTHIE M. S., RAMAN V. S., PIAZZA F. M., REED S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine.** 2012;30:134–141.

FLANDIN, J. F., CHANO, F., DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- gamma-primed macrophages. **Eur. J. Immunol.** 2006;36(2):411–420.

GANNAVARAM, S., DEY, R., KUMAR, A., SELVAPANDIYAN A., SALOTRA, P., NAKHASI H. L. Biomarkers of safety and immune protection for genetically modified live attenuated *Leishmania* vaccines against visceral leishmaniasis – discovery and implications. **Front Immunol.** 2014;241(5).

GANTT, K. R., GOLDMAN, T. L., MCCORMICK, M. L., MILLER, M. A., JERONIMO, S. M., NASCIMENTO, E. T., BRITIGAN, B. E., WILSON, M. E. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol.** 2001;167: 893 – 901.

GASSER, R. A. JR., MAGILL, A. J., OSTER, C. N., FRANKE, E. D., GROGL, M., BERMAN, J. D. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.** 1994;18(1):83–90.

GAUTAM, S., KUMAR, R., MAURYA, R., NYLÉN, S., ANSARI, N., RAI, M., SUNDAR, S., SACKS, D. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **J Infect Dis.** 2011;204(7):1134–7.

GHOSH, A., ZHANG, W. W., MATLASHEWSKI, G. Immunization with A2 protein results in a mixed Th1/Th2 and a humoral response that protects mice against *Leishmania donovani* infections. **Vaccine.** 2001;20(1-2):59–66.

GHOSH, M., PAL, C., RAY, M., MAITRA, S., MANDAL, L., BANDYOPADHYAY, S. Dendritic cell-based immunotherapy combined with antimony-based chemotherapy cures established murine visceral leishmaniasis. **J Immunol.** 2003;170(11):5625–9.

GOTO, Y., BOGATZKI, L. Y., BERTHOLET, S., COLER, R. N., AND REED, S. G. Protective immunization against visceral leishmaniasis using *Leishmania* sterol 24-c-methyltransferase formulated in adjuvant. **Vaccine.** 2007;25(42):7450– 7458.

GOTO, Y., BHATIA, A., RAMAN, V. S., LIANG, H., MOHAMATH, R., PICONE, A. F., VIDAL, S. E., VEDVICK, T. S., HOWARD, R. F., REED, S. G. KSAC, the first defined polyprotein vaccine candidate for visceral leishmaniasis. **Clin. Vaccine Immunol.** 2011;18(7):1118–24.

GREENBLATT, C. L. The present and future of vaccination for cutaneous leishmaniasis. **Prog. Clin. Biol. Res.** 1980;47:259–285.

GIDWANI, K., JONES, S., KUMAR, R., BOELAERT, M., SUNDAR, S. Interferon-gamma release assay (modified Quantiferon) as a potential marker of infection for *Leishmania donovani*, a proof of concept study. **PLoS Negl Trop Dis.** 2011;5: e1042.

GURUNATHAN, S., PRUSSIN, C., SACKS, D. L., SEDER, R. A. Vaccine requirements for sustained cellular immunity to an intracellular parasitic infection. **Nat Med.** 1998;4:1409–1415.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: current status of vaccine development. **Clin. Microbiol. Rev.** 2001;14(2):229–243.

HEMMI, H., KAISHO, T., TAKEUCHI, O., SATO, S., SANJO, H., HOSHINO, K., HORIUCHI, T., TOMIZAWA, H., TAKEDA, K., AKIRA, S. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7/MyD88-dependent signaling pathway. **Nat. Immunol.** 2002;3(2):196–200.

HEMMI, H., TAKEUCHI, O., KAWAI, T., KAISHO, T., SATO, S., SANJO, H., MATSUMOTO, M., HOSHINO, K., WAGNER, H., TAKEDA, K., AKIRA, S. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. **Nature.** 2000;408(6813):740–745.

JOSHI, S., RAWAT, K., YADAV, N. K., KUMAR, V., SIDDIQI, M. I., DUBE, A. Visceral leishmaniasis: advancements in vaccine development via classical and molecular approaches. **Front Immunol.** 2014;22(5):380-17.

KOVACSOVICS-BANKOWSKI, M., CLARK, K., BENACERRAF, B., ROCK, K. L. Efficient major histocompatibility complex class I presentation of exogenous antigen upon phagocytosis by macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA.** 1993;90: 4942 – 4946 .

KHADEM, F., UZONNA, J. E. Immunity to visceral leishmaniasis: implications for immunotherapy. **Future microbiology.** 2014;9:901-15.

KUMAR R., ENGWERDA C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical Translational Immunology.** 2014;13(3).

KUMAR R., GOTO Y., GIDWANI K., COWGILL K. D., SUNDAR S., REED S. G. Evaluation of Ex Vivo Human Immune Response against Candidate Antigens for a Visceral Leishmaniasis Vaccine. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2010; 82(5).

LAINSON, R., SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: Peters W, Killick-Kendrick R, editors. The leishmaniasis in biology and medicine. London: **Academic Press.** 1987:1–120.

LIU, H., ROHOWSKY-KOCHAN, C. Interleukin-27-mediated suppression of human Th17 cells is associated with activation of STAT1 and suppressor of cytokine signaling protein 1. **J Interferon Cytokine Res.** 2011;31(5): 459–469.

MANETTI, R., PARRONCHI, P., GIUDIZI, M. G., PICCINNI, M. P., MAGGI, E., TRINCHIERI, G., ROMAGNANI, S. Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4- producing Th cells. **J. Exp. Med.** 1993;177(4):1199–1204.

MATOUSSI, N., AMEUR, H. B., AMOR, S. B., FITOURI, Z., BECHER, S. B. Cardiotoxicity of n- methyl-glucamine antimoniate (Glucantime). A case report. **Med. Mal. Infect.** 2007;37(3):257-9.

MCGWIRE, B. S., SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **Q. J. Med.** 2014; 107(1):7–14.

MEHROTRA, S., OOMMEN, J., MISHRA, A., SUDHARSHAN, M., TIWARY, P., JAMIESON, S. E., FAKIOLA, M., RANI, D. S., THANGARAJ, K., RAI, M., SUNDAR, S., AND BLACKWELL, J. M. No evidence for association between SLC11A1 and visceral leishmaniasis in India. **BMC Med. Genet.** 2011;12(4):71.

METZGER, D.W. Interleukin-12 as an adjuvant for induction of protective antibody responses. **Cytokine.** 2010;52(1-2):102–107.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Leishmaniose visceral. Brasília (Distrito Federal): **Ministério da Saúde.** 2013.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Sinan Net. (2014). Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinannet/leishvi/bases/leishvbrnet.def>. Acesso em: 08/09/2014.

MOLDOVEANU, Z., LOVE-HOMAN, L., HUANG, W. Q., KRIEG, A. M. CpG DNA, a novel immune enhancer for systemic and mucosal immunization with influenza virus. **Vaccine.** 1998;16(11-12):1216-1224.

MUKHERJEE, A. K., GUPTA, G., ADHIKARI, A., MAJUMDER, S., KAR MAHAPATRA, S., BHATTACHARYYA MAJUMDAR, S., MAJUMDAR, S. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis: role of TLR4 and TLR9. **Int. Immunopharmacol.** 2012;12(4):565–572.

NAKAMURA, K., KITANI, A., FUSS, I., PEDERSEN, A., HARADA, N., NAWATA, H., STROBER, W. TGF-beta 1 plays an important role in the mechanism of CD4+ CD4+ CD25+ regulatory T cell activity in both humans and mice. **J. Immunol.** 2004;172(2):834–842.

NYLÉN, S., KUMAR, R. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Front. Immunol.** 2012;3:251.

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

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

OSTYN, B., GIDWANI, K., KHANAL, B., PICADO, A., CHAPPUIS, F., SINGH, S. P., RIJAL, S., SUNDAR, S., BOELAERT, M. Incidence of symptomatic and asymptomatic *Leishmania donovani* infections in high-endemic foci in India and Nepal: a prospective study. **Plos Negl. Trop. Dis.** 2011;10(5):1-7.

OZBILGE, H., AKSOY, N., GUREL, M. S., YAZAR, S. IgG and IgG subclass antibodies in patients with active cutaneous leishmaniasis. **J. Med. Microbiol.** 2006;55(10), 1329–31.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, WHO. Leishmaniasis: Eoidemiological Report of the Americas. Washington, D.C.: Pan American Health Organization, World Health Organization. 2014. Acesso em: 08/09.

PAUN, A., BANKOTI, R., JOSHI, T., PITHA, P. M., STAGER, S. Critical role of IRF-5 in the development of T helper 1 responses to *Leishmania donovani* infection. **PLoS Pathog.** 2011;7(1):e1001246.

RAFATI, S., ZAHEDIFARD, A., NAZGOUEE F. Prime-boost vaccination using cysteine proteinases type I and II of *Leishmania infantum* confers protective immunity in murine visceral leishmaniasis. **Vaccine.** 2006;24(12):2169–2175.

RAFATI, S., NAKHAEI, A., TAHERI, T., TASLIMI, Y., DARABI, H. Protective vaccination against experimental canine visceral leishmaniasis using a combination of DNA and protein immunization with cysteine proteinases type I and II of *L. infantum*. **Vaccine.** 2005;23:3716–3725.

RAI, A. K., THAKUR, C. P., SINGH, A., SETH, T., SRIVASTAVA, S. K., SINGH, P., MITRA D. P. Regulatory T Cells Suppress T Cell Activation at the Pathologic Site of Human Visceral Leishmaniasis. **Plos ONE.** 2012;7(2).

RAMAN V. S., DUTHIE M. S., FOX C. B., MATLASHEWSKI G., REED S. G. Adjuvants for Leishmania vaccines: from models to clinical application. **Frontiers in Immunology.** 2012;(3):144.

REED, S. G., BERTHOLET, S., COLER, R. N., FRIEDE, M. New horizons in adjuvants for vaccine development. **Trends Immunol.** 2009;30(1):23–32.

RYAN, J. R., SMITHYMAN, A. M., RAJASEKARIAH, G. H., HOCHBERG, L., STITELER, J. M., MARTIN, S. K. Enzyme-linked immunosorbent assay based on soluble promastigote antigen detects immunoglobulin M (IgM) and IgG antibodies in sera from cases of visceral and cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Microbiol.** 2002;40(3):1037–1043.

SINGH, O., GIDWANI, K., KUMAR, R., NYLÉN, S., JONES, S., BOELAERT, M., SACKS, D., SUNDAR, S. Reassessment of Immune Correlates in Human Visceral Leishmaniasis as Defined by Cytokine Release in Whole Blood. **Clin. Vaccine Immunol.** 2012;19(6):961–966.

SINHA, P. K, RODDY, P., PALMA, P. P., KOCIEJOWSKI, A., LIMA, M. A., RABI DAS, V. N., GUPTA, J., KUMAR, N., MITRA, G., SAINT-SAUVEUR, J. F., SEENA, S., BALASEGARAM, M., PARREÑO, F., PANDEY, K. Effectiveness and safety of liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis under routine program conditions in Bihar, India. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 2010;83(2):357–64.

SKEIKY, Y.A., KENNEDY, M., KAUFMAN, D., BORGES, M. M., GUDERIAN, J. A., SCHOLLER, J. K., OVENDALE, P. J., PICHA, K. S., MORRISSEY, P. J., GRABSTEIN, K. H., CAMPOS-NETO, A., REED, S. G. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **J. Immunol.** 1998;161(11):6171–6179.

SPOLSKI, R., KIM, H. P., ZHU, W., LEVY, D. E., LEONARD, W. J. IL-21 Mediates Suppressive Effects via Its Induction of IL-10. **J. Immunol.** 2009;182(5):2859–2867.

STOBER, C. B., JERONIMO, S. M. B., PONTES, N. N., MILLER, E. N., BLACKWELL, J. M. Cytokine responses to novel antigens in a peri-urban population in Brazil exposed to *Leishmania infantum chagasi*. **Am J Trop Med Hyg.** 2012;87(4):663-670.

SUNDAR, S., MURRAY, H. W. Effect of treatment with interferon-gamma alone in visceral leishmaniasis. **J. Infect. Dis.** 1995;172(6):1627–9.

SUNDAR, S., OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. **Ther. Clin. RiskManag.** 2007;3(5):733–40.

SYPEK, J. P., CHUNG, C. L., MAYOR, S. E., SUBRAMANYAM, J. M., GOLDMAN, S. J., SIEBURTH, D. S., WOLF, S. F., AND SCHAUB, R. G. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **J. Exp.Med.** 1993;177(6):1797–1802.

TITUS, R. G., GUEIROS-FILHO, F. J., DE FRE-ITAS, L. A., BEVERLEY, S. M. Development of a safe live *Leishmania* vaccine line by gene replacement. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** 1995;92(22):10267–10271.

TOQEER, M., RAHMAN, N., WHITEHEAD, M. W., LOCKWOOD, D. Visceral leishmaniasis in immunosuppressed Caucasian patient. **BMJ Case Rep.** 2012;1-4.

WAGNER, T. L., AHONEN, C. L., COUTURE, A. M., GIBSON, S. J., MILLER, R. L., SMITH, R. M., REITER, M. J., VASILAKOS, J. P., AND TOMAI, M. A. Modulation of TH1 and TH2 cytokine production with the immune response modifiers, R-848 and imiquimod. **Cell. Immunol.** 1999;191(1):10–19.

WOLDAY, D., BERHE, N., BRITTON, S., AKUFFO, H. HIV-1 alters T helper cytokines, interleukin-12 and interleukin-18 responses to the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **AIDS.** 2000;14(8): 921–929.

YANG, Z., ZHANG, X., DARRAH, P. A., MOSSER, D. M. The regulation of Th1 responses by the p38 MAPK. **J. Immunol.** 2010;185(10):6205–6213.

ZAGHLOUL, I. Y., AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** 2004;98(8):793–800.

ZANIN, F. H., COELHO, E. A., TAVARES, C. A., MARQUES-DA-SILVA, E.A., COSTA, M. M., REZENDE, S. A., GAZZINELLI, R. T., FERNANDES, A. P. Evaluation of immune responses and protection induced by A2 and nucleoside hydrolase (NH) DNA vaccines against *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* experimental infections. **Microbes Infect.** 2007; 9(9):1070–7.

ZHANG, W. W., MATLASHEWSKI, G. Immunization with a Toll- like receptor 7 and/or 8 agonist vaccine adjuvant increases protective immunity against *Leishmania major* in BALB/c mice. **Infect. Immun.** 2008;76(8):3777–3783.

ZIMMERMANN, S., EGETER, O., HAUSMANN, S., LIPFORD, G. B., RÖCKEN, M., WAGNER, H., HEEG, K. CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. **J. Immunol.** 1998;160(8):3627-30

**APÊNDICE A**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
COMITÊ DE ÉTICA E PESQUISA  
CAMPUS DA SAÚDE PROF. JOÃO CARDOSO NASCIMENTO JR.  
Rua Cláudio Batista s/n, Didática V, Bairro Sanatório  
CEP: 49060-100 Aracaju/SE  
Fone: (79) 3218-1805  
E-mail: [cephu@ufs.br](mailto:cephu@ufs.br)

**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

Nome do Projeto: Avaliação Epidemiológica, Clínica e Imunológica de familiares de pacientes com Leishmaniose Visceral.

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

**Nº do Projeto:** \_\_\_\_\_

**Investigador Principal:** Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Este documento explica um estudo de pesquisa e pede a sua permissão para o(a) senhor(a) ou seu (sua) filho(a) participar desta pesquisa. Se o(a) senhor(a) for pai/mãe ou guardião de uma criança abaixo de 18 anos, que foi convidado a participar desta pesquisa, a palavra “você” neste documento se refere ao seu filho. Ao final da explicação, pediremos ao senhor(a) para assinar este documento, caso concorde em participar desta pesquisa.

**Convite e Objetivo:**

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar familiares de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral que foram ou são atendidos no Hospital Universitário. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os familiares desses pacientes serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento.

**Participação voluntária:** Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo no Hospital Universitário.

**Finalidade do estudo:** Identificar indivíduos assintomáticos que residem no mesmo ambiente de pacientes com leishmaniose visceral através da resposta ao teste de Montenegro e Sorologia positiva para *L. Chagasi*, avaliando também a prevalência desses indivíduos e também a resposta imune celular para antígenos recombinantes de *L Chagasi*.

**Confidencialidade:** Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

**Procedimento:** Será retirado por punção venosa, 20 ml de sangue, que ao deve levar a riscos para sua saúde, podendo apresentar dor discreta no local da punção. O teste de Montenegro será aplicado no seu braço e é o mesmo procedimento quando você toma uma vacina e também não é prejudicial para sua saúde.

**Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade:** O melhor conhecimento sobre o leishmaniose visceral poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença.

**Custos:** Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento para leishmaniose, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

**Esclarecimentos:** Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

**Consentimento:** Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasito que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre leishmaniose.

Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora
Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora
Nome/Assinatura da testemunha	Data	Hora

## APÊNDICE B

### FORMULÁRIO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES

Nome do Projeto: Avaliação Epidemiológica, Clínica e Imunológica de familiares de pacientes com Leishmaniose visceral.

NOME DO PACIENTE: \_\_\_\_\_

Nº do Projeto: \_\_\_\_\_

**Investigador Principal:** Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

#### Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar familiares de pacientes com diagnóstico de Leishmaniose visceral que foram ou são atendidos no Hospital Universitário. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os familiares desses pacientes serão convidados a participar do estudo. Caso os pais ou responsáveis decidam por sua participação no estudo, eles assinarão este consentimento.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico lhe fará exames que não causarão dor. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de uma colher de sopa) de seu braço, usando uma seringa e agulha. Algumas vezes, nós faremos um teste na pele, onde injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço, usando uma agulha fina.

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

**Esclarecimentos:** Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque

Pacheco de Almeida (Tel.: (79)8823-7244) ou Dra. Amélia Ribeiro de Jesus (Tel: (79) 8823-7245). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho,

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão do paciente

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Assinatura ou impressão do responsável

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Testemunha

\_\_\_\_\_ Data \_\_\_\_\_ hora \_\_\_\_\_

Investigador

## APÊNDICE C

### QUESTIONÁRIO

#### AVALIAÇÃO CLÍNICA E IMUNOLÓGICA DE FAMILIARES DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE VISCERAL

<b>CASO ÍNDICE:</b>	
<b>1. IDENTIFICAÇÃO DO FAMILIAR</b>	
NOME:	
APELIDO:	
RELAÇÃO COM CASO ÍNDICE: MÃE    PAI    IRMÃO/IRMÃ    TIO/TIA    AVÔ/AVÓ    OUTRO: _____	
ENDEREÇO:	
PONTO DE REFERÊNCIA:	
PRESENÇA DE ANIMAL NA RESIDÊNCIA <input type="checkbox"/> SIM <input type="checkbox"/> NÃO    Qual? _____	
Em caso de galinheiro, especificar a proximidade com a residência _____	
CIDADE:	TELEFONE:
BAIRRO:	IDADE:
DATA DE NASCIMENTO: ____/____/____	SEXO: M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/>
PROFISSÃO:	NATURALIDADE:

<b>2. ANAMNESE</b>			
	SIM	NÃO	Especificar o tempo
FEBRE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
FADIGA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
PERDA DE PESO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
NÁUSEAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
PALIDEZ	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
DIARRÉIA	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
MANIFESTAÇÕES HEMORRÁGICAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
OUTROS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

PRESENÇA DE ANIMAL NA RESIDÊNCIA:	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	QUAL: _____  Em caso de galinheiro, especificar a proximidade com a residência
PRESENÇA DE RESTOS DE MADEIRAS	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

### 3. EXAME FÍSICO:

Temperatura (°C) \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Palidez \_\_\_\_\_

Linfonodos

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Fígado

- Consistência \_\_\_\_\_
- Tamanho \_\_\_\_\_

Baço

- Consistência \_\_\_\_\_
- Tamanho \_\_\_\_\_

### 4. EXAMES LABORATORIAIS:

EXAMES	
Hemácias	
Hb	
Ht	
Plaquetas	
Leucócitos	
Neutrófilos	
Eosinófilos	
Monócitos	
Albumina	
Globulina	
Reação de Montenegro	
Sorologia para Calazar	

