

PERFIL DE CITOCINAS T_H1 E T_H2 EM PACIENTES COM *Leishmania guyanensis* NO NORTE DO BRASIL

Elaine Dias MELO¹
Antonia Maria Ramos FRANCO²
Thaís Tibery ESPIR³

¹Bolsista PIBIC/CNPq; ²Orientador CSAS/INPA; ³Co-orientador

INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecto-parasitária causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Cerca de 1,2 milhões de novos casos da doença são notificados por ano em todo o mundo (Gontijo e Carvalho 2003; Brasil 2007; Alvar *et al.* 2012). No Brasil, ocorrem sete espécies causadoras da LTA, sendo *Leishmania (Viannia) guyanensis* a de maior circulação no estado do Amazonas (MS 2007; Teixeira *et al.* 2013). As manifestações clínicas da doença são bastante variáveis, sendo as características do protozoário, do vetor e do hospedeiro os principais determinantes. Quanto ao hospedeiro, o estado do seu sistema imune e o perfil predominante da resposta é crucial para o estabelecimento, permanência e resolução da lesão. Sendo *Leishmania* um parasita intracelular obrigatório, a resposta imunológica mediada por células, representada pelo perfil T_H1, se torna um importante fator no curso da doença. Entretanto, o sistema imune atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. A geração de uma resposta imune adequada durante processo infeccioso é o ponto crucial para direcionar a progressão ou cura da doença (Carvalho *et al.* 2012). O IFN- γ é uma citocina essencial no perfil da resposta T_H1 devido a sua capacidade de aumentar o efeito microbicida dos fagócitos que levam a morte do parasita (Abbas *et al.* 2008). A IL-10 (interleucina-10) é uma citocina que possui como uma de suas principais funções inibir as células do perfil T_H1. Já a IL-4 induz a diferenciação das células para um perfil T_H2, direcionando assim para uma resposta imune humoral, que é ineficaz para a eliminação de patógenos intracelulares, como no caso das formas da LTA (Schwarz *et al.* 2013). Na infecção por *Leishmania* as citocinas desempenham importante papel na resolução e controle da doença (Carvalho *et al.* 2012), por isso é de suma importância averiguar o nível sérico destas no curso clínico antes e após o tratamento com o antimonial pentavalente, medicamento de primeira escolha determinado pelo Ministério da Saúde (MS 2007).

MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi realizado no laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA), submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do INPA sob número 006/2010. Foi realizado levantamento de dados clínico-epidemiológicos de 15 pacientes atendidos no município de Rio Preto da Eva/AM no período de 2010 a 2011 e que obtiveram diagnóstico positivo de LTA na forma cutânea causada por *L. (V.) guyanensis*. Foi utilizado o soro dos 15 pacientes antes (AT) e após (PT) tratamento com antimonial pentavalente e de 15 indivíduos não infectados (controle negativo = CN) para determinar os níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10. Foram considerados como critérios de inclusão: pacientes acima de 18 anos, com LTA forma cutânea e infectados por *L. (V.) guyanensis*; e de exclusão: sorologia positiva para HIV. Para dosagem das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 foi utilizada a técnica de citometria de fluxo CBA (Cytometric Bead Array) com o “Kit BDTM Human T_H1/T_H2 Cytokine” (BD®) seguindo as orientações descritas pelo fabricante. A análise estatística foi realizada utilizando o software *Graphpad Prism*® 6. Quando foram comparadas duas variáveis utilizou-se o teste de *Mann-Whitney*, e quando três o teste de *Kruskal-Wallis*.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dados clínico-epidemiológicos dos 15 pacientes do estudo estão relacionados na tabela 1. Do total de pacientes, nove eram do sexo masculino (60 %) e seis do sexo feminino (40 %) [figura 1], a média de idade foi 30 anos (18 a 58 anos) [figura 2], número de lesões 1,7 (um a oito), tempo de evolução das lesões 54 dias (10 a 150 dias) e tamanho das lesões 25 mm (10x08 a 60x60 mm).

Tabela 1. Dados clínico-epidemiológicos dos 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011.

Código da Amostra	Sexo	Idade (anos)	Ocupação	Tempo de Infecção (dias)	Número de Lesões	Tamanho da Lesão (mm)
MHOM/BR/10/IM5 637	F	31	bióloga	60	1	17x18
MHOM/BR/10/IM5 653	M	18	estudante	90	1	30x20
MHOM/BR/10/IM5 690	F	58	agricultora	60	1	17x18
MHOM/BR/10/IM5 692	F	30	auxiliar administrativo	15	2	60x60
MHOM/BR/10/IM5 694	M	29	caseiro	14	1	20x23
MHOM/BR/11/IM5 697	M	19	estudante	14	1	13x16
MHOM/BR/11/IM5 749	M	38	NR	30	1	17x14
MHOM/BR/11/IM5 772	M	26	agricultor, caseiro	120	1	10x08
MHOM/BR/11/IM5 773	M	30	agricultor	10	1	32x21
MHOM/BR/11/IM5 775	M	24	piscicultor	21	4	08x50
MHOM/BR/11/IM5 828	F	43	agricultora	150	1	11x08
MHOM/BR/11/IM5 869	M	24	agricultor, caseiro	60	8	60x60
MHOM/BR/11/IM5 874	F	23	dona de casa	120	1	80x14
MHOM/BR/11/IM5 875	M	49	policial militar	30	1	11x07
MHOM/BR/11/IM5 976	F	18	dona de casa	21	1	17x13

Legenda: Isolados: M mamífero, HOM *Homo sapiens*, BR país de origem (Brasil)/ano de isolamento/código original utilizado pelo INPA; Sexo: M masculino, F feminino, NR não relatado. Pacientes que apresentaram mais de uma lesão foi incluído o valor da lesão de maior tamanho (baseado em Naiff *et al.* 2009).

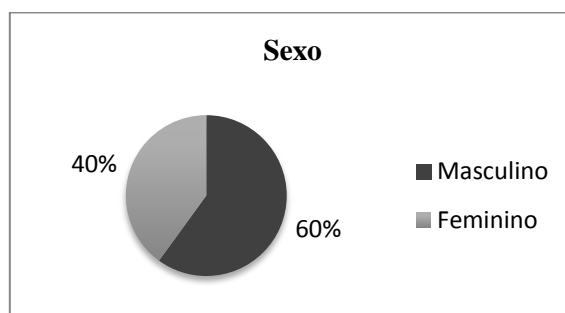


Figura 1. Distribuição por sexo dos 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011.

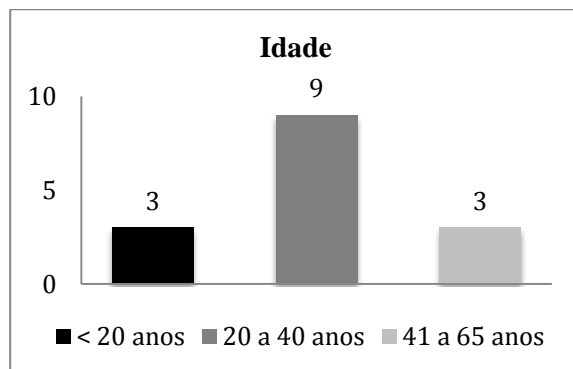


Figura 2. Distribuição por faixa etária dos 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011. Legenda: < 20 anos adolescente; 20 a 40 anos idade adulta jovem; 41 a 65 anos idade adulta média (baseado em Mosquera e Stobaus 1982).

Os hábitos dos pacientes foram classificados em dois grupos: (i) atividades na floresta: biólogo, agricultor, caseiro, piscicultor, policial militar e estudantes que auxiliam na agricultura; (ii) atividades sem relação com floresta: auxiliar administrativo e dona de casa. As ocupações referentes ao primeiro grupo corresponderam a 79% dos casos (figura 3), reafirmando a associação de hábitos em locais de mata fechada e alto risco de adquirir a infecção (Alvar *et al.* 2012).

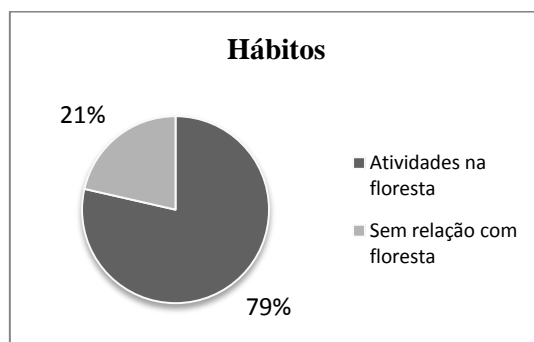


Figura 3. Hábitos dos 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011.

Os níveis de IFN- γ , IL-4 e IL-10 no soro dos 15 pacientes antes (AT) e após (PT) tratamento foram mais elevados quando comparados ao CN. As diferenças foram estatisticamente significativas, com $p < 0,0001$ em todas as análises (figura 4). Ao comparar AT e PT, não se observa uma grande variação nos níveis séricos das citocinas, mostrando que estas estão presentes nos períodos aqui estudados.

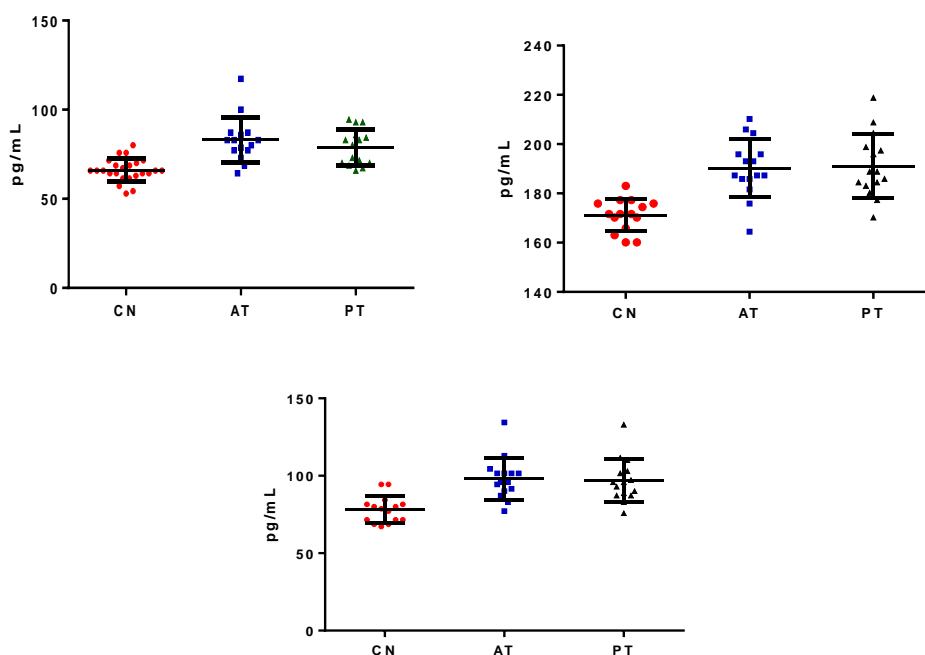


Figura 4. Níveis séricos das citocinas IFN- γ , IL-4 e IL-10 em 15 indivíduos sem infecção (CN) e 15 pacientes procedentes do município de Rio Preto da Eva/AM com diagnóstico de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma cutânea causada por *Leishmania (Viannia) guyanensis* nos anos de 2010 e 2011 antes (AT) e após (PT) tratamento com antimonial pentavalente.

Estudos vêm demonstrando que IFN- γ possui um importante papel na leishmaniose (Reis *et al.* 2006; Carvalho 2012). Kima e Soong (2013) afirmam a importância desta citocina no desenvolvimento e subsequente controle da infecção por *Leishmania*. Matta *et al.* (2009) demonstraram aumento da produção de IFN- γ em pacientes com *L. (V.) guyanensis* quando comparados com o controle negativo, entretanto inferior àqueles com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Estes autores sugerem uma provável correlação entre os níveis séricos de IFN- γ e as diferentes manifestações clínicas e resposta ao tratamento.

O papel da IL-10 como reguladora de linfócitos T_H1 vem sendo confirmado na literatura (Owens *et al.* 2012; Schwarz *et al.* 2013). Diversas células podem secretar esta citocina, dentre elas T_H2, T regulatórias (Treg) e T_H1. Schwarz *et al.* (2013) demonstraram recentemente que ao inibir a secreção de IL-10 por linfócitos T em camundongos BALB/c susceptíveis, estes se tornaram resistentes à infecção por *Leishmania*, demonstrando assim, a ação desta citocina no curso da infecção.

Em camundongos infectados por *Leishmania (Leishmania) major*, Kopf *et al.* (1996) demonstraram correlação entre IL-4 e a susceptibilidade a infecção. Recentemente, Hurdal e Brombacher (2014) sugeriram que esta citocina, dependendo da forma clínica da doença e do modelo de estudo experimental, pode atuar como mediador de resposta imune T_H1, promovendo resistência à infecção. O presente estudo demonstra a persistência de níveis de IL-4 superiores ao CN após a resolução clínica das lesões (PT).

CONCLUSÃO

Os níveis séricos das citocinas e o quadro clínico dos pacientes são bastante variáveis quando comparada a infecção por *L. (V.) guyanensis* com outras espécies de *Leishmania* (Espir 2013), sugerindo uma possível relação entre agente etiológico, mediadores da resposta imune e características clínicas das lesões. Conclui-se que na LTA causada por *L. (V.) guyanensis* há presença de perfil T_H1 e T_H2 antes e após o tratamento com antimonial pentavalente.

REFERÊNCIAS

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. 2008. *Imunologia celular e molecular*. Rio de Janeiro: Elsevier. 564 pp.
Alvar, J.; Vélez, I.D.; Bern, C.; Herrero, M.; Desjeux, P.; Cano, J.; Jannin, J.; Boer, M. 2012. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *Public Library of Science*, 7(5): e35671.

- Brasil. Ministério da Saúde. 2007. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- Carvalho, L.P.; Passos, S.; Schriefer, A.; Carvalho, E.M. 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentar leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3(301): 1-9.
- Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. 2003. Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 36(1): 71-80.
- Espir, T.T. 2013. *Caracterização da resposta imune na Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após o tratamento com antimonial pentavalente*. Tese de doutorado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 197 pp.
- Hurdayal, R.; Brombacher, F. 2014. The role of IL-4 and IL-13 in cutaneous Leishmaniasis. *Immunology Letters*, article in press: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2013.12.022>.
- Kima, P.E.; Soong, L. 2013. Interferon gama in Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 4: 1-5.
- Kopf, M.; Brombacher, F.; Kohler, G.; Kienzle, G.; Widmann, K.H.; Lefrang, K.; Humborg, C.; Ledermann, B.; Solbach, W. 1996. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J Exp Med*, 184(3): 1127-1136.
- Matta, N.E.; Nogueira, R.S.; Franco, A.M.R.; Souza, I.S.; Mattos, M.S.; Oliveira-Neto, M.P.; Coutinho, S.G.; Leon, L.L.; Da-Cruz, A.M. 2009. Leishmania (Viannia) guyanensis Induces Low Immunologic Responsiveness in Leishmaniasis Patients from an Endemic Area of the Brazilian Amazon Highland. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 80(3): 339-344.
- Owens, B.M.J.; Beattie, L.; Moore, J.W.J.; Brown, N.; Mann, J.L.; Dalton, J.E.; Maroof, A.; Kaye, P.M. 2012. IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c⁺ cell population during Visceral Leishmaniasis. *PLoS Pathogens*, 8(7): 1-13.
- Reis, L.C.; Brito, M.E.F.; Souza, M.A.; Pereira, V.R.A. 2006. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na Leishmaniose Tegumentar Americana. *Revista de Patologia Tropical*, 35(2): 103-115.
- Schwarz, T.; Remer, K.A.; Nahrendorf, W.; Masic, A.; Siewe, L.; Muller, W.; Roers, A.; Moll, H. T cell-derived IL-10 determines leishmaniasis disease outcome and is suppressed by a dendritic cell based vaccine. *PLoS Pathogens*, 9(6): 1-11.