

Imunopatogênese da Leishmaniose Tegumentar

Immunopathogenesis of Tegumentary Leishmaniasis

Lucas P. Carvalho, Sara T. Passos, Amélia Ribeiro Jesus

Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brasil

A resposta imune tem um papel importante na patogênese da leishmaniose tegumentar. Na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, uma intensa resposta tipo 1, com alta produção de IFN- γ e TNF- α , é observada. Esse tipo de resposta inflamatória, apesar de estar associada ao controle da multiplicação e disseminação do parasita, se não modulada, pode causar dano tecidual. Por outro lado, a diminuição ou ausência de resposta tipo 1 e presença de citocinas regulatórias como IL-10, observada em indivíduos com leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea difusa, favorece a multiplicação e disseminação do parasita. Indivíduos com infecção assintomática por *L. braziliensis* apresentam uma resposta imune modulada, que não só controla o parasitismo como também previne o dano tecidual.

Palavras-chave: Leishmaniose, citocinas, imunopatogênese.

*The immune response plays an important role in the pathogenesis of tegumentary leishmaniasis. Patients with cutaneous and mucosal leishmaniasis have an exacerbated type 1 immune response with high secretion of IFN- γ and TNF- α . These immune responses, although is associated with the control of the parasite multiplication and dissemination, if not modulated, can cause tissue damage. On the other hand, the decrease or absence of type 1 immune response and presence of regulatory cytokines such as IL-10, observed in diffuse and disseminated leishmaniasis, allows parasite multiplication and dissemination. Individuals with asymptomatic *L. braziliensis* infection have a modulated immune response, which not only controls the parasitism but also prevents tissue damage.*

Key words: Leishmaniasis, cytokines, immunopathogenesis.

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) se apresenta clinicamente sob 4 formas distintas da doença: leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa, leishmaniose disseminada e leishmaniose cutânea difusa. A leishmaniose cutânea, a leishmaniose mucosa e a leishmaniose disseminada no Nordeste brasileiro são causadas, principalmente, pela *L. braziliensis*; e a

leishmaniose difusa, pela *L. amazonensis*. Além disso, cerca de 10% dos indivíduos residentes em área endêmica apresentam teste de hipersensibilidade tardia a antígeno de leishmania positivo e não desenvolvem a doença, caracterizando uma forma subclínica de LTA⁽¹⁹⁾. Por ser um organismo intracelular obrigatório, o principal mecanismo de defesa contra a leishmania é a produção de IFN- γ , necessária para ativação de macrófagos e síntese de derivados do O₂ a exemplo do óxido nítrico (NO) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂)^(28,30,31). Estudos em modelos experimentais de leishmaniose demonstraram que a resposta Th1 ou tipo 1, associada à produção de IL-2, IFN- γ e TNF- α , observada em camundongos C57Bl-6, está ligada à resistência ao patógeno e cura espontânea da lesão, enquanto que a resposta tipo 2, caracterizada pela

Recebido em 22/02/2005

Aceito em 27/05/2005

Endereço para correspondência: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brasil. Tel.: 55 71 3237-7353; Fax: 55 71 3245-7110. E-mail: imuno@ufba.br

Gazeta Médica da Bahia 2005;75(1):Jan-Jun:57-65.

© 2005 Gazeta Médica da Bahia (ISSN 0016-545X).

Todos os direitos reservados.

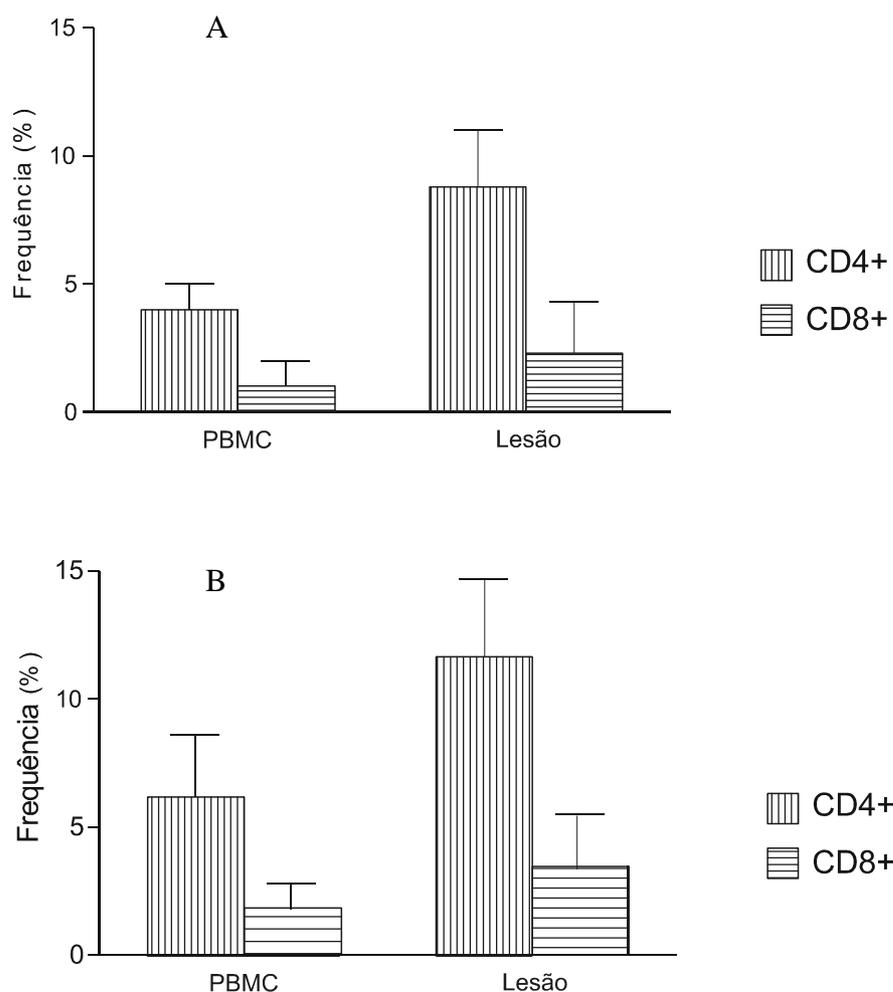
produção de IL-4 e IL-5, observada em camundongos BALB/c, está associada à susceptibilidade à infecção e proliferação do parasita^(28,29). No homem, também o controle da infecção contra a leishmania é mediado por células. No entanto, os estudos que serão aqui revistos e mostrados revelam que a resposta imune na leishmaniose é complexa. Enquanto que a deficiência da resposta imune protetora está relacionada com a multiplicação do parasita, uma forte resposta tipo 1 pode também estar associada com a lesão tecidual. Nesse contexto, à semelhança da hanseníase, a LTA apresenta formas polares da doença. Na leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa, existe uma forte resposta tipo 1, o que controla a multiplicação do parasita, porém há lesão tecidual⁽²⁵⁾. Enquanto que, na leishmaniose disseminada e na leishmaniose cutânea difusa, a diminuição ou ausência de resposta tipo 1 favorece a multiplicação e disseminação da leishmania^(10,34). A exemplo do que ocorre em outras doenças infecciosas e parasitárias, o estudo da resposta imune em indivíduos que montam resposta à infecção e não desenvolvem a doença aparente consiste em uma boa forma de entender os mecanismos imunológicos de proteção contra a infecção. Follador et al.⁽¹⁹⁾, comparando a resposta imune de indivíduos sem história de doença e com teste cutâneo de hipersensibilidade tardia positivo a antígeno de leishmania (infecção sub-clínica) com a resposta de indivíduos com leishmaniose cutânea, demonstraram que esses indivíduos tem uma resposta tipo 1 em níveis bem menores do que aqueles com leishmaniose cutânea, sugerindo que a resposta tipo 1 modulada com concentrações menores de IFN- γ pode ser suficiente para a proteção contra o parasita sem induzir à inflamação tecidual.

Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea

Pacientes com leishmaniose cutânea apresentam, na maioria das vezes, uma ou mais lesões ulceradas de fundo granuloso e bordas elevadas. A análise histopatológica da lesão mostra infiltrado mononuclear nas lesões desses pacientes⁽⁸⁾. Pacientes com

leishmaniose cutânea apresentam teste intradérmico de Montenegro positivo e alta resposta linfoproliferativa para antígeno solúvel de leishmania (SLA). Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea secretam altos níveis de IFN- γ e TNF- α e baixos níveis de IL-5 e IL-10 quando estimuladas com SLA⁽⁵⁾, sendo a célula CD4+ o tipo celular que contribui com a maior parte da produção de IFN- γ tanto no sangue periférico quanto a nível tecidual, embora haja participação de células CD8+ na produção dessa citocina⁽²⁾ (Figura 1A, 1B). Na lesão de pacientes com leishmaniose cutânea, é observada uma predominância de RNA mensageiro de citocinas tipo 1 como a IL-2, IFN- γ e TNF- α ⁽²⁴⁾. Da-Cruz et al.⁽¹⁶⁾ mostraram que a razão de células CD4/CD8 é maior em indivíduos com doença ativa e que o número dessas células tende a se igualar após terapêutica com antimonial pentavalente, sendo sugerido um papel da célula CD8+ na cura da lesão. No entanto, evidências de que a resposta inflamatória é responsável pelo aparecimento da úlcera na leishmaniose cutânea tem sido acumulada: 1) o tratamento de pacientes com lesão inicial não previne o aparecimento de úlcera⁽²²⁾; 2) as concentrações de IFN- γ e TNF- α diminuem após tratamento⁽²⁵⁾; 3) indivíduos com teste de Montenegro positivo, que não desenvolvem lesão (forma subclínica da infecção por *L. braziliensis*), apresentam níveis mais baixos de IFN- γ e TNF- α do que pacientes com leishmaniose cutânea⁽¹⁹⁾. Machado et al.⁽¹⁰⁾ demonstraram não só que o tratamento precoce da leishmaniose cutânea (< 20 dias de lesão) não previne o crescimento da úlcera cutânea, como também nessa situação cerca de 50% dos pacientes apresentam pior resposta ao tratamento, além de demonstrar a presença de vasculite e marcador de citotoxicidade (Tia-1) nessas lesões iniciais^(22,23). Esses dados sugerem que a resposta inflamatória é importante para o desenvolvimento da úlcera. A razão pela qual, apesar de haver uma forte resposta tipo 1, mas não existir uma completa destruição de parasitas, não é completamente entendida. Em modelo experimental, por exemplo, foi demonstrado o papel de células T regulatórias CD4+CD25+ produtoras de IL-10 na persistência do parasita, no local da infecção,

Figura 1. Frequência de células CD4⁺ ou CD8⁺ positivas para IFN- γ . Células foram isoladas de sangue periférico ou extraídas de lesão de pacientes com leishmaniose cutânea (A) e leishmaniose mucosa (B), estimuladas com SLA (10 μ g/mL). A frequência de células positivas para IFN- γ foi determinada por citometria de fluxo.



com cura da lesão⁽⁷⁾. Esse poderia ser um mecanismo evolutivo de adaptação do parasita ao hospedeiro mamífero, uma vez que favorece a persistência sem produzir lesão, ao mesmo tempo em que essa persistência protege o hospedeiro da reinfecção. De fato, alguns componentes antigênicos do parasito são capazes de induzir a uma resposta imune diferenciada, não só no tipo de resposta imunológica observada nesses pacientes, como também no tipo de célula ativada. Alguns antígenos recombinantes de leishmania

induzem resposta tipo 1 enquanto outros induzem resposta regulatória. O H2A e o H3 induzem, principalmente, produção de IFN- γ em células de indivíduos com leishmaniose cutânea⁽¹⁸⁾. O LeIF induz à produção de IL-12^(32,33). O LACK e o KMP11 induzem, principalmente, à secreção de IL-10, que regula negativamente a resposta imune. A tentativa de modular a produção de IFN- γ desses pacientes em resposta ao SLA foi feita com a adição desses antígenos, sendo observado que tanto o LACK como

o KMP11 são capazes de suprimir a produção de IFN- γ *in vitro* induzida por SLA nesses pacientes (Figura 2) ^(11,15). A principal célula ativada por LACK ou KMP11 é o macrófago; porém, a célula T CD8+ também produz IL-10 após estimulação *in vitro* com esses antígenos ⁽¹⁵⁾. Além disso, a neutralização *in vitro* de citocinas envolvidas na ativação e proliferação celular (IL-2 e IL-15) é também capaz de suprimir a produção de IFN- γ induzida por SLA nesses pacientes. Tem sido mostrado que, nas formas iniciais da leishmaniose cutânea, pode ser observada a produção de citocinas tipo 2 no tecido e uma modulação da resposta tipo 1 mediada por IL-10 ⁽²⁶⁾. Todavia, essas alterações são transitórias e, com a evolução da doença, uma intensa resposta inflamatória mediada por IFN- γ e TNF- α é observada.

Imunopatogênese da Leishmaniose Mucosa

A leishmaniose mucosa é uma das formas mais agressivas de leishmaniose tegumentar. A doença acomete principalmente a mucosa nasal, mas pode haver também envolvimento do palato, faringe e laringe. A importância da leishmaniose mucosa é devida não só ao intenso processo inflamatório que acompanha a doença, levando à destruição do septo nasal e aparecimento de lesões desfigurantes, mas também pelo alto índice de refratariedade ao tratamento com antimonial. Assim como na leishmaniose cutânea, o papel da resposta imune na patogênese da leishmaniose mucosa é bem caracterizado. As CMSP de pacientes com leishmaniose mucosa secretam concentrações ainda mais elevadas de IFN- γ e TNF- α quando estimuladas com SLA do que as observadas nos pacientes com leishmaniose cutânea. A célula CD4+ é responsável pela maior parte da produção de IFN- γ , tanto em sangue periférico como no tecido lesado dos pacientes com leishmaniose mucosa (Figura 1). Os linfócitos também representam cerca de 60 a 90% das células produtoras de TNF- α , seguidos por macrófagos ⁽⁵⁾. Além disso, essa resposta inflamatória exacerbada não é devidamente modulada, já que as CMSP desses pacientes secretam baixos níveis de IL-

10 quando estimuladas com SLA. Além disso, diferente dos pacientes com leishmaniose cutânea, a adição de IL-10 exógena ou de antígenos recombinantes que induzem à produção de IL-10 em culturas de células mononucleares estimuladas com SLA, não é capaz de modular a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose mucosa (Figura 2). Outro aspecto importante é que a neutralização *in vitro* de citocinas envolvidas na ativação ou proliferação celular (IL-2, IL-12 e IL-15) não tem efeito significativo na modulação da produção de IFN- γ de pacientes com leishmaniose mucosa (Figura 3). Contribui também para essa intensa resposta tipo 1 o fato de que pacientes com leishmaniose mucosa apresentam um maior número de células T CD4+ ativadas (CD4+CD28-, CD4+CD62L-, CD4+CD69+) do que pacientes com leishmaniose cutânea, o que explica também a incapacidade de modulação da resposta observada nesses pacientes. A nível tecidual, a resposta imunológica observada em pacientes com leishmaniose mucosa difere daquela encontrada no sangue periférico. Na lesão de pacientes com leishmaniose mucosa, observou-se RNA mensageiro tanto para citocinas do tipo 1, quanto do tipo 2 ⁽²⁴⁾. É possível que a produção tecidual de citocinas Th2 seja uma tentativa de modular uma intensa resposta Th1. O papel do TNF- α na patogênese da leishmaniose mucosa é sugerido pelo fato de que pacientes com leishmaniose mucosa apresentam grandes quantidades da forma solúvel de TNF- α biologicamente ativo e deletério ⁽¹⁷⁾. Além dos estudos imunológicos, ensaios clínicos com ênfase na inibição de citocinas como o TNF- α têm contribuído para o entendimento da imunopatogênese na leishmaniose mucosa. O tratamento da leishmaniose com inibidor de TNF- α (pentoxifilina), associado ao antimonial pentavalente, diminui o tempo de cura de pacientes virgens de tratamento e é eficaz no tratamento de indivíduos refratários ao antimonial ⁽²¹⁾.

Imunopatogênese da Leishmaniose Disseminada

A leishmaniose disseminada é uma forma de leishmaniose emergente no Nordeste do Brasil,

Figura 2. Efeito da adição de KMP11 ou LACK na produção de IFN- γ em culturas de PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) estimuladas com SLA (10 μ g/mL).

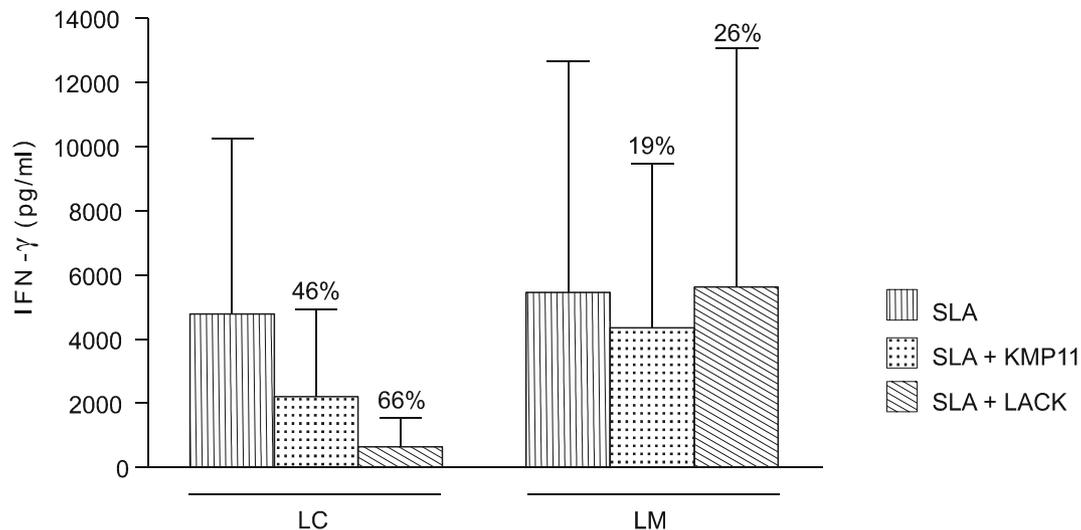
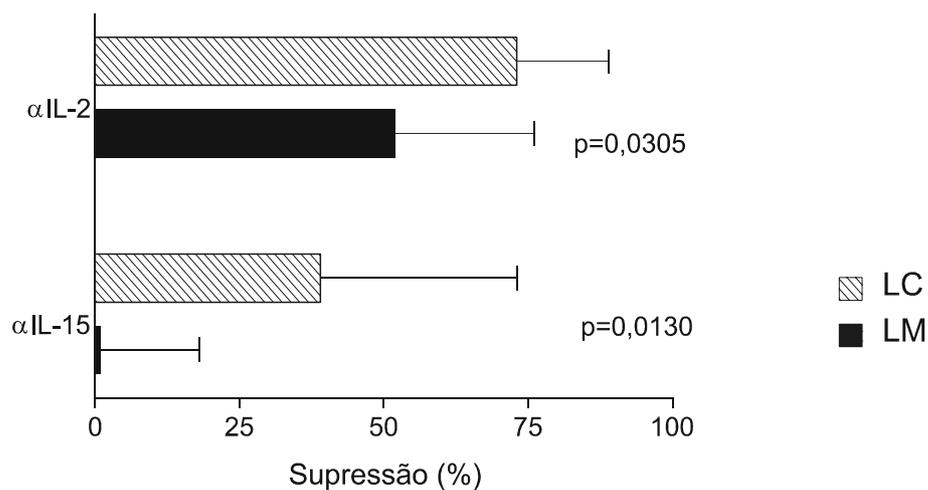


Figura 3. Efeito da neutralização de IL-2 ou IL-15 na produção de IFN- γ em culturas de PBMC de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) estimuladas com SLA (10 μ g/mL).



causada, na maioria das vezes, por *L. braziliensis*. Pacientes com leishmaniose disseminada apresentam múltiplas lesões em mais de uma parte do corpo. Essas lesões podem ser acneiformes nodulares ou ulceradas. Os pacientes habitualmente apresentam uma lesão, seguida de uma história de febre com aparecimento

de múltiplas lesões distribuídas em todo o corpo, num quadro que sugere disseminação hematogênica. O acometimento da mucosa nasal aparece com mais frequência em indivíduos com leishmaniose disseminada. Alguns estudos prévios confundiam a leishmaniose disseminada com leishmaniose cutânea

difusa, descrevendo as alterações imunológicas desses pacientes como as encontradas na leishmaniose cutânea difusa, (ausência de resposta tipo 1 com alta expressão de IL-10). Mais recentemente, a leishmaniose disseminada foi clinicamente e imunologicamente diferenciada da forma difusa. Do ponto de vista histopatológico, é observado infiltrado mononuclear com presença de linfócitos e macrófagos e poucos parasitas⁽¹³⁾. Indivíduos com leishmaniose disseminada podem ter o teste de Montenegro positivo ou negativo e têm baixa resposta linfoproliferativa ao SLA⁽¹³⁾. Na leishmaniose disseminada, há uma produção de IFN- γ e TNF- α por células mononucleares após estímulo com SLA, porém, quando comparada às encontradas na leishmaniose cutânea, essas concentrações são mais baixas e, quando comparada às encontradas na leishmaniose cutânea difusa, essas concentrações são bem mais elevadas. A avaliação de 8 pacientes com leishmaniose disseminada demonstrou diminuição de contagem de células CD4+ em 4 deles, sendo que em 2 deles falha terapêutica foi observada⁽¹³⁾. A diminuição de resposta tipo 1 em pacientes com leishmaniose disseminada favorece a multiplicação e predispõe à disseminação da doença. No entanto, a presença de uma resposta tipo 1 favorece o controle da multiplicação dos parasitas nas lesões, sendo essa forma clínica intermediária entre a leishmaniose cutânea e a leishmaniose cutânea difusa.

Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea Difusa

A leishmaniose cutânea difusa é uma forma clínica rara de leishmaniose, tendo como agente causal no Brasil a *L. amazonensis*. A ausência de resposta ao tratamento ou recidiva após a terapêutica é um achado comum nos pacientes portadores dessa enfermidade. As lesões de pacientes com leishmaniose cutânea difusa são, na sua maioria, nodulares, em grande número, e disseminadas ao longo do corpo. Existe a presença de macrófagos parasitados^(9,12). Imunologicamente, a leishmaniose cutânea difusa tem aspectos semelhantes à leishmaniose visceral. Pacientes

com leishmaniose cutânea difusa apresentam negatividade do teste de Montenegro, baixa ou ausência de resposta linfoproliferativa e baixa ou ausência de produção de IFN- γ para antígeno de leishmania. A avaliação da expressão de RNA mensageiro para citocinas demonstrou que células mononucleares de pacientes com leishmaniose cutânea difusa expressam grandes quantidades de IL-10 e IL-4 e baixas quantidades de IFN- γ durante a fase ativa da doença. Após a terapêutica e atenuação das lesões, a expressão de IL-10 diminui enquanto que a expressão de IFN- γ aumenta⁽¹⁰⁾. Concentrações elevadas de IL-10 foram encontradas em sobrenadantes de culturas de CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea difusa, estimuladas com antígeno de leishmania. Esses dados mostram que a principal deficiência imunológica na leishmaniose cutânea difusa é a incapacidade de produção de IFN- γ e que a IL-10 tem papel importante nessa modulação negativa.

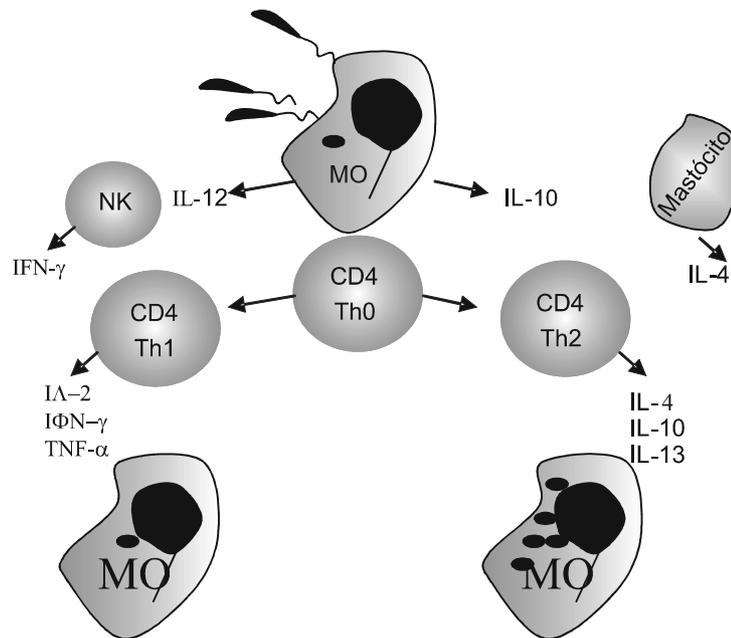
Discussão

A importância da resposta imune na patogênese das doenças tem sido evidenciada em várias enfermidades infecciosas, entre as quais, hanseníase, tuberculose, esquistossomose e candidíase^(3,4,14,20). Na leishmaniose, estudos experimentais e no homem têm demonstrando que a produção de IFN- γ é fundamental para o controle da infecção. A avaliação da resposta imune e os achados histopatológicos observados nos indivíduos com leishmaniose cutânea difusa corroboram com os dados em modelos experimentais, mostrando que a resposta Th1 é fundamental para a ativação de macrófagos e síntese de produtos que são tóxicos para a leishmania como o peróxido de hidrogênio e o óxido nítrico. Nesse caso, a presença de grandes quantidades de citocinas regulatórias e a ausência ou diminuição da concentração de IFN- γ contribuem para a disseminação do parasito⁽⁶⁾. Por outro lado, níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias, como os observados na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa, são responsáveis por ativação macrofágica e destruição da leishmania, mas também podem

contribuir para o dano tecidual observado ^(5,15,25). As principais evidências de que a resposta imune tipo 1 está associada com a lesão tecidual na leishmaniose cutânea e na leishmaniose mucosa são: 1) desproporção entre o número de parasitas e lesão tecidual; 2) incapacidade do tratamento com antimonial na fase pré-ulcerativa no intuito de prevenir o aparecimento de úlcera ⁽²²⁾; 3) capacidade de moléculas como o GM-CSF e a pentoxifilina em reduzir o tempo de cura de pacientes com leishmaniose cutânea e pacientes com leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ^(1,21). Outro aspecto importante é a observação

de que indivíduos residentes em área de transmissão de *L. braziliensis* que apresentam sorologia e teste de Montenegro positivo, mas não desenvolvem doença, têm um tipo de resposta imune não polarizada (tipo 1 e tipo 2). Esses indivíduos com infecção subclínica por *L. braziliensis* têm uma resposta imune modulada, a qual é capaz de controlar a multiplicação parasitária e não causar danos ao hospedeiro⁽¹⁹⁾. O Diagrama 1 propõe um modelo de imunopatogênese da leishmaniose tegumentar. Não estão ainda esclarecidos fatores do hospedeiro que influenciem na resposta imune e que possam estar contribuindo para o espectro

Diagrama 1. Modelo esquemático do efeito da diferenciação Th1 e Th2 e produção de citocinas na leishmaniose tegumentar americana. LC, leishmaniose cutânea; LM, leishmaniose mucosa; LD, leishmaniose disseminada; LCD, leishmaniose cutânea difusa.



	Resposta tipo 1	Treg	Resposta tipo 2	Conseqüência
LC	++++	++	+	Lesão tecidual mediada por citocinas pro-inflamatórias
LM	+++++	-	+/-	Lesão tecidual mediada por citocinas pro-inflamatórias
LD	+++	+++	++	Disseminação c/ controle da multiplicação do parasito
LCD	-	+++	++++	Multiplicação e disseminação do parasito

clínico diverso das leishmanioses. Recentemente, tem sido demonstrada a influência de polimorfismos genéticos em genes que regulam a resposta imune na magnitude da resposta imune. É possível que esses polimorfismos expliquem variações nas respostas dos indivíduos ao parasita, resultando em uma resposta imune diferenciada e conseqüente diversidade de formas clínicas. Por outro lado, o parasita deve também exercer um papel importante na resposta imune e contribuir para a exacerbação da doença, como vem sendo demonstrado em alguns estudos. Estes mostram a associação entre formas diversas de leishmaniose e espécies ou mesmo entre parasitas da mesma espécie com diferenças genéticas⁽²⁷⁾.

Referências Bibliográficas

1. Almeida R, D'Oliveira Jr A, Machado P, Bacellar O, Ko AI, de Jesus AR, Mobashery N, Brito Santos J, Carvalho EM. Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1735-1737, 1999.
2. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical Experimental Immunology* 136: 341-348, 2004.
3. Araujo MI, de Jesus AR, Bacellar O, Sabin E, Pearce E, Carvalho EM. Evidence of a T helper type 2 activation in human schistosomiasis. *European Journal of Immunology* 26: 1399-1403, 1996.
4. Arruda S, Chalhoub M, Cardoso S, Barral-Netto M. Cell-mediated immune responses and cytotoxicity to mycobacterial antigens in patients with tuberculous pleurisy in Brazil. *Acta Tropica* 71: 1-15, 1998.
5. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection & Immunity* 70: 6734-6740, 2002.
6. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International Journal of Dermatology* 34: 474-479, 1995.
7. Belkaid Y. The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in Leishmania infection. *Expert Opinion on Biological Therapy* 3: 875-885, 2003.
8. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 86: 51-56, 1991.
9. Bittencourt AL, de Freitas LA, Pompeu ML, Vieira ML, Barral A. Distinct ultrastructural aspects in different biopsies of a single patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 53-59, 1990.
10. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology* 84: 188-194, 1996.
11. Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, Barral A, Almeida RP, Mayrink W, Locksley R, Gollob KJ. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infection & Immunity* 69: 3232-3239, 2001.
12. Bryceson AD. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. 3. Immunological studies. IV. Pathogenesis of diffuse cutaneous leishmaniasis. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 380-393, 1970.
13. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Tropica* 56: 315-325, 1994.
14. Carvalho LP, Bacellar O, Neves N, de Jesus AR, Carvalho EM. Downregulation of IFN-gamma production in patients with recurrent vaginal candidiasis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 109: 102-105, 2002.
15. Carvalho LP, Passos S, Dutra WO, Soto M, Alonso C, Gollob KJ, Carvalho EM, Ribeiro de Jesus A. Effect of LACK and KMP11 on IFN-gamma production by peripheral blood mononuclear cells from cutaneous and mucosal leishmaniasis patients. *Scandinavian Journal of Immunology* 61: 337-342, 2005.
16. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology* 9: 251-256, 2002.
17. Da-Cruz AM, de Oliveira MP, De Luca PM, Mendonca SC, Coutinho SG. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91: 225-229, 1996.

18. de Carvalho LP, Soto M, Jeronimo S, Dondji B, Bacellar O, Luz V, Orge Orge G, Alonso C, Jesus AR, Carvalho EM. Characterization of the immune response to *Leishmania infantum* recombinant antigens. *Microbes & Infection* 5: 7-12, 2003.
19. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clinical Infectious Diseases* 34: E54-58, 2002.
20. Kaplan G, Cohn ZA. Leprosy and cell-mediated immunity. *Current Opinion on Immunology* 3: 91-96, 1991.
21. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, Carvalho EM. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 65: 87-89, 2001.
22. Machado P, Araujo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, Carvalho EM. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clinical Infectious Diseases* 34: E69-73, 2002.
23. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araujo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Dermatology* 12: 449-451, 2002.
24. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* 91: 1390-1395, 1993.
25. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 31: 143-148, 1998.
26. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Filho DC, Filho AC, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 180: 1731-1734, 1999.
27. Schriefer A, Schriefer AL, Goes-Neto A, Guimaraes LH, Carvalho LP, Almeida RP, Machado PR, Lessa HA, de Jesus AR, Riley LW, Carvalho EM. Multiclonal *Leishmania braziliensis* population structure and its clinical implication in a region of endemicity for American tegumentary leishmaniasis. *Infection and Immunity* 72: 508-514, 2004.
28. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *Journal of Experimental Medicine* 168: 1675-1684, 1988.
29. Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4+ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunology Review* 112: 161-182, 1989.
30. Scott P, Sacks D, Sher A. Resistance to macrophage-mediated killing as a factor influencing the pathogenesis of chronic cutaneous leishmaniasis. *Journal of Immunology* 131: 966-971, 1983.
31. Sher A, Sacks DL, Scott PA. Host and parasite factors influencing the expression of cutaneous leishmaniasis. *Ciba Foundation Symposium* 99: 174-189, 1983.
32. Skeiky YA, Guderian JA, Benson DR, Bacellar O, Carvalho EM, Kubin M, Badaro R, Trinchieri G, Reed SG. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. *Journal of Experimental Medicine* 181: 1527-1537, 1995.
33. Skeiky YA, Kennedy M, Kaufman D, Borges MM, Guderian JA, Scholler JK, Owendale PJ, Picha KS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Campos-Neto A, Reed SG. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. *Journal of Immunology* 161: 6171-6179, 1998.
34. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Jr., Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *Journal of Infectious Diseases* 186: 1829-1834, 2002.