

Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral

Immunopathogenesis of Visceral Leishmaniasis

Olívia Bacellar, Edgar M. Carvalho

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

A leishmaniose visceral humana é caracterizada por uma diminuição da resposta imune celular ao antígeno de leishmania. Nesses pacientes, o teste de hipersensibilidade tardia para o antígeno de leishmania é negativo e as células mononucleares do sangue periférico não produzem IL-2, IFN- γ e IL-12 quando estimuladas *in vitro*, com antígeno de leishmania. Após o tratamento com cura, essas funções de células T são restauradas. Vários estudos realizados em nosso meio mostraram os principais mecanismos que estão envolvidos na imunopatogênese da leishmaniose visceral. A detecção de indivíduos infectados em uma área endêmica ainda sem a doença permitiu a caracterização da resposta imune a antígenos de leishmania na fase inicial da infecção causada pela *L. chagasi*. Esses resultados mostraram que as alterações imunológicas ocorriam precocemente na infecção e que havia uma associação entre ausência ou baixa proliferação linfocitária e a capacidade reduzida de produzir IFN- γ com a progressão da infecção para a doença. O defeito na proliferação linfocitária e na redução da capacidade de produzir IFN- γ estava relacionada com a produção da IL-10, uma vez que a adição *in vitro* de anticorpo anti-IL-10 teve a capacidade de restaurar tanto a resposta linfoproliferativa quanto a produção de IFN- γ . A adição de IL-12 em culturas de células estimuladas *in vitro* com antígeno aumentou a resposta linfoproliferativa e a produção de IFN- γ nesses pacientes a níveis similares ao observado em pacientes curados da infecção. Todavia, o efeito de IL-12 foi bloqueado pela IL-10 indicando ser esta citocina a principal mediadora das alterações imunológicas observadas na leishmaniose visceral.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, imunopatogênese, IFN- γ , interleucina-10, interleucina-12.

Visceral leishmaniasis is associated with a marked depression in T cell response, characterized by the absence of IL-2 and IFN- γ production by lymphocytes stimulated by the Leishmania antigen in vitro. Conversely, cure of visceral leishmaniasis is associated with restoration of these T cell functions. Studies carried out in Bahia, Brazil, have established the main mechanisms involved in the immune suppression observed in L. chagasi infection. The characterization of the immune response to leishmania antigens in individuals living in an endemic area of L. chagasi has shown that these immunological abnormalities occur during early infection and that there is a correlation between the lack of lymphoproliferative response and IFN- γ production and development of the disease. These studies have also shown that in patients with the active disease, the specific lymphocyte proliferation could be restored in vitro by the addition of IL-2 and IFN- γ . Restoration of T cell proliferative responses and IFN- γ production were also observed with the addition of a neutralizing monoclonal antibody α -IL-10. We also evaluated the ability of IL-12, a cytokine that acts on Natural Killer and T cells to produce IFN- γ and restore cellular immune responses in these patients. The addition of IL-12 enhanced the

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.

proliferative response and IFN- γ production in cultures stimulated with Leishmania antigen, rendering these responses similar to those observed in subjects cured of the disease. However, the exogenous addition of IL-10 abrogated the effect of IL-12. These data suggest that IL-10 is the major cytokine down-modulating the immunological response in visceral leishmaniasis.

Key words: *Visceral leishmaniasis, IFN- γ , immunopathogenesis, interleukin-10, interleukin-12.*

Aspectos Epidemiológicos e Clínicos

A leishmaniose visceral, também denominada de calazar, é uma doença causada por protozoários intracelulares pertencentes ao gênero *Leishmania*. No novo mundo a doença é causada pela *Leishmania chagasi*. No mediterrâneo, o agente causal é a *Leishmania infantum* e, na África e Ásia, a doença é causada pela *Leishmania donovani*. As leishmanias são transmitidas ao homem através de picada de flebotomíneos, sendo o *Lutzomyia longipalpis* o principal agente transmissor da *Leishmania chagasi*. A leishmaniose visceral americana é uma zoonose que tem como principal reservatório silvestre, no Brasil, a raposa e domiciliar, o cão.

No flebotomo, o parasito tem uma forma flagelada denominada promastigota. Uma vez inoculada no mamífero, a leishmania é fagocitada ou penetra nas células do sistema fagocítico mononuclear, onde perde o flagelo e transforma-se na forma amastigota. Caso essas células não consigam destruir o parasito, este inicia sua multiplicação intracelular, lisando as células infectadas. Os parasitos são, então, liberados, voltando a infectar novas células, repetindo o ciclo de penetração e destruição celular. A propagação da infecção leva a um parasitismo intenso dos órgãos do sistema retículo-endotelial e, conseqüentemente, ao quadro crônico da doença.

A leishmaniose visceral é endêmica em 62 países, com um total de 200 milhões de pessoas em risco, 500.000 casos novos por ano em todo o mundo ⁽²⁸⁾ e com 41.000 mortes registradas no ano 2000 ⁽⁶¹⁾. Mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral ocorrem em cinco países: Índia, Bangladesh, Nepal e Brasil. No Brasil, são notificados cerca de 1.980 casos/ano ⁽³¹⁾ e 90% desses casos ocorrem no Nordeste do país.

Clinicamente, a doença se caracteriza por febre, hepatoesplenomegalia, diarreia, epistaxis, icterícia,

anemia, leucopenia, plaquetopenia, hipoalbuminemia e hiperglobulinemia. São complicações graves da doença sangramento no trato digestivo e infecções bacterianas. Essas infecções ocorrem, principalmente, por *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* e estão associadas à diminuição do número de neutrófilos ⁽²⁾. O tratamento da leishmaniose visceral é feito com antimonial pentavalente que embora altamente eficaz contra *L. chagasi* vem ao longo dos anos perdendo a eficácia contra a *L. donovani* ⁽⁵⁷⁾.

Mecanismos de Defesa contra a Leishmania

Apesar da imunidade celular ser o principal mecanismo de defesa do hospedeiro contra a leishmania, anticorpos e complemento podem destruir a leishmania *in vitro*. As formas promastigotas são fagocitadas pelos neutrófilos, que são as primeiras células a migrarem para o local da infecção ⁽⁶²⁾ e podem ser destruídas através da ação de produtos do metabolismo oxidativo, como o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), atividade enzimática e produção de óxido nítrico ^(48,50). Os neutrófilos infectados começam a secretar quimiocinas como IL-8 e MIP-1 β ⁽⁵²⁾, moléculas importantes para atrair mais neutrófilos e macrófagos para o sítio da infecção.

A produção de óxido nítrico (NO) como uma via efetora comum de defesa do macrófago contra a leishmania tem sido bem documentada ⁽³⁴⁾. Níveis de óxido nítrico produzidos por macrófagos ativado por interferon-gama (IFN- γ) ou pelo fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) estão relacionados com resistência à infecção, uma vez que macrófagos provenientes de linhagens resistentes de camundongos B10. S., C57B1/6 e C3H produzem níveis significativamente mais altos de NO do que macrófagos

provenientes de linhagens de camundongos susceptíveis como BALB/c e DBA/2⁽⁴³⁾. Em estudos realizados com *L. donovani*, observou-se que camundongos não possuidores do gene de nitrato sintetase (enzima que catalisa a síntese de NO) não têm capacidade de controlar a infecção⁽⁴⁷⁾.

Em 1986, Mosmann et al.⁽⁴⁵⁾ obtiveram clones de células T CD4+ que podiam ser subdivididas em subpopulações baseadas na produção de citocinas após estimulação *in vitro*. As células T “helper” tipo 1 (Th1) produzem IFN- γ e interleucina-2 (IL-2), fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), interleucina-3 (IL-3) e linfotóxina (TNF- β), e são responsáveis pela imunidade mediada por células, pelas reações inflamatórias, além de estimular, também, a produção de anticorpos da classe IgG2a. Células T “helper” tipo 2 (Th2) produzem interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina-10 (IL-10) e interleucina-13 (IL-13), e mediam a imunidade humoral e as reações alérgicas. A IL-4 está relacionada com a produção de anticorpos da classe IgE, IgG1 e IgG4; e a IL-5 é importante para diferenciação, multiplicação e ativação de eosinófilos⁽⁴⁶⁾. Em modelo experimental, camundongos BALB/c, geneticamente susceptíveis à infecção com *L. major*, possuem alta expressão de RNA mensageiro para IL-4 nas células dos linfonodos que drenam a lesão. Em contraste, camundongos C57BL/6, geneticamente resistentes à infecção por *L. major*, expressam RNA mensageiro para IFN- γ e não para IL-4⁽³⁵⁾.

O controle da infecção por leishmanias é dependente da resposta imune mediada por células. Uma citocina importante na resposta imune à leishmanias é o IFN- γ , produzida principalmente por células T CD4+ do tipo Th1, e por células NK, estimuladas por IL-12. Em camundongos resistentes, células T CD4+ do tipo Th1 produzem IFN- γ , o que ativa a óxido nítrico sintetase (iNOS ou NOS2), levando ao estímulo da ação microbicida mediada pelo óxido nítrico (NO). A liberação de NO leva à morte do parasita em macrófagos humanos, que podem também ser estimulados pela ação de quimiocinas como MCP-1 e MCP-1 α ^(12,14). Células de animais resistentes C3H/HeN, tratados com uma única dose de anti-IFN- γ

antes da infecção, produzem IL-4 e IL-5 e baixos níveis de IFN- γ , impedindo a eliminação do parasita, apesar de não ocorrer o aparecimento de células Th2. Por outro lado, a co-administração de IFN- γ no período de infecção, em camundongos susceptíveis BALB/c, resulta em aumento da produção de IFN- γ e redução de níveis de IL-4 e IL-5⁽⁵⁵⁾.

A atividade leishmanicida do macrófago está também na dependência da produção do fator de crescimento e transformação β (TGF- β). Essa citocina está relacionada com desativação de macrófago, inibição da ação do IFN- γ e redução da expressão de moléculas MHC classe II⁽²⁹⁾. A infecção *in vitro* de macrófagos de camundongos com *Leishmania amazonensis* ou *Leishmania braziliensis* leva à produção de TGF- β ⁽¹⁰⁾. O tratamento *in vivo* com TGF- β em animais resistentes à infecção por leishmanias favorece a infecção, mudando o padrão de resposta imune, com o aumento RNA mensageiro para IL-10. Por sua vez, animais susceptíveis, quando tratados com anticorpos monoclonais anti-TGF- β , tornam-se protegidos, apresentando um aumento na expressão de RNAm para IFN- γ nas células dos linfonodos drenantes da lesão^(7,9). Além disso, em camundongos que apresentam uma susceptibilidade intermediária à infecção por *L. major*, o tratamento local com anticorpo anti-TGF- β leva a uma diminuição do número de parasitas e melhora rápida das lesões. O estudo imunohistoquímico nessas lesões mostra que esse tratamento resulta em um aumento da produção de NO, sugerindo que o TGF- β tem um papel importante também na supressão da produção de NO por macrófagos infectados por leishmanias⁽⁴²⁾.

A interleucina-10 (IL-10) é uma outra citocina produzida por macrófagos que contribui para a sobrevivência da leishmanias nessas células. A IL-10 inibe a síntese de citocinas produzidas pelos macrófagos como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α ⁽²⁶⁾ e inibe a função dessas células como apresentadoras de antígeno através da diminuição da expressão de moléculas do MHC classe II⁽²⁷⁾. Um outro efeito importante da IL-10 nos macrófagos é a inibição dos eventos metabólicos associados com sua ativação⁽¹³⁾. Esses efeitos, associados à capacidade dessa citocina de

suprimir a produção de IFN- γ por células T CD4+ tipo Th1, fazem com que a IL-10 interfira na atividade leishmanicida do macrófago. Um outro estudo mostrou que, apesar desses efeitos em camundongos susceptíveis BALB/c infectados com *L. major*, a neutralização da IL-10 com anticorpo anti-IL-10 não altera o desenvolvimento das lesões. Na infecção crônica, quantidades semelhantes de IL-10 são produzidas tanto em linhagens resistentes quanto susceptíveis. Entretanto, no início da infecção, a produção de IL-10 é significativamente maior nos animais susceptíveis⁽²²⁾.

A interleucina-12 (IL-12) tem sido apontada como um dos mais importantes componentes da fase inicial da infecção pela leishmania. A IL-12 é produzida primariamente por células apresentadoras de antígeno (monócitos, macrófagos, células dendríticas e células B) e sua principal atividade biológica é sobre células T e células “natural killer” (NK), nas quais ela estimula a produção de citocinas, principalmente IFN- γ , proliferação celular e citotoxicidade⁽⁶⁰⁾. A IL-12 desempenha um papel importante na diferenciação e expansão de células T CD4+ do tipo Th1 e é importante para o padrão de resistência do camundongo^(53,54). As células NK ativadas por IL-12 são a fonte inicial de IFN- γ na infecção por *L. major* em camundongos resistentes, e a produção de IL-12 encontra-se elevada nas células desses animais⁽⁵³⁾. A neutralização *in vivo* de IL-12 elimina a resposta citotóxica de células NK; e a produção de IFN- γ através de células de linfonodo, por impedir a cura do animal resistente C57BL/6⁽⁵⁸⁾, sugere que a IL-12 endógena é necessária para o controle da infecção, presumivelmente através da indução de IFN- γ , requerida para conter a expansão de amastigotas.

As ações da IL-12 no início da infecção têm incentivado os seus usos no tratamento e profilaxia da leishmaniose. Em animais susceptíveis infectados com *L. major*, a IL-12 associada a uma droga leishmanicida, o antimonal pentavalente, leva a uma mudança de uma resposta Th2 para Th1 e cura da infecção⁽⁴⁹⁾. Em relação à profilaxia, a IL-12 já foi utilizada como adjuvante em vacinação com antígeno de leishmania em camundongos susceptíveis. Após a

vacinação, esses animais desenvolveram uma resposta antígeno-específica Th1 e tornam-se resistentes a uma subsequente infecção com *L. major*⁽¹⁾.

Contribuições da Pesquisa na Bahia na Imunopatogênese da Leishmaniose Visceral

A principal alteração imunológica na leishmaniose visceral é a incapacidade de linfócitos de ativar macrófagos para destruir a leishmania em virtude da ausência *in vitro* da produção de IFN- γ após estímulo dos linfócitos com antígeno de leishmania⁽¹⁹⁾. Esta incapacidade de produzir IFN- γ é antígeno-específica, pois linfócitos de pacientes com leishmaniose visceral proliferam e produzem essa citocina quando estimulados com antígenos não relacionados como o purificado protéico derivado do *M. tuberculosis* (PPD) e antígeno de *C. albicans*⁽¹⁶⁾. Considerando, entretanto, que a leishmaniose visceral é uma doença debilitante e associada à desnutrição, um importante questionamento era se esta anormalidade imunológica seria realmente importante na progressão da infecção para doença ou se era apenas um achado em pacientes com a forma avançada da infecção por *L. chagasi*. Os estudos realizados em Jacobina/BA na década de 80 tiveram uma grande importância em esclarecer este aspecto. Naquela ocasião, um estudo prospectivo em crianças de 0 a 18 anos foi realizado com o objetivo de determinar, através do teste sorológico ELISA, o número real de crianças infectadas e como essas crianças evoluíam após a infecção. Desta forma, foi detectado que cerca de 75% de indivíduos infectados não evoluíam para a doença, apresentando uma forma assintomática da infecção ou uma infecção subclínica que evoluía para a cura. Um terceiro grupo de crianças apresentavam uma forma subclínica que evoluía para a doença 2 a 10 meses após a soroconversão, e um último grupo apresentou, rapidamente após a infecção por *L. chagasi*, um quadro de leishmaniose visceral⁽⁶⁾. A detecção de indivíduos infectados ainda sem a doença permitiu também a caracterização da resposta imune a antígenos de leishmania antes do aparecimento da leishmaniose visceral. Esses achados demonstraram

nitidamente que as alterações imunológicas eram um achado precoce na infecção e que havia uma associação entre ausência ou baixa proliferação linfocitária e a capacidade reduzida de produzir IFN- γ e a progressão da infecção para a doença ⁽²⁰⁾. A Tabela 1 apresenta a resposta imune em crianças com infecção assintomática, com a forma subclínica, que evoluíram para cura e em crianças, com a forma subclínica, que evoluíram para leishmaniose visceral.

O acompanhamento dessas crianças recém-infectadas permitiu também determinar a cinética do aparecimento da resposta imune celular determinada por testes *in vitro* e *in vivo*. Assim é que enquanto por ocasião da soroconversão cerca de 51% das crianças que tiveram capacidade de controlar a infecção mostraram evidência *in vitro* de resposta imune celular (proliferação linfocitária ou produção de IFN- γ), nenhuma dessas crianças apresentaram teste cutâneo de hipersensibilidade tardia positivo para o antígeno de leishmania. Ao fim de 4 anos de acompanhamento, cerca de 83% das crianças deixaram de ter anticorpos contra *L. chagasi* e 62% apresentaram teste de hipersensibilidade tardia positivo ⁽²⁰⁾, mostrando que a positividade do teste de hipersensibilidade tardia ocorre após a negatificação da produção de anticorpos.

Embora os pacientes com leishmaniose visceral mostrem uma ativação policlonal de células B com grande produção de anticorpos, esses anticorpos não participam da resistência à leishmaniose. Níveis elevados de complexos imunes circulantes e auto-anticorpos são também observados no calazar ⁽¹⁵⁾. Exceto pela participação secundária que podem ter esses auto-anticorpos no desenvolvimento da anemia e da plaquetopenia observadas no calazar ⁽⁵¹⁾, manifestações clínicas associadas à deposição de complexos imunes não são características da leishmaniose visceral. Por exemplo, é descrito envolvimento renal no calazar, mas não existe uma glomerulonefrite importante nessa doença ⁽³⁰⁾.

As principais disfunções imunológicas na leishmaniose visceral estão relacionadas à imunidade mediada por células. Nestes pacientes, o teste de reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno do parasito (Reação de Montenegro) é negativo e a

conversão para uma resposta positiva ocorre após a cura ⁽²⁵⁾. O sobrenadante de células mononucleares, cultivadas com antígeno de leishmania, também não é capaz de ativar macrófagos para destruir leishmania *in vitro*, indicando que linfócitos desses pacientes não produzem citocinas capazes de ativar essas células ⁽¹⁹⁾. Ocorre também, *in vitro*, uma diminuição na produção da IL-1 e de TNF- α por células mononucleares do sangue periférico ⁽³⁶⁾ a despeito da documentação de níveis séricos elevados de TNF- α durante a doença ⁽⁸⁾. Essas alterações imunológicas têm participação importante na patogênese da doença. O IFN- γ é o principal ativador de macrófagos e, somente após ativação, essas células são capazes de destruir a leishmania ⁽⁴⁸⁾. Vários fatores participam da disfunção imunológica observada na leishmaniose visceral. O soro de pacientes com leishmaniose visceral é um potente inibidor da ativação celular e de proliferação linfocitária e a participação de lipídeos e o aumento dos níveis séricos do receptor solúvel de IL-2 participam desta supressão da resposta imune mediada pelo soro ⁽¹¹⁾. Essa supressão mediada por soro foi bem documentada quando doses sub-ótimas de mitógenos foram utilizadas para estimular células mononucleares de indivíduos sadios na presença de soro normal do tipo AB ou soros de pacientes com leishmaniose visceral ⁽¹⁸⁾. Entretanto, a supressão da resposta linfoproliferativa antígeno-específica ocorre mesmo na ausência de soro de pacientes com leishmaniose visceral e é mediada por células ⁽¹⁶⁾. Adicionalmente, tem-se observado alterações na função macrofágica, uma vez que células mononucleares do sangue periférico (PBMC) desses pacientes, quando estimulados *in vitro* com antígeno de leishmania, não produzem IL-1 ⁽³⁶⁾ e a infecção de macrófagos com esse parasito diminui a expressão de MHC classe II ⁽⁴¹⁾.

Existem indicações *in vitro* da atividade de células líticas contra macrófagos parasitados por leishmania, embora essa lise, não necessariamente, resulte em controle do parasito ⁽⁵⁶⁾. A atividade de células NK tem sido proposta como um importante mecanismo na defesa do hospedeiro contra infecções virais, por fungos e por protozoários ⁽⁵⁹⁾. Estudos *in vitro* com células de crianças com calazar demonstraram uma

Tabela 1. Associação entre resposta imune e desenvolvimento de doença em crianças residentes em uma área endêmica de leishmaniose visceral.

Formas Clínicas	Resposta Imune	
	IFN- γ (UI/mL)	Resposta Linfoproliferativa (Índice de Estimulação)
Assintomáticos	67 \pm 45	38 \pm 48
Subclínicos que não evoluíram para a doença	77 \pm 111	13 \pm 12
Subclínicos que evoluíram para a doença	7 \pm 5	1,8 \pm 1,5

deficiência da atividade de células NK nesses pacientes e a adição de IL-2 foi capaz de corrigir essa deficiência⁽⁴⁴⁾.

Embora o mecanismo das disfunções imunológicas na leishmaniose visceral não seja completamente esclarecido, admite-se que uma produção exacerbada de citocinas que tenham capacidade de suprimir a resposta imune celular desempenhe um papel importante na ausência da produção de IFN- γ e na sobrevivência da leishmania nos macrófagos. Existem evidências de que, na leishmaniose visceral humana, a ativação de células Th2 pode estar envolvida na progressão da doença. Foram demonstrados níveis altos de IL-4 no soro desses pacientes assim como também de IgE e IgG1^(3,63). Em clones de células específicas para o antígeno de leishmania, isolados de pacientes curados de calazar, observou-se, além de uma produção de IFN- γ , uma produção de IL-4 e de IL-10^(39,40). A interleucina-10, por ser uma citocina inibidora da resposta imune, principalmente por antagonizar a ação do IFN- γ , um ativador potente dos macrófagos para matar leishmania⁽⁴⁸⁾, é de grande interesse no estudo da leishmaniose visceral. Em pacientes sudaneses, a expressão de RNA mensageiro para IL-10 em células da medula óssea na fase ativa da doença diminui após a terapêutica⁽³⁸⁾. Um outro estudo realizado com pacientes infectados com *L. donovani* no Sudão demonstrou a presença de RNA mensageiro para IL-10 tanto em células de linfonodos quanto em células mononucleares desses pacientes. Após o tratamento, não foi possível detectar RNA mensageiro para essa citocina⁽³²⁾. A participação de células na modulação da resposta imune na leishmaniose visceral foi

inicialmente documentada em experimentos de co-cultura, onde foi mostrado que linfócitos obtidos durante a fase ativa da doença tinham a capacidade de suprimir a proliferação linfocitária de células obtidas após o tratamento e cura da leishmaniose visceral⁽¹⁶⁾. Posteriormente, em um estudo realizado com pacientes do Ceará infectados com *L. chagasi*, foi demonstrado que linhagens de células T CD8+ isoladas desses pacientes inibiram a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ por células desses mesmos pacientes após a terapêutica. Essas alterações foram associadas a um aumento de IL-6 e de IL-10. A adição de anticorpo neutralizante anti-IL-10 também reverteu a diminuição da produção de IFN- γ na presença dessas células⁽³⁷⁾. Todos esses dados indicam que essa citocina tem um papel importante na patogênese da leishmaniose visceral.

Sendo a principal anomalia na leishmaniose visceral, a incapacidade de desenvolver uma resposta do tipo Th1 e da IL-12 ser a mais importante citocina no desenvolvimento desse tipo de resposta, a ausência dessa citocina pode ser um fator importante nas alterações imunológicas observadas na leishmaniose visceral. Em um estudo realizado no Sudão, foi mostrado que células mononucleares de pacientes com leishmaniose visceral não produzem IL-12 quando estimuladas com antígeno de *L. donovani*, mas, após o tratamento, a produção dessa citocina é observada⁽³³⁾. Como a IL-12 tem também a capacidade de ativar células NK, este seria um possível mecanismo pelo qual a IL-12 pudesse colaborar na defesa contra a leishmania em adição à indução de uma resposta Th1.

Considerando que o principal achado imunológico na leishmaniose visceral é uma diminuição da produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico, a ausência dessa citocina impede a ativação de macrófagos e a destruição da leishmania. Estudos sobre a restauração *in vitro* da resposta imune não só são importantes para o entendimento da patogênese da doença como também são de grande relevância desde que a resposta imune celular está associada com o controle e a cura da infecção pela leishmania.

Estudos realizados em nosso meio demonstraram que a resposta linfoproliferativa antígeno-específica em pacientes com leishmaniose visceral pode ser restaurada pela adição *in vitro* de IL-2 e IFN- γ ⁽¹⁷⁾. Embora vários fatores possam contribuir para a ausência da resposta imune celular na leishmaniose visceral, as evidências de que existe nesta doença uma ativação de células Th2 e de células regulatórias da resposta imune indicam a importância de avaliar o papel de citocinas com atividade imunomoduladora na patogenia da leishmaniose visceral.

Para determinar o papel dessas citocinas (IL-4, IL-10) na patogênese da leishmaniose visceral, anticorpos neutralizantes anti-IL-4 e anti-IL-10 (citocinas relacionadas com susceptibilidade à doença em modelo experimental e inibidora da resposta imune respectivamente) foram adicionadas à cultura de células mononucleares do sangue periférico estimuladas *in vitro* com antígeno solúvel de *L. chagasi* (Figura 1).

Os níveis de IFN- γ em culturas estimuladas com antígeno de *L. chagasi* mais anti-IL-10 (97 ± 77 pg/mL) ou antígeno de *L. chagasi* mais anti-IL-10 e anti-IL-4 (112 ± 101 pg/mL) foram maiores ($p < 0,05$) do que os níveis observados em culturas estimuladas só com o antígeno de *L. chagasi* (13 ± 24 pg/mL) ou antígeno mais IL-4 (21 ± 17 pg/mL) ⁽¹⁷⁾. Esses estudos mostraram que, mais importante do que a resposta Th2 na modulação da resposta imune na leishmaniose visceral, é a produção de IL-10. A adição de IL-4 não teve praticamente nenhum efeito nesta modulação, enquanto a neutralização de IL-10 aumentou significativamente a produção de IFN- γ . Como pacientes curados de leishmaniose visceral restauram *in vitro* a proliferação linfocitária e a síntese de IFN-

γ , o papel de IL-10 na modulação da resposta imune foi também documentada em experimentos nos quais a adição exógena desta citocina foi feita em cultura de células de pacientes curados estimuladas *in vitro* com antígeno de leishmania. A adição de IL-10 suprimiu em 99% a resposta linfoproliferativa e em 100% a produção de IFN- γ . A adição de TGF- β (outra citocina supressora da resposta imune) nessas culturas não teve nenhum efeito na resposta linfoproliferativa e na produção de IFN- γ nesses pacientes ⁽⁵⁾.

A IL-12 é uma citocina produzida na fase inicial da resposta imune inata e tem papel fundamental na diferenciação de células Th1. A infecção *in vitro* de macrófagos com *L. donovani* mostrou que não só moléculas co-estimulatórias tem sua expressão diminuída como também há diminuição de produção de citocinas por essas células ⁽²⁴⁾. O papel da IL-12 na leishmaniose visceral foi documentado tanto através da adição exógena de IL-12 ou da neutralização desta citocina. Assim é que tanto a adição de IL-12 teve a capacidade de restaurar *in vitro* a proliferação linfocitária e a produção de IFN- γ em pacientes com doença ativa quanto a neutralização de IL-12, utilizando-se anticorpos monoclonais contra essa citocina, bloqueou a produção de IFN- γ em indivíduos curados de calazar ^(4,5).

A importância da IL-12 e da IL-10 na patogênese da leishmaniose visceral é mostrada na Figura 2 ⁽²⁵⁾. A média dos níveis de IFN- γ em culturas de células estimuladas *in vitro* com antígeno de leishmania foi zero e a adição de IL-12 aumentou os níveis dessa citocina para 305 ± 325 pg/mL. A IL-10, além de inibir a atividade de macrófagos, inibe a produção de IFN- γ por linfócitos através da inibição da síntese de IL-12 por células apresentadoras de antígenos ⁽²³⁾. Nestes estudos, enquanto a adição de IL-12 restaurou a resposta proliferativa e a produção de IFN- γ *in vitro*, a adição simultânea de IL-12 e IL-10 suprimiu o efeito mediado por IL-12, diminuindo a produção dessa citocina para zero (Figura 2). Esses resultados indicam que a IL-10 pode suprimir a resposta imune nesses pacientes com leishmaniose visceral através da inibição da síntese de IL-12 ao nível das células apresentadoras de antígeno.

Figura 1. Anticorpo monoclonal anti-IL10 restaura *in vitro* a produção de IFN- γ em pacientes com leishmaniose visceral.

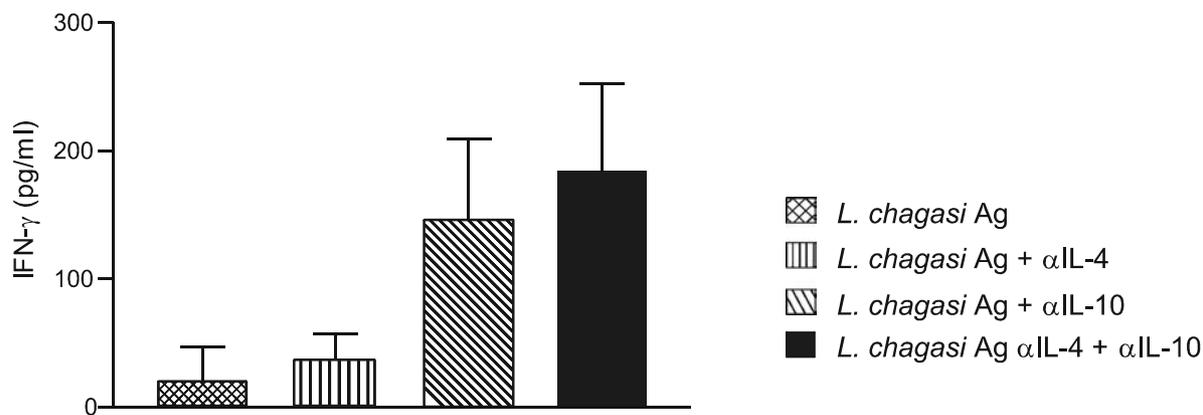
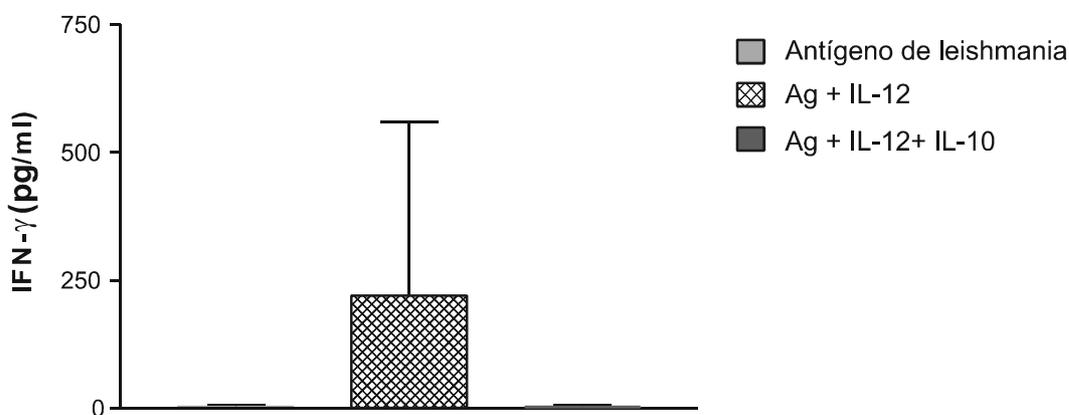


Figura 2. A IL-10 suprime a capacidade da IL-12 de restaurar a resposta imune em pacientes com leishmaniose visceral.



A Importância da Resposta Imune nas Manifestações Clínicas da Leishmaniose Visceral

A resposta imune na infecção causada por *Leishmania chagasi* está intimamente relacionada com o controle ou o desenvolvimento da doença, assim como as manifestações clínicas observadas na leishmaniose visceral. A incapacidade de ativar macrófagos para destruir a leishmania é o principal defeito nessa doença e essa anormalidade se associa com a multiplicação e disseminação do parasita e o

envolvimento de múltiplos órgãos como medula óssea, linfonodos, baço e fígado.

Pacientes com leishmaniose visceral apresentam níveis séricos altos de TNF- α ⁽⁸⁾ e de IL-6 ⁽²¹⁾, que diminuem após a terapêutica com antimonial. Essas citocinas estão relacionadas com febre e astenia e o TNF- α , também conhecido como caquexina, pode contribuir para a perda de peso e acentuar a desnutrição nesses pacientes. Febre e perda de peso são características marcantes da leishmaniose visceral. Emagrecimento, aumento de cílios e edema secundário

a hipoalbuminemia são observados principalmente em crianças.

Existe uma ativação policlonal de linfócitos B com produção exagerada de anticorpos inclusive auto-anticorpos. Essa ativação de linfócitos B leva a um quadro de hiperglobulinemia e à presença de auto-anticorpos e complexos imunes circulantes que poderiam ficar ligados ou adsorvidos às hemácias e conseqüentemente contribuir para a menor sobrevivência das hemácias e a anemia observada na leishmaniose visceral.

Mais recentemente, níveis elevados de TGF- β , biologicamente ativos, também foram documentados no plasma de pacientes com leishmaniose visceral; esses níveis diminuem após a cura da doença. A expressão de TGF- β tem sido também documentada na medula óssea desses pacientes. Apesar de até o momento não existirem evidências para um papel do TGF- β como modulador da resposta imune na leishmaniose visceral, sabe-se que essa citocina está associada com a inibição da proliferação celular e pode ter papel importante na redução da produção de hemácias, neutrófilos e plaquetas pela medula óssea e, dessa forma, também contribuir para a patogênese da leishmaniose visceral.

Referências Bibliográficas

1. Afonso LC, Scharon TM, Vieira LQ, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. The adjuvant effect of interleukin-12 in a vaccine against *Leishmania major*. *Science* 263: 235-237, 1994.
2. Andrade TM, Carvalho EM, Rocha H. Bacterial infections in patients with visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 162: 1354-1359, 1990.
3. Atta AM, D'Oliveira, Correa J, Atta ML, Almeida RP, Carvalho EM. Anti-leishmanial IgE antibodies: a marker of active disease in visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 59: 426-430, 1998.
4. Bacellar O, Brodskyn C, Guerreiro J, Barral-Netto M, Costa CH, Coffman RL, Johnson WD, Carvalho EM. Interleukin-12 restores interferon-gamma production and cytotoxic responses in visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 173: 1515-1518, 1996.
5. Bacellar O, D'Oliveira A, Jr., Jeronimo S, Carvalho EM. IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. *Cytokine* 12: 1228-1231, 2000.
6. Badaro R, Jones TC, Carvalho EM, Sampaio D, Reed SG, Barral A, Teixeira R, Johnson WD, Jr. New perspectives on a subclinical form of visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 154: 1003-1011, 1986.
7. Barral A, Barral-Netto M, Yong EC, Brownell CE, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor beta as a virulence mechanism for *Leishmania braziliensis*. *Proceedings National Academy of Science USA* 90: 3442-3446, 1993.
8. Barral-Netto M, Badaro R, Barral A, Almeida RP, Santos SB, Badaro F, Pedral-Sampaio D, Carvalho EM, Falcoff E, Falcoff R. Tumor necrosis factor (cachectin) in human visceral leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases* 163: 853-857, 1991.
9. Barral-Netto M, Barral A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 27: 1-9, 1994.
10. Barral-Netto M, Barral A, Brownell CE, Skeiky YA, Ellingsworth LR, Twardzik DR, Reed SG. Transforming growth factor-beta in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. *Science* 257: 545-548, 1992.
11. Barral-Netto M, Barral A, Santos SB, Carvalho EM, Badaro R, Rocha H, Reed SG, Johnson WD, Jr. Soluble IL-2 receptor as an agent of serum-mediated suppression in human visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 147: 281-284, 1991.
12. Bogdan C, Rollinghoff M, Diefenbach A. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunology Review* 173: 17-26, 2000.
13. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *Journal of Experimental Medicine* 174: 1549-1555, 1991.
14. Brandonisio O, Panaro MA, Fumarola I, Sisto M, Leogrande D, Acquafredda A, Spinelli R, Mitolo V. Macrophage chemotactic protein-1 and macrophage inflammatory protein-1 alpha induce nitric oxide release and enhance parasite killing in leishmania infantum-infected human macrophages. *Clinical Experimental Medicine* 2: 125-129, 2002.
15. Carvalho EM, Andrews BS, Martinelli R, Dutra M, Rocha H. Circulating immune complexes and rheumatoid factor in schistosomiasis and visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32: 61-68, 1983.
16. Carvalho EM, Bacellar O, Barral A, Badaro R, Johnson WD, Jr. Antigen-specific immunosuppression in visceral leishmaniasis is cell mediated. *Journal of Clinical Investigation* 83: 860-864, 1989.
17. Carvalho EM, Bacellar O, Brownell C, Regis T, Coffman RL, Reed SG. Restoration of IFN-gamma production and lymphocyte proliferation in visceral leishmaniasis. *Journal of Immunology* 152: 5949-5956, 1994.
18. Carvalho EM, Bacellar OA. Lymphocyte reactivity to mitogens in American visceral leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 16: 35-41, 1983.

19. Carvalho EM, Bacellar OA, Reed S, Barral A, Rocha H. Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania. *Brazilian Journal of Medical Biological Research* 21: 85-92, 1988.
20. Carvalho EM, Barral A, Pedral-Sampaio D, Barral-Netto M, Badaro R, Rocha H, Johnson WD, Jr. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani* chagasi. *Journal of Infectious Diseases* 165: 535-540, 1992.
21. Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K, Frommel D. Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *Journal of Infectious Diseases* 168: 986-993, 1993.
22. Chatelain R, Varkila K, Coffman RL. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *Journal of Immunology* 148: 1182-1187, 1992.
23. D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *Journal of Experimental Medicine* 178: 1041-1048, 1993.
24. De Almeida MC, Cardoso SA, Barral-Netto M. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory molecules on human monocyte and macrophage. *International Journal of Parasitology* 33: 153-162, 2003.
25. de Andrade T, R.Teixeira, J.A.de Andrade, C.Pereira, and E.M.de Carvalho. Hypersensitivity of delayed type in visceral leishmaniasis. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 24: 298-302, 1982.
26. de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174: 1209-1220, 1991.
27. de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE. Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. *Journal of Experimental Medicine* 174: 915-924, 1991.
28. Desjeux P. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clinical Dermatology* 14: 417-423, 1996.
29. Ding A, Nathan CF, Graycar J, Derynck R, Stuehr DJ, Srimal S. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *Journal of Immunology* 145: 940-944, 1990.
30. Dutra M, Martinelli R, de Carvalho EM, Rodrigues LE, Brito E, Rocha H. Renal involvement in visceral leishmaniasis. *American Journal Kidney Diseases* 6: 22-27, 1985.
31. Fundação Nacional de Saúde. Guia de Doenças da Fundação Nacional de Saúde. URL: http://www.funasa.gov.br/guia_epi/htm/doencas/leishmaniose_visceral.htm.
32. Ghalib HW, Piuevzam MR, Skeiky YA, Siddig M, Hashim FA, el-Hassan AM, Russo DM, Reed SG. Interleukin 10 production correlates with pathology in human *Leishmania donovani* infections. *Journal of Clinical Investigation* 92: 324-329, 1993.
33. Ghalib HW, Whittle JA, Kubin M, Hashim FA, el-Hassan AM, Grabstein KH, Trinchieri G, Reed SG. IL-12 enhances Th1-type responses in human *Leishmania donovani* infections. *Journal of Immunology* 154: 4623-4629, 1995.
34. Green SJ, Nacy CA, Meltzer MS. Cytokine-induced synthesis of nitrogen oxides in macrophages: a protective host response to leishmania and other intracellular pathogens. *Journal of Leukocyte Biology* 50: 93-103, 1991.
35. Heinzel FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings National Academy Science USA* 88: 7011-7015, 1991.
36. Ho JL, Badaro R, Schwartz A, Dinarello CA, Gelfand JA, Sobel J, Barral A, Netto MB, Carvalho EM, Reed SG, et al. Diminished *in vitro* production of interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha during acute visceral leishmaniasis and recovery after therapy. *Journal of Infectious Diseases* 165: 1094-1102, 1992.
37. Holaday BJ, Pompeu MM, Jeronimo S, Texeira MJ, Sousa Ade A, Vasconcelos AW, Pearson RD, Abrams JS, Locksley RM. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. *Journal of Clinical Investigation* 92: 2626-2632, 1993.
38. Karp CL, el-Safi SH, Wynn TA, Satti MM, Kordofani AM, Hashim FA, Hag-Ali M, Neva FA, Nutman TB, Sacks DL. *In vivo* cytokine profiles in patients with kala-azar. Marked elevation of both interleukin-10 and interferon-gamma. *Journal of Clinical Investigation* 91: 1644-1648, 1993.
39. Kemp K, Kemp M, Kharazmi A, Ismail A, Kurtzhals JA, Hviid L, Theander TG. leishmania-specific T cells expressing interferon-gamma (IFN-gamma) and IL-10 upon activation are expanded in individuals cured of visceral leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology* 116: 500-504, 1999.
40. Kemp M, Kurtzhals JA, Bendtzen K, Poulsen LK, Hansen MB, Koech DK, Kharazmi A, Theander TG. *Leishmania donovani*-reactive Th1- and Th2-like T-cell clones from individuals who have recovered from visceral leishmaniasis. *Infection and Immunity* 61: 1069-1073, 1993.

41. Kwan WC, McMaster WR, Wong N, Reiner NE. Inhibition of expression of major histocompatibility complex class II molecules in macrophages infected with *Leishmania donovani* occurs at the level of gene transcription via a cyclic AMP-independent mechanism. *Infection and Immunity* 60: 2115-2120, 1992.
42. Li J, Hunter CA, Farrell JP. Anti-TGF-beta treatment promotes rapid healing of *Leishmania major* infection in mice by enhancing in vivo nitric oxide production. *Journal of Immunology* 162: 974-979, 1999.
43. Liew FY, Li Y, Moss D, Parkinson C, Rogers MV, Moncada S. Resistance to *Leishmania major* infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. *European Journal of Immunology* 21: 3009-3014, 1991.
44. Manna PP, Bharadwaj D, Bhattacharya S, Chakrabarti G, Basu D, Mallik KK, Bandyopadhyay S. Impairment of natural killer cell activity in Indian kala-azar: restoration of activity by interleukin 2 but not by alpha or gamma interferon. *Infection and Immunity* 61: 3565-3569, 1993.
45. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136: 2348-2357, 1986.
46. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annual Review of Immunology* 7: 145-173, 1989.
47. Murray HW, Nathan CF. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *Journal of Experimental Medicine* 189: 741-746, 1999.
48. Murray HW, Rubin BY, Rothermel CD. Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine. *Journal of Clinical Investigation* 72: 1506-1510, 1983.
49. Nabors GS, Afonso LC, Farrell JP, Scott P. Switch from a type 2 to a type 1 T helper cell response and cure of established *Leishmania major* infection in mice is induced by combined therapy with interleukin 12 and Pentostam. *Proceedings National Academy Science U S A* 92: 3142-3146, 1995.
50. Pearson RD, Steigbigel RT. Phagocytosis and killing of the protozoan *Leishmania donovani* by human polymorphonuclear leukocytes. *Journal of Immunology* 127: 1438-1443, 1981.
51. Pontes De Carvalho LC, Badaro R, Carvalho EM, Lannes-Vieira J, Vinhaes L, Orge G, Marsochi MC, Galvao-Castro B. Nature and incidence of erythrocyte-bound IgG and some aspects of the physiopathogenesis of anaemia in American visceral leishmaniasis. *Clinical Experimental Immunology* 64: 495-502, 1986.
52. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunology Review* 177: 195-203, 2000.
53. Schariton TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *Journal Experimental Medicine* 178: 567-577, 1993.
54. Schariton-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M, Trinchieri G, Scott P. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *Journal of Immunology* 154: 5320-5330, 1995.
55. Scott P, Kaufmann SH. The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunology Today* 12: 346-348, 1991.
56. Smith LE, Rodrigues M, Russell DG. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and leishmania-infected macrophages. *Journal Experimental Medicine* 174: 499-505, 1991.
57. Sundar S, More DK, Singh MK, Singh VP, Sharma S, Makharia A, Kumar PC, Murray HW. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clinical Infectious Diseases* 31: 1104-1107, 2000.
58. Sypek JP, Chung CL, Mayor SE, Subramanyam JM, Goldman SJ, Sieburth DS, Wolf SF, Schaub RG. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. *Journal Experimental Medicine* 177: 1797-1802, 1993.
59. Trinchieri G. Biology of natural killer cells. *Advances Immunology* 47: 187-376, 1989.
60. Trinchieri G, Gerosa F. Immunoregulation by interleukin-12. *Journal of Leukocyte Biology* 59: 505-511, 1996.
61. WHO. The world health report 2001. Geneva:WHO.
62. Woodman RC, Johnston B, Hickey MJ, Teoh D, Reinhardt P, Poon BY, Kubes P. The functional paradox of CD43 in leukocyte recruitment: a study using CD43-deficient mice. *Journal Experimental Medicine* 188: 2181-2186, 1998.
63. Zwingenberger K, Harms G, Pedrosa C, Omena S, Sandkamp B, Neifer S. Determinants of the immune response in visceral leishmaniasis: evidence for predominance of endogenous interleukin 4 over interferon-gamma production. *Clinical Immunology Immunopathology* 57: 242-249, 1990.