

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**Moléculas associadas com migração, memória
imunológica e ativação celular em linfócitos T de
lesões de leishmaniose cutânea.**

POR

Carolina de Oliveira Mendes Aguiar

**Rio de Janeiro
2010**

Carolina de Oliveira Mendes Aguiar

Moléculas associadas com migração, memória imunológica e ativação celular em linfócitos T de lesões de leishmaniose cutânea.

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), da Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para a obtenção do grau de Doutor em Ciências, área de concentração: Imunologia

Orientadoras: Dra. Alda Maria da Cruz e Dra. Claude Pirmez

Rio de Janeiro

2010

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M538

Mendes-Aguiar, Carolina de Oliveira.

Moléculas associadas com migração, memória imunológica e ativação celular em linfócitos T de lesões de leishmaniose cutânea / Carolina de Oliveira Mendes-Aguiar. – Rio de Janeiro, 2010.

xvii, 88 f. : il. ; 30 cm.

Tese (doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2010.

Bibliografia: f. 79-88

1. Lesões leishmaniose cutânea. 2. Caracterização fenotípica dos linfócitos T. 3. Doenças infecciosas e parasitárias. I. Título.

CDD 616.9364

Carolina de Oliveira Mendes Aguiar

Moléculas associadas com migração, memória imunológica e ativação celular em linfócitos T de lesões de leishmaniose cutânea.

Banca Examinadora:

Dra. Euzenir N. Sarno
Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2010.

Dra. Hiro Goto
Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2010.

Dra. Walderez O. Dutra
Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2010.

Suplentes:

Dra. Fátima Conceição-Silva.
Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2010.

Dra. Claire F. Kulbelka
Rio de Janeiro, 25 de fevereiro de 2010.

**Rio de Janeiro
2010**

Dedico essa tese a minha mãe e as minhas filhas. Para que elas (filhas) se vejam em mim, o que eu vi em minha mãe.

Agradecimentos

Agradeço a Deus por tudo! Pela vida. Por ter me guiado até o presente momento. Agradeço por Ele estar comigo todo esse tempo, nessa longa caminhada, nos momentos bons e nos ruins. Por ter me dado as oportunidades necessárias para ter chegado até aqui, e não me deixar desistir, nem desviar o caminho ao encontrar um obstáculo. Obrigado!

Aos meus pais minha eterna gratidão. Por me ensinarem que a educação leva a educação. A minha mãe Carmen, por ter sido minha ou nossa (já que a Jaine também percorre esse caminho) primeira orientadora. Por me iniciar na pesquisa desde pequenininha (ainda em sua barriga na época do seu mestrado), quando ainda não entendia o que significava ser pesquisadora. Mas com o tempo, descobri a função e pude escolher conscientemente esse caminho. Pai, obrigado, mas nem sempre o caminho mais curto é o melhor. Às vezes precisamos ter paciência e perseverança para alcançar os objetivos. Obrigado pelos financiamentos de muitas das etapas por quais eu passei durante a caminhada. Jaine, obrigada por compor o trio das “doutoras” “super poderosas”.

Ao longo dessa longa caminhada a família aumentou... E agradeço a ela, a “Grande Família” que tenho, por vocês serem a “Grande Família” da minha vida. Ivan, Lu e Ju, vocês também fazem parte dessa estória. Nos meus momentos de fúria, nos momentos de tristeza, e nos de comemoração vocês estavam lá, ajudando, às vezes (acho que muitas) atrapalhando. O melhor de tudo era, após um dia difícil, ao chegar a casa, ver o sorriso de vocês. Preto, obrigado pelo companheirismo, amizade, amor. E também a todas as funções que você exerce no laboratório: meu motorista, violeiro, churrasqueiro, baba das crianças,... Obrigado.

Agradeço outra parte da “Grande Família”, a que me abraçou desde que me casei. Yeda, Joana, Aline. Mas nessa estória a Li tem quase que papel principal. Cunhada, vizinha, amiga, conselheira. O grude é tanto que até defendemos tese juntas! Tenho certeza que esses dias ruins de final de nossas teses ficaram marcados para sempre em nossas memórias. Não por serem dias ruins, mas pela amizade, companheirismo, por dividimos o mesmo escritório e as mesmas angústias dos dias que ainda estão por vir. E depois o que será? E a bolsa de Pós-Doc? O projeto foi aprovado? E o concurso, faz, não faz? Claro que FAZ!!! OBRIGADA.

Agradeço imensamente a Dra Alda, minha chefinha do coração. Alda, você me recebeu ainda que como sua aluna “laranja” no mestrado. Seu jeito meigo e doce, mas cheia de competência no trabalho que desenvolve, me cativou. Espero ter conseguido levar essa tese a altura dos seus sonhos, já que esta é parte da continuação do seu doutorado.

Agradeço a Dra. Claude por ter recebido como aluna de doutorado. Seus “toques” foram fundamentais para o crescimento e desenvolvimento da pessoa que sou hoje.

Agradeço aos meus irmãos de bancada Adriano e Joanna. Crescemos juntos nesse grupo. O que mais me orgulho de ter vocês como amigos é a nossa união, o espírito de grupo. Guardarei para sempre em minha memória e no meu coração a participação intensa de vocês na minha formação.

Aos amigos que fiz nesse grande grupo de pesquisa ao pertencço: Ricardo, Eduardo, Regina, Gisele, Claudia, Raquel, Joanna Valverde, e a todos os ICs que passaram pela gente. Obrigado por tornarem os dias de trabalho mais leve e animados.

Agradeço aos companheiros de bancada Eduardo Nunes, Patrícia Coelho, Cassio Porto Ferreira e Ana Cristina Almeida pela colaboração que tivemos durante o período de meu doutoramento.

Agradeço a Rosa Plácido, tecnóloga do Laboratório de Imunoparasitologia pela amizade, carinho. Mas também pelos conhecimentos passados. Pelos experimentos de camundongos e Hamster realizados. E pela colaboração nos experimentos que virão do Pós-Doc. Ainda teremos muito dias de trabalho juntos.

Agradeço as minhas alunas de iniciação científica Camilla Lopes Siqueira e Juliana Brum por me ensinarem a ensinar. Porque ensinar não é fácil.

Dra. Márcia Pereira de Oliveira pelos ensinamentos em imunohistoquímica e nas burocracias do laboratório.

Agradeço a plataforma de Citometria de Fluxo do IOC, coordenada pela Dra. Andrea Henriques Pons, e ao técnico Alessandro Marins pela utilização do citometro de fluxo Cyan e BDCalibur.

Agradeço a utilização do citômetro de fluxo da Unidade de Citometria de Fluxo da UERJ ao coordenador Dr. Geraldo Pereira.

Ao Dr. Álvaro Bertho e a Dra. Suse Barbosa pelos ensinamentos e discussões em citometria de fluxo.

Agradeço ao Dr. Manoel Paes de Oliveira Neto pelos atendimentos aos pacientes no ambulatório do IPEC.

Agradeço ao Prof. Edgar M de Carvalho e aos médicos do Serviço de Imunologia da UFBA – Luis Henrique, Paulo Machado – pelos atendimentos aos pacientes de Corte de Pedra. Agradeço imensamente ao Dr. Edgar por me receber em seu Serviço, apoiando nossa linha de pesquisa em lesões.

A secretária Rosangela Pelegrino (Laboratório de Imunoparasitologia) pelo serviços prestados e a diária companhia na hora do almoço.

Aos pacientes por aceitarem participar nesse estudo de pesquisa.

Agradeço ao CNPq pela da bolsa de doutorado recebida durante os anos de doutoramento.

Sumário

	página
Resumo	x
Abstract	xi
Lista de Abreviaturas	xii
Lista de Figuras	xv
Lista de Tabelas	xvii
I. Introdução	1
I.1. Sistema Imune da pele	1
I.2 – Composição celular das camadas da pele	2
I.3 – O SIS e os eventos iniciais na leishmaniose	3
I.4 – Migração linfocitária: moléculas de adesão e quimiocinas	4
I.5 – O parasito <i>Leishmania</i>	7
I.6- Leishmaniose tegumentar: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.....	8
I.7 - Importância do estudo das lesões de leishmaniose tegumentar americana	11
I.8- Caracterização histopatológica da lesão tegumentar de leishmaniose	13
I.9- Caracterização fenotípica das células do infiltrado inflamatório	14
I.10 – Perfil de citocinas e presença de quimiocinas no infiltrado inflamatório de lesões de LTA	16
II. Objetivos	18
II.1 – Objetivo geral	18
II.2 – Objetivos específicos	18
III. Resultados.....	19
III.1 – Artigo 1 (Publicado)	19
III.2 – Artigo 2 (em impressão)	28
III.3 – Resultados não publicados	37
III.3.1 – Material e Métodos	37
III.3.1.1 – Casuística	37
III.3.1.2 – Metodologia	40
– Obtenção do material biológico para ensaios laboratoriais	40
– Obtenção das células mononucleares de lesão cutânea	40
– Obtenção das células mononucleares de sangue periférico	41
– Caracterização fenotípica por citometria de fluxo das células mononucleares de lesões e do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea.....	41

– Aquisição de células imunomarcadas e análise fenotípica por citometria de fluxo	42
– Imunohistoquímica para detecção de células TCD4+, TCD8 ⁺ e quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES nas lesões de pacientes de leishmaniose cutânea.....	43
– Quantificação de células imunomarcadas e análise das imagens obtidas dos cortes histológicos estudados por imunohistoquímica	45
– Análise estatística	46
III. 3.2 – Resultados	47
III.3.2.1 – Caracterização fenotípica das células mononucleares de lesão na leishmaniose cutânea	47
III.3.2.2 - Correlação entre parâmetros clínicos e as análises imunológicas das células do infiltrado inflamatório das lesões de leishmaniose cutânea	54
III.3.2.3 – Caracterização fenotípica das CML em grupos de pacientes divididos segundo áreas endêmicas distintas (RJ x BA)	55
III.3.2.4 – Influência da proporção entre TCD4 ⁺ /TCD8 ⁺ observada no infiltrado inflamatório das lesões das lesões de leishmaniose cutânea na ativação e na função efetora dos linfócitos	59
III.3.2.5 – Presença das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES em lesões cutâneas de leishmaniose causada pela <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	62
IV. Discussão	65
V. Conclusões	78
VI. Referências Bibliográficas	79

Resumo

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença infecciosa causada, no Brasil, principalmente pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*, onde ocorre o acometimento de pele e mucosas. A resposta imune protetora na leishmaniose é mediada por células T antígenos específicos. A frequência destas células é muito mais elevada nas lesões do que no sangue periférico, o que demonstra que os eventos imunopatogênicos mais importantes devem estar ocorrendo no sítio infeccioso. O infiltrado inflamatório é do tipo granulomatoso, composto predominantemente por linfócitos, macrófagos e plasmócitos, com padrão de distribuição heterogêneo, o que não tem possibilitado uma boa correlação com o prognóstico da doença. As análises *in situ* também vêm mostrando resultados controversos em relação à distribuição das subpopulações CD4+ e CD8+. Entretanto, pouco se sabe sobre os mecanismos que determinam a formação do infiltrado inflamatório das lesões e como a função efetora influencia a patogênese ou a cura da leishmaniose. Assim, o presente trabalho teve como objetivo estudar o perfil fenotípico dos linfócitos das lesões cutâneas de leishmaniose em termos de migração, memória e ativação celular. Os resultados apresentados neste trabalho mostram que há um menor percentual de linfócitos T CLA+ no sangue periférico de pacientes de leishmaniose do que indivíduos saudáveis. A estimulação com antígenos de *Leishmania* aumenta o percentual de células T CLA+ nos pacientes de leishmaniose, mas o mesmo não ocorre com o percentual de células T CD62L+, sugerindo que os antígenos parasitários podem modular positivamente a migração de células para o sítio cutâneo. Corroborando com a hipótese de migração dos linfócitos para o sítio da infecção, foi demonstrado que há um maior percentual de células T CLA+ nas lesões do que sangue periférico. Uma vez que os linfócitos imigraram para as lesões, as células presente nesse sítio infeccioso demonstram ter um fenótipo de células de memória efetora, de células ativadas e expressam molécula associada à citotoxicidade. Os diferentes perfis imunológicos encontrados foram correlacionados com os dados clínicos dos pacientes (tempo de evolução, área da lesão e tamanho da IDRM), a fim de avaliar a influência dessas células na patogênese da leishmaniose. Os percentuais de linfócitos T e de células T CD8+ associadas à função citotóxica, e a frequência de células T de lesão específicas a *Leishmania*, assim como os percentuais de células TCD4+CD69+ e TCD3+CD244+ parecem influenciar na patogênese da doença, por se correlacionarem com a área e com tempo de evolução das lesões, respectivamente. Os dezenove pacientes estudados pertenciam a áreas endêmicas diferentes, sendo assim divididos: Rio de Janeiro (RJ) e Bahia (BA). Os pacientes das áreas endêmicas da BA e RJ diferiam no tempo de evolução das lesões, onde: pacientes da BA foram classificados como lesões recentes por terem tempo mediano de evolução de 30 dias, e pacientes do RJ com lesões tardias por terem tempo mediano de evolução de 81 dias. Os pacientes BA e RJ exibem diferentes moléculas de ativação células TCD4 ativadas, onde os pacientes BA têm maiores percentuais de células TCD4+CD25+ e os pacientes RJ tem maiores percentuais de células TCD4+CD69+, mas o mesmo não ocorre com as células TCD8+ ativadas. Esses dados sugerem lesões de pacientes BA e RJ devem ser influenciadas diferentemente por células TCD4 ativadas. É possível que células TCD4+CD69+ e TCD4+CD25+ devam ter funcionalidades diferentes, mas essa hipótese deve ser futuramente avaliada nos pacientes citados acima. As quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES estão presentes nas lesões de leishmaniose causadas pela *L. braziliensis*. Em conjunto, esses resultados demonstram que a infecção por *Leishmania* influencia a migração de linfócitos para a pele, com a modulação de moléculas de migração na superfície celular e com a produção de quimiocinas capazes de atrair essas células para o local da infecção. E que linfócitos presentes no infiltrado inflamatório com fenótipo de ativação e citotoxicidade podem influenciar na patogênese da leishmaniose cutânea.

Abstract

American tegumentary leishmaniasis is an infectious disease, and in Brazil, is caused mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. The disease manifests as localized cutaneous leishmaniasis or mucosal leishmaniasis. Immune protector response is mediated by specific T cells. The frequency of these cells is high in lesions than in peripheral blood, and suggests that more important immunological events occur in the infectious site. The inflammatory infiltrate is granulomatous type, and compose mainly by macrophages, plasmocytes and lymphocytes, with heterogeneous distribution. The histopathological pattern has no correlation with disease prognostic. *In situ* analyses have shown controversial results about TCD4+ and TCD8+ cells. Although, little is known about the mechanism that lead the inflammatory infiltrate formation and how effector cells influence in leishmaniasis pathogenesis or cure. The objective of present work was analysed leishmaniasis lesions T cell composition in terms of homing, memory and activation molecules expression. Lower levels of CLA T cells were observed in blood of LC patients than in healthy subjects. Leishmanial antigens up-regulated CLA in T cells from cutaneous leishmaniasis patients but not from healthy subjects. In contrast, CD62L is not affected. Corroborating with T cell migration to infection sites, an enrichment of CLA+ cells was observed lesion in comparison with blood. Once infiltrate to lesions, T cells express activation and citotoxic molecules, and effector memory phenotype. The frequency of *Leishmania* specific T cell lesions, percentual of TCD3+ cells and TCD8+CD244+ cells are associated with lesion area. The percentual of TCD4+CD69+ cells and TCD3+CD244+ cells are correlated with duration of illness. The patients analysed were grouped by endemic area of study, Bahia or Rio de Janeiro. Different endemic area patients have different duration of illness: recent lesion was observed in Bahia's patients and late lesion was evaluated in Rio de Janeiro's patients. Bahia and Rio de Janeiro patients' had different TCD4 activation pattern, where Bahia patients had higher levels of TCD4CD25 T cells and Rio de Janeiro patients had higher levels of TCD4CD69 T cells. In this work, was proposed TCD4/TCD8 ration classification, where than patients with similar levels of TCD4 and TCD8 cells have a equilibrated response with less activated and citotoxic T cells. CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α and CCL5/RANTES are present is cutaneous leishmaniasis lesions caused by *L.braziliensis*. All these results showed *Leishmania* infection can influence the migration pattern to skin, modulating the homing molecules and chemokine production. Activated and citotoxic T lymphocytes can influence the leishmaniasis pathogenesis.

Lista de Abreviaturas

- BA – Estado da Bahia
- CCL – Quimiocina da família CC
- CCR – Receptor para quimiocinas da família CC
- CD – *Cluster of differentiation*
- CD62L – L-selectina
- CLA – Antígeno linfocitário cutâneo
- cm² – centímetro quadrado
- CML – Células mononucleares de lesão
- CMSP – Células mononucleares do sangue periférico
- CTLA-4 – Antígeno de linfócito T citotóxico - 4
- DC – Células dendríticas
- DN – Células duplo-negativas
- DNA – Ácido desoxirribonucléico
- ELISA – Ensaio imunoenzimático
- FITC – Isotiocianato de fluoresceína
- FSC – *Forward scatter* (tamanho)
- GITR – Receptor de glucocorticóide induzido por TNF
- GM-CSF – Fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos
- HEPES – *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic*
- HIV – Vírus da imunodeficiência humana
- HLA – Antígeno leucocitário humano
- ICAM – Molécula de adesão intracelular
- IDRM – Intradermorreação de Montenegro
- IFN - Interferon
- IL - Interleucina
- LC – Leishmaniose cutânea

LDiss – Leishmaniose disseminada

LFA – Antígeno associado à função linfocitária

LM – Leishmaniose mucosa

LMC – Leishmaniose muco-cutânea

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

MCP – proteína quimiotática de macrófagos

M-CSF – Fator de estimulação de colônias de macrófagos

MEC – Matriz extracelular

MHC – Complexo de histocompatibilidade principal

MIP – Proteína inflamatória macrofágica

mm - milímetro

NK – células matadoras naturais

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBS – Tampão fosfato salino

PC5 – Ficoeritrina-Cianina 5

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PE – Ficoeritrina

PPD – derivado de proteína pura

RANTES – *Regulated upon activation normal T cell expressed and secreted*

RJ – Estado do Rio de Janeiro

RNA – Ácido Ribonucleico

SIS – Sistema imune da pele

SSC – *side scatter* (granularidade)

T_{MC} – Células de memória central

TCR – Receptor de células T

T_{ME} – Células de memória efetora

T_{EMRA} – Células de memória efetora que re-expressão o CD45RA

TGF – Fator de Crescimento Tumoral

TIA – Grânulo citotóxico associado à proteína ligadora de RNA

TNF – Fator de necrose tumoral

VLA – *Very late antigen*,

Lista de Figuras

Figura 1 – Esquema representativo das análises citofluorimétricas realizadas para as células mononucleares de lesões. Página 43

Figura 2 – Análise do percentual de células T e suas subpopulações no infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea. Pagina 48

Figura 3 – Análise citofluorimétrica para detecção do percentual de células duplo negativa de lesões de leishmaniose cutânea. Pagina 49

Figura 4 – Avaliação da população de células de memória através da presença da molécula CD45RO em linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ nas lesões de leishmaniose cutânea. Página 50

Figura 5 – Análise citofluorimétrica das moléculas associadas à diferenciação celular CD45RO e CCR7 em células de lesões de leishmaniose cutânea. Página 51

Figura 6 – Avaliação do perfil de diferenciação celular das células TCD4⁺ e TCD8⁺ por dupla avaliação das moléculas CD45RO e CCR7. Página 52

Figura 7 – Percentual de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ ativados, expressando as moléculas CD25 e CD69 em células de lesão de pacientes com leishmaniose cutânea. Página 53

Figura 8 – Percentual de células TCD8⁺ de lesões de pacientes de leishmaniose cutânea exibindo moléculas de ativação CD38 e citotoxicidade CD244. Página 54

Figura 9 – Análise imunofenotípica de linfócitos da lesão de leishmaniose cutânea de pacientes provenientes de duas regiões endêmicas distintas. Página 56

Figura 10 – Percentual de células T expressando as moléculas de ativação CD25 e CD69 em linfócitos de lesão de leishmaniose cutânea de pacientes provenientes de duas regiões endêmicas distintas. Página 58

Figura 11 – Percentual de células TCD3⁺ e TCD3⁺CD8⁺ expressando a molécula associada à citotoxicidade CD244 em linfócitos de lesão de leishmaniose cutânea de pacientes provenientes de duas regiões endêmicas distintas. Página 59

Figura 12 – Análise da relação entre as subpopulações de linfócitos T (razão TCD4/TCD8) nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, onde o grupo I consiste nos pacientes com %TCD4⁺ maior que o %TCD8⁺; o grupo II são pacientes com o %TCD4⁺ igual ao %TCD8⁺; e o grupo III, pacientes com o %TCD4⁺ menor que o %TCD8⁺. Página 60

Figura 13 – Percentual de células TCD4 e TCD8 ativadas obtidas de pacientes de leishmaniose cutânea nos grupos de pacientes estratificados segundo a razão TCD4/TCD8. Página 61

Figura 14 – Percentual de células TCD8⁺CD244⁺ (citotóxicas) obtidas de pacientes de leishmaniose cutânea nos grupos de pacientes estratificados segundo a razão TCD4/TCD8. Página 62

Figura 15 – Foto representativa da marcação por imunohistoquímica para CCL2/MCP-1 em lesões cutâneas de leishmaniose. Página 63

Figura 16 – Foto representativa da imunomarcação para CCL3/MIP-1 α em lesões de leishmaniose. Página 63

Figura 17 – Foto representativa da imunomarcação para CCL5/RANTES em lesões de leishmaniose. Página 64

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Componentes celulares e humorais do sistema imune da pele. Página 2

Tabela 2 – Dados clínicos dos pacientes analisados quanto ao perfil fenotípico celular do infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea. Página 39

Tabela 3 – Combinação de anticorpos monoclonais utilizados na caracterização dos linfócitos de lesões de leishmaniose cutânea. Página 42

Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes estudados quanto ao perfil fenotípico celular e presença de quimiocinas no infiltrado inflamatório das lesões de leishmaniose cutânea por imunohistoquímica. Página 44

Tabela 5 – Características clínicas dos pacientes provenientes do Rio de Janeiro e da Bahia. Página 55

I. Introdução

I.1. Sistema Imune da pele

A pele humana é o maior órgão do corpo humano e recobre aproximadamente 1,5 a 2m² da área total do corpo. Sua função principal é ser barreira física com o meio externo (ambiente), e por isso protege-nos contra uma infinidade de injúrias, sejam estas química, física ou mecânica (Tobin, 2006). Além disto, também mantém a homeostase do meio interno, prevenindo-nos da desidratação (Bos, 2005).

A pele é subdividida em epiderme, derme e hipoderme (Chu & Morris, 2005), onde a epiderme é a camada mais externa, estratificada, não vascularizada. Nesta camada, a maioria das células encontradas (90-95%) são os queratinócitos (Spellberg, 2000). A epiderme também abriga quatro outros tipos celulares menos abundantes: melanócitos, células de Langerhans, células de Merkel, e células migrantes (Mihm *et al.*, 2008). Cerca de 1% das células da epiderme são linfócitos, localizados próximo à membrana basal, adjacentes as células de Langerhans (Spellberg, 2000).

A derme está situada logo abaixo da epiderme. É um tecido conectivo composto com número menor de células que a epiderme, envoltas por moléculas fibrosas que compõem a matriz extracelular (MEC). Na derme se situa uma rede de vasos sanguíneos periféricos e profundos (Mihm *et al.*, 2008). A célula principal da epiderme é o fibroblasto. Sua função principal é produzir e degradar a MEC, além de secretar fatores de crescimento que são necessários para a sobrevivência de leucócitos e queratinócitos (Spellberg, 2000; Tobin, 2006). A derme contém muitas células associadas ao sistema imunológico, como células dendríticas, linfócitos, mastócitos e macrófagos (Li & Urmacher, 2007).

Em 1986, Bos e colaboradores propuseram que a pele compreendia um sistema imune próprio, denominando-o sistema imune da pele - "Skin immune system" (SIS), devido à complexidade de respostas associadas às células presentes na pele humana normal, e de evidências das funções imunes destas células (Bos, 2005). As células imunocompetentes da pele também podem ser divididas em células do sistema imune inato ou células do sistema imune adaptativo, as quais podem recircular, serem recrutadas ou serem residentes deste compartimento. Adicionalmente, foram incluídos neste conceito de SIS, constituintes humorais da pele (Bos, 2005).

Tabela 1 – Componentes celulares e humorais do sistema imune da pele

Constituintes Celulares	Constituintes Humorais
Queratinócitos	Defensinas
Células de Langerhans	Componentes do sistema complemento
Células dendríticas	Lectinas ligadoras de manose
Monócitos/Macrófagos	Imunoglobulinas
Granulócitos	Citocinas/Quimiocinas
Mastócitos	Neuropeptídeos
Células endoteliais	Eicosanóides
Linfócitos T	Radicais livres

(Adaptado de Bos, 2005)

I.2 – Composição celular das camadas da pele

Os queratinócitos são 90% das células da epiderme. São importantes na formação da barreira física por produzirem a resistente fibra de queratina. Os queratinócitos presentes na membrana basal da epiderme são capazes de proliferar e promover a renovação celular da epiderme, enquanto que as camadas adjacentes se diferenciam no processo de queratinização (Mihm *et al.*, 2008). Durante a homeostase, há um equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e a descamação. Entretanto, em alguns processos patológicos esse equilíbrio é quebrado. Os queratinócitos estão envolvidos em muitos processos inflamatórios e imunológicos. Estes são células importantes para o sistema imune, pois além de expressarem moléculas de do complexo maior de histocompatibilidade (MHC) de classe II (HLA-DR), moléculas de adesão intracelular 1 (ICAM-1) e a molécula co-estimulatória B7.1, secretam constitutivamente ou podem ser induzidos por citocinas a secretar várias citocinas que influenciam na resposta imune (Chu & Morris, 2005). Além disso, produzem grandes quantidades de interleucina (IL)-1 α , fator de necrose tumoral (TNF) e β -defensinas em resposta a vários estímulos, como por exemplo, o trauma (Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

Ainda na epiderme, as células de Langerhans são cerca de 2% das células. São as células com maior capacidade de apresentação de antígeno presentes na pele (Salmon *et al.*, 1994). São células migratórias e por isso, quando presentes na derme, podem representar células que capturaram antígenos na epiderme e estão em processo de migração para o linfonodo (Teunissen, 2005).

Os linfócitos representam 1% das células da epiderme e são freqüentemente encontrados na lâmina basal, junto às células de Langerhans. Na derme se encontram cerca de 90% dos linfócitos da pele (Salmon *et al.*, 1994). A maioria das células T são CD4⁺ ou CD8⁺, e expressam receptor de célula T (TCR) $\alpha\beta$. As subpopulações de linfócitos (TCD4⁺ e TCD8⁺) são encontradas em números equivalentes, diferentemente da epiderme que contém mais células CD8⁺. São principalmente linfócitos com fenótipo de memória, ou seja, que apresentam a molécula CD45RO⁺ (Bos *et al.*, 1987; Spellberg, 2000).

Além de linfócitos, a derme é composta por fibroblastos que produzem colágeno e elastina, componentes da matriz extracelular (Spellberg, 2000). Estes produzem significantes quantidades de citocinas; secretam fatores de crescimento necessários para a sobrevivência de linfócitos e queratinócitos, além de serem os grandes responsáveis pelo reparo tecidual por produzirem as proteínas estruturais da matriz extracelular (Spellberg, 2000).

I.3 – O SIS e os eventos iniciais na leishmaniose

É nesse contexto de SIS que ocorrem os processos imune-patológicos aos qual a leishmaniose tegumentar se enquadra. A picada do inseto vetor dilacera o tecido cutâneo formando uma poça de sangue onde com sua curta probóscide suga o sangue do hospedeiro vertebrado e libera neste local as promastigotas metacíclicas (De Almeida *et al.*, 2003). Numa primeira fase da infecção, as promastigotas metacíclicas invadem os macrófagos residentes da pele via receptor de complemento 3 (CR3). Nesta etapa é a fase silenciosa da infecção, onde ainda não há sinais clínicos da infecção (Von Stebut, 2007). É no tecido cutâneo, concomitante a invasão de macrófagos, que ocorrem os eventos imunológicos que culminarão com a formação da lesão. Assim, após uma injúria na pele, a resposta imune inata inicial é dada pelos queratinócitos que armazenam IL-1 α em seu citoplasma e, ao serem rompidos, liberam na matriz extracelular, atingindo outros queratinócitos que passam a produzir e liberar IL-1 α , IL-1 β , TNF- α e IL-6, amplificando assim a resposta inicial. Os queratinócitos também produzem IL-8, fator de estimulação de colônias de macrófagos (M-CSF), fator de estimulação de colônias de macrófagos e granulócitos (GM-CSF), IL-7 e IL-15. Todos esses estímulos passam pela membrana basal, e chegam à derme, onde os fibroblastos amplificam a resposta da epiderme liberando IL-1, TNF- α e IL-6. Todo esse fluxo de citocinas chega aos vasos sanguíneos da derme

promovendo um gradiente de concentração desde os vasos sanguíneos até o local da infecção (Bos & Kapsenberg, 1993; Spellberg, 2000; Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

Com a ativação das células dos vasos sanguíneos cutâneos, inicia-se o influxo de células inatas (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos). Nesta fase, os macrófagos, além de albergarem os parasitos, também produzem citocinas pro-inflamatórias que irão recrutar mais células para o local da infecção (Von Stebut, 2007). Neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (DC) infiltrantes são duplamente importantes: por albergarem o parasito e controlarem a disseminação da doença (Maurer *et al.*, 2009). As células de Langerhans migram para o linfonodo drenante mais próximo e durante essa migração passam pelo processo de ativação de maneira que ao chegarem ao linfonodo possuem as moléculas co-estimulatórias necessárias para a ativação das células T (Maurer *et al.*, 2009). No linfonodo drenante, as DC encontram células T 'naive', e essas são primadas pelo reconhecimento TCR-antígeno/MHC. As células 'naive' levam alguns dias para que sejam ativadas, proliferem e migrem para o local da infecção. O recrutamento de mononucleares é a segunda parte da resposta. As células ativadas do endotélio expressam E- e P-selectinas e secretam quimiocinas. Assim, os leucócitos sanguíneos passam a migrar para o sítio da infecção com o auxílio das moléculas de adesão expostas pelo endotélio local (Spellberg, 2000; Kupper & Fuhlbrigge, 2004). A diferenciação de linfócitos que estão chegando no sítio inflamatório depende do estímulo de citocinas encontrado no local da inflamação (Bos & Kapsenberg, 1993; Spellberg, 2000; Kupper & Fuhlbrigge, 2004).

I.4 – Migração linfocitária: moléculas de adesão e quimiocinas

A migração linfocitária é um processo altamente especializado onde participam células, moléculas de superfície e fatores quimiotáticos. Esse processo não ocorre de forma aleatória, depende de uma série de combinações entre ligante-receptores para que a migração para determinado órgão ocorra (Butcher & Picker, 1996). Adicionalmente, as moléculas envolvidas na migração linfocitária podem ter funções sobrepostas (Schön *et al.*, 2003). Pode ser considerado como dicotômico devido à distribuição diferencial dos linfócitos "naives" e de memória/efetores nos tecidos (Picker, 1994). Os linfócitos "naive" migram e recirculam em os órgãos linfóides secundários e apresentam o fenótipo CD45RA⁺ (ou CD45RO⁻)/CD62L⁺/CCR7⁺. Já os linfócitos de memória central (T_{CM}) apresentam o fenótipo CD45RO⁺/L-selectina (CD62L)⁺/CCR7⁺, sendo o CD62L e o CCR7 moléculas necessárias para a entrada

destes linfócitos em órgãos linfóides secundários. E, finalmente, os linfócitos efetores (T_{EM}) que acessam sítios terciários e expressam CD45RO, mas perdem o CD62L e o CCR7 (Picker, 1994; Sallusto *et al.*, 2004). Os linfócitos T_{EM} capazes de migrar para pele também expõem em sua superfície a molécula antígeno linfocitário cutâneo (CLA) (Santamaria-Babí, 2004).

O processo de recrutamento linfocitário é subdividido em quatro etapas (Butcher & Picker, 1996). Inicialmente ocorre a adesão primária ou rolamento, onde co-receptores constitutivos dos linfócitos interagem com ligantes presentes na superfície das células endoteliais no fluxo sanguíneo. Essa adesão inicial é instável e transitória, podendo ser perdida se não houver os receptores necessários pra a segunda adesão. Dentre os receptores envolvidos nesta etapa estão: selectinas (L-, P- e E-) no endotélio, e o CLA ou CD62-L nos linfócitos. A adesão secundária é dependente de ativação do linfócito (Picker, 1994). A ativação ocorre devido à presença de quimiocinas ligadas a proteínas G na membrana das células endoteliais (Von Andrian & Mackay, 2000). A ativação do linfócito leva à expressão das moléculas antígeno associado à função linfocitária (LFA, *lymphocyte function antigen*)-1 e antígeno muito tardio-4 (VLA-4, *very late antigen*) e após a ligação destas moléculas com suas contrapartes ocorre então a firme adesão da célula ao endotélio (Picker, 1994; Von Andrian & Mackay, 2000). A etapa final é a transmigração do linfócito (diapedese) do vaso sanguíneo pra o tecido e a migração celular através da matriz extracelular (Schön *et al.*, 2003). As proteínas da matriz extracelular (laminina, fibronectina, colágenos) são utilizadas pelos linfócitos para migrarem até o sítio de infecção utilizando os receptores do tipo β -integrinas para a migração (Schön *et al.*, 2003).

No processo migratório além das moléculas de adesão, as quimiocinas também têm importante papel não só como fatores quimiotáticos para a atração de células para o sítio da infecção, mas também para a migração de células T para um local específico (ex. CCR7 que auxilia na migração das células para os órgãos linfóides secundários) (Campbell & Butcher, 2000).

As quimiocinas são proteínas com capacidade quimioatratadora secretadas por leucócitos ou células teciduais (Baggiolini & Loetscher, 2000). A classificação atual é baseada na presença de resíduos de cisteína terminais, ligados ou não por uma ou mais cadeias de aminoácidos entre os resíduos de cisteínas seguida da letra L, que se refere à ligante (Moser *et al.*, 2004). Assim, as quimiocinas podem ser classificadas

em quatro subfamílias: C (gama), CC (beta), CXC (alfa) e CX₃C (delta) (Rossi & Zlotnik, 2000; Moser *et al.*, 2004).

As quimiocinas se ligam a receptores que possuem sete domínios transmembrana ligados à proteína G. A nomenclatura dos receptores quimiocinas baseia-se na classe de quimiocina a qual este se liga, seguido da letra R de receptor (Rossi & Zlotnik, 2000). As quimiocinas possuem duas características próprias que são: promiscuidade e redundância, isto é: uma determinada quimiocina pode se ligar a mais de um receptor e, várias quimiocinas podem se ligar a um mesmo receptor, respectivamente (Luster, 1998; Zlotnik *et al.*, 2006; Colobran *et al.*, 2007).

Outra forma de classificação baseia-se no aspecto fisiológico das quimiocinas dividindo-as em: quimiocinas homeostáticas ou constitutivas, inflamatórias ou induzidas e quimiocinas com função dupla, isto é, com função homeostática e inflamatória (Moser & Loetscher, 2001; Moser *et al.*, 2004). As quimiocinas inflamatórias são expressas em tecido inflamado por células residentes e por células infiltrantes através da ativação destas células por citocinas pró-inflamatórias (Moser & Loetscher, 2001). O CCL2/MCP-1 (*monocyte chemotactic protein-1*; proteína quimiotática de monócitos-1), o CCL3/MIP-1 α (*macrophage inflammatory protein – 1 α* ; proteína inflamatória de macrófagos-1 α) e o CCL5/RANTES (regulated upon activation normal T cell expressed and secreted; expressa e secretada por células T normais regulada por ativação) são quimiocinas inflamatórias da família CC, que atraem monócitos, leucócitos e células T de memória e efetoras (Loetscher *et al.*, 1994; Luther & Cyster, 2001; Proudfoot, 2002). As quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES são quimiocinas bem estudadas pelo fato de apresentarem importância na infecção do vírus HIV-1 (Appay & Rowland-Jones, 2001; Maurer & Von Stebut, 2004).

A CCL2/MCP-1 quimiocina tem ação quimiotática principalmente em monócitos e células TCD4+ e TCD8+ de memória e expressando moléculas de ativação (Carr *et al.*, 1994). A produção de CCL2/MCP-1 é induzido por estímulos inflamatórios como IL-1, TNF-A e IL-4. As principais células que produzem são DC, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos (Luther & Cyster, 2001). CCR2 é o principal receptor desta quimiocina e está presente em macrófagos e células T. Além do papel quimiotático, o CCL2/MCP-1 tem sido relacionado com a diferenciação celular, uma vez que essa quimiocinas parecer diminuir a resposta Th₁ (Luther & Cyster, 2001).

Já as quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, são produzidas por células com perfil Th₁ (Schrum *et al.*, 1996). Essas quimiocinas se ligam aos receptores CCR1

e CCR5, que são expressos em monócitos e células CD45RO+ com perfil Th₁ (Weber *et al.*, 2001). Baixa concentração de CCL3/MIP-1 α atraem preferencialmente células TCD4 de memória, enquanto que a alta concentração da mesma atrai tanto células TCD4 quanto células TCD8 com fenótipo de memória, sugerindo que diferenças na produção desta quimiocina podem influenciar na composição do infiltrado (Schall *et al.*, 1993). CCL3/MIP-1 α produzido por macrófagos influencia a cicatrização de lesões atraindo monócitos para o local (Dipietro *et al.*, 1998).

CCL5/RANTES passou a ser melhor estudado após descoberta que essa quimiocina é um potente inibidor da replicação do vírus HIV (Appay & Rowland-Jones, 2001). É produzida principalmente por células TCD8+, células epiteliais, fibroblastos e plaquetas (Appay & Rowland-Jones, 2001). Exerce sua ação quimioatratória não só em monócitos e células T, mas também em basófilos, eosinófilos, mastócitos, células NK e dendríticas. Sua expressão está aumentada em lesões na pele sadia (ex.corte)(Frank *et al.*, 2000) e em lesões de psoríase (Fukuoka *et al.*, 1998). Além de se ligar aos receptores CCR5 e CCR1, também pode se ligar a células TH₂ e eosinófilos que expressem o receptor CCR3 (Weber *et al.*, 2001).

1.5 – O parasito *Leishmania*

A leishmaniose é uma antroponose onde, os protozoários do gênero *Leishmania*, são parasitos intracelulares obrigatórios transmitidos pela picada do inseto vetor geralmente conhecidos como flebotomos (Roberts, 2006). Os parasitos do gênero pertencem ao filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, e está organizada em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (Da-Cruz & Pirmez, 2005). É um parasito dimórfico: nos vertebrados, as leishmânias promastigotas metacíclicas são ingeridas por células do sistema fagocítico e se replicam como amastigotas imóveis, esféricas, dentro de fagolisossomo; e nos vetores invertebrados, as formas amastigotas se diferenciam em formas promastigotas flageladas (Cunningham, 2002). A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo do inseto vetor gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Durante o ciclo evolutivo, o parasito sofre modificações morfológicas e moleculares que permitem que ele sobreviva nos diversos microambientes por onde ele passa (Rey, 2001).

Dependendo das características clínicas podemos classificar a leishmaniose em tegumentar ou visceral (Ministério Da Saúde, 2007). Dentre os parasitos que

podem causar a doença em humanos, onze espécies dermatrópicas de *Leishmania* foram caracterizadas nas Américas, dentre estas sete ocorrem no Brasil, são elas: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis*, e em menor frequência de casos: *L. (V.) lainsoni*, a *L. (V.) shawi*, a *L. (V.) naiffi* e a *L. (V.) lindenbergi* (Da-Cruz & Pirmez, 2005; Ministério Da Saúde, 2007).

I.6- Leishmaniose tegumentar: aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais.

A leishmaniose tegumentar é uma doença negligenciada, considerada um problema da saúde pública. Esta é endêmica em 88 países, distribuídos nos quatro continentes, e em apenas 33 países a notificação da doença é obrigatória (Ministério Da Saúde, 2007). Noventa por cento dos casos de leishmaniose tegumentar ocorrem no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Algeria, Irã, Brasil e Peru (Murray *et al.*, 2005). Estimativas, embora bastante antigas, da Organização Mundial da Saúde (OMS) consideravam que a incidência anual é 1-1,5 milhões de novos casos (Ministério Da Saúde, 2007) e que 12 milhões de indivíduos sofrem de leishmaniose no mundo, com cerca de 2 milhões de novos casos esperados todos os anos (O.M.S., 2009). A leishmaniose é considerada uma doença emergente em algumas áreas, e re-emergentes em outras (Shaw, 2007), estando atualmente com uma área de distribuição geográfica muito maior que no passado (O.M.S., 2002). Fatores ambientais, políticos e socioeconômicos contribuem para a expansão da doença (O.M.S., 2002). Outros fatores importantes para a dispersão da doença são: a urbanização, a globalização e a ineficácia do tratamento (Shaw, 2007).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) ocorre desde o sul dos Estados Unidos da América até o norte da Argentina, abrangendo 24 países (Da-Cruz & Pirmez, 2005). No Brasil, no período de 1998 a 2007 foram registrados 27 mil novos casos anuais de leishmaniose tegumentar, sendo as regiões Norte e Nordeste com os maiores percentuais de casos (Ministério Da Saúde, 2009). No ano de 2003, foi constatado o aumento da área geográfica da LTA no Brasil, atingindo todo o território brasileiro (Ministério Da Saúde, 2007). Só em 2007 foram confirmados, até o momento, 21.407 casos, sendo 46,2% na região Norte, seguida da região Nordeste, com 27,7% dos casos nacionais (Ministério Da Saúde, 2009).

Historicamente, a LTA foi associada a atividades rurais, onde homens adultos eram os mais acometidos. Entretanto, mudanças ambientais resultantes de ação

antrópica modificaram a ocorrência da doença, e atualmente a leishmaniose é considerada uma doença de distribuição rural, peri-urbana e urbana (Reithinger *et al.*, 2007). A *L. (V). braziliensis* é a espécie largamente distribuída, presente tanto na América Central como na América do Sul. No Brasil, a *L. braziliensis* ocorre de forma autóctone em 27 estados da federação e a leishmaniose cutânea é a forma clínica mais comum (Ministério Da Saúde, 2009).

A leishmaniose causada pela *L. braziliensis* apresenta-se clinicamente por leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose muco-cutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LDiss) (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

A LC é a forma clínica comum, que se apresenta com lesão única ou múltiplas lesões, sempre no local da picada do inseto. Inicialmente é relatada pelo paciente uma pápula eritematosa pruriginosa, e esta pode ser abortiva ou evoluir para úlcera. A lesão ulcerada é arredondada ou ovóide, de tamanho variável, com bordos bem delimitados, elevados e eritematosos, fundo granuloso que sangra facilmente. São lesões muitas vezes indolores e que havendo infecção bacteriana secundária, aí sim, pode haver relato de dor. Em muitos casos são relatados comprometimento do linfonodo drenante (adenopatia). O curso da lesão pode ser benigno levando à cura espontânea após meses ou anos ou cura após o tratamento específico (Oliveira-Neto, 1998).

A forma mucosa (LM) é principalmente causada por disseminação hematogênica da *L. braziliensis*. Ocorre em cerca de 3 a 5% dos casos de LC, após intervalo de tempo variável, secundariamente a lesão cutânea. Os sintomas iniciais são coriza crônica e obstrução nasal. Acomete as regiões da mucosa nasal isolada onde a pele do nariz também é afetada, passando a ser avermelhada e edemaciada, aumentando o volume do nariz. Pode ocorrer, com a evolução da doença, à destruição do septo nasal e do assoalho das fossas nasais, da orofaringe, da faringe e da traquéia. Os pacientes da forma mucosa apresentam os maiores diâmetros da IDR, os parasitas presentes nas lesões são escassos, muitas vezes ausentes nas lesões de difícil tratamento, que não resolvem espontaneamente (Oliveira-Neto, 1998; Da-Cruz & Pirmez, 2005).

Na LMC, os pacientes apresentam concomitantemente envolvimento cutâneo e mucoso. Pode ocorrer comprometimento da mucosa por contigüidade das lesões na face ou até mesmo por inoculação direta dos parasitos nessas regiões. Esta é também uma forma grave da doença, onde os parasitos são facilmente encontrados nas lesões

e a resposta ao tratamento é semelhante às formas cutânea e mucosa (Oliveira-Neto, 1998; Da-Cruz & Pirmez, 2005).

A leishmaniose disseminada é a forma clínica onde os pacientes apresentam múltiplas lesões cutâneas de aspecto polimórfico sendo causadas principalmente por *L. braziliensis*. Esta acomete, principalmente, homens saudáveis sem associação com HIV. Primeiramente aparece uma lesão única e após alguns dias há a disseminação. As lesões cutâneas são de aspecto papuloso, acneiforme e ulceradas, podendo ser dezenas ou centenas delas espalhadas por todo o corpo. A complicação mais recorrente é o envolvimento mucoso. Estes indivíduos desenvolvem reações de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania*, os parasitos estão presentes nas lesões e os pacientes respondem relativamente bem à terapêutica (Turetz *et al.*, 2002; Guimarães *et al.*, 2005)

Para o tratamento, o Ministério da Saúde preconiza como droga de primeira escolha os antimoniais pentavalentes. Ampolas de N-metilglucamina, comercialmente encontradas como (Gluacantime®) são distribuídas gratuitamente na rede pública de saúde. O esquema terapêutico utilizado para a LC baseia-se na recomendação da OMS, onde a dose recomendada é de 10 a 20 mg Sb⁺⁵/kg/dia, durante 20 dias consecutivos por aplicação intramuscular. Em casos de resistência, utilizam-se como drogas de segunda escolha a anfotericina B e a pentamidina (Ministério Da Saúde, 2007).

Os pacientes devem ser acompanhados por até 12 meses e os critérios de cura clínica da leishmaniose cutânea se baseiam na re-epitelização das lesões ulceradas com regressão total da infiltração e do eritema. Os pacientes são considerados clinicamente curados quando há regressão da lesão em até três meses após o término do tratamento. Com a cura clínica há a formação de cicatrizes lisas, brilhantes, finas, sedosas e hipopigmentadas de tamanho semelhante ao da úlcera (Da-Cruz & Pirmez, 2005; Ministério Da Saúde, 2007).

A *L. braziliensis* encontrada no Brasil é uma espécie muito diversa geneticamente (Cupolillo *et al.*, 2003). A distribuição espacial de diferentes formas clínicas na região de Corte de Pedra se sobrepõe à distribuição espacial de diferentes cepas de *L. braziliensis*, sugerindo haver uma relação entre a variação genética do parasito e a forma clínica do paciente (Schriefer *et al.*, 2009). Por outro lado, é sabidamente conhecido que a forma clínica da leishmaniose não depende apenas das características genéticas do parasito (infectividade e virulência) (Leopoldo *et al.*, 2006),

mas também fatores associados ao inseto vetor (Andrade *et al.*, 2007) e da resposta imune do hospedeiro (Coutinho *et al.*, 1987; Silveira *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 2005; Reithinger *et al.*, 2007).

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em evidências clínicas compatíveis com a doença e achados laboratoriais. O diagnóstico clínico deve levar em conta as similaridades da leishmaniose com outras patologias (fúngicas, bacterianas e inflamatórias), sendo sempre um diagnóstico diferencial das afecções ulceradas da pele (Oliveira-Neto, 1998). O diagnóstico laboratorial é confirmado com a observação de parasitos, seja ela em cultura de material de lesão em meio axênico, por visualização direta de amastigotas em exame histopatológico ou impressão em lâmina, além de detecção de DNA do parasito por reação em cadeia da polimerase (PCR). Devido à escassez de parasitos nas lesões de leishmaniose por *Leishmania* do gênero *Viannia* nem sempre estes são observados nos tecidos (Da-Cruz & Pirmez, 2005). A intradermorreação de Montenegro (IDRM) é um teste cutâneo que consiste na inoculação intradérmica de 0,1 mL de suspensão de antígenos de promastigotas de leishmânias mortas. Após 48hs, se realiza a leitura do teste, através da medição do diâmetro da reação (induração) que é considerado positivo quando o diâmetro é maior ou igual a cinco milímetros. A positividade da IDRM indica que há a hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania* devido à exposição prévia aos mesmos, entretanto não consegue distinguir entre pacientes de ativos, curados e indivíduos subclínicos (Marzochi & Marzochi, 1994; Grevelink & Lerner, 1996; Da-Cruz & Pirmez, 2005). O teste é positivo em mais de 90% dos casos de LC e LM, e em geral, é negativo nos pacientes com a forma disseminada da doença, em fases muito precoces da doença ou em casos de imunossupressão (Grevelink & Lerner, 1996; Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Da-Cruz & Pirmez, 2005). A forma mucosa apresenta uma maior reatividade da IDRM e também uma maior linfoproliferação de células periféricas quando estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania*, indicando que nesses pacientes a resposta imune celular é mais exacerbada e por isso levando a maior gravidade das lesões (Carvalho *et al.*, 1985; Coutinho *et al.*, 1987).

I.7 - Importância do estudo das lesões de leishmaniose tegumentar americana.

A resposta imune celular desempenha um importante papel resolução e na patogênese da leishmaniose. Os animais C57BL/6, considerados resistentes à infecção por *L. major*, são capazes de ativar de macrófagos e eliminar o parasito por produção de citocinas do tipo I, como IFN- γ , TNF- α e - β produzidas por linfócitos

TCD4⁺. As células TCD8⁺, além de produzirem IFN- γ , possuem capacidade citotóxica na eliminação de macrófagos parasitados (Coutinho *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2004). Por outro lado, citocinas do tipo II são capazes de inibir a resposta do tipo I e levar ao agravamento da infecção por *Leishmania* (Coutinho *et al.*, 1998; Scott *et al.*, 2004).

Estudos em humanos sugerem que a imunidade celular tem um papel central na patogênese da doença. Pacientes com LC e LM são capazes de responder *in vivo* e *in vitro* a antígenos de *Leishmania* (Ag-Leish) (Castés *et al.*, 1983; Carvalho *et al.*, 1985). Os linfócitos destes pacientes além de proliferarem em resposta ao estímulo Ag-Leish, também produzem IFN- γ e IL-2 (Castés *et al.*, 1988). Existe uma correlação direta entre a resposta linfoproliferativa (RPL) e a frequência de células específicas a *Leishmania* no sangue periférico (Conceição-Silva *et al.*, 1990). Outro dado que corrobora para a importância da imunidade celular na patogênese da leishmaniose é o fato de haver uma correlação entre o diâmetro da induração da IDR e a frequência de células respondedoras para leishmânia nas lesões (Conceição-Silva *et al.*, 1988). Durante o tratamento há um aumento da RPL e após a cura clínica, é observada uma diminuição da mesma (Mendonça *et al.*, 1986; Da-Cruz *et al.*, 2002).

Quando comparada com a LC, a LM é considerada uma forma hiperérgica da leishmaniose devido a: 1) um maior diâmetro da resposta IDR (Castés *et al.*, 1983); 2) uma maior RPL frente aos antígenos de *Leishmania* (Castés *et al.*, 1984; Carvalho *et al.*, 1985); 3) uma maior produção de IFN- γ por células estimuladas com Ag-Leish (Carvalho *et al.*, 1985; Castés *et al.*, 1988); 4) culturas de curto tempo de células da lesão de LC e LM proliferam frente ao estímulo com antígenos de *Leishmania* (Pirmez *et al.*, 1990); e 5) uma maior frequência de células de lesão respondedoras aos Ag-Leish (Conceição-Silva *et al.*, 1990). A hiperreatividade aos antígenos de *Leishmania* observada nos pacientes de LM pode ser devido ao estímulo imunológico constante, já que o acometimento mucoso aparece em geral em momento posterior à manifestação cutânea (Carvalho *et al.*, 1985; Coutinho *et al.*, 1987).

Níveis similares de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ do sangue periférico são observados entre pacientes de fase ativa e após o término do tratamento, e com indivíduos saudáveis (Da-Cruz *et al.*, 1994). Com a cura clínica, observa-se um aumento do percentual de TCD8⁺ e uma diminuição de linfócitos TCD4⁺ específicos (Da-Cruz *et al.*, 1994), levando a uma diminuição significativa da razão CD4⁺/CD8⁺ que é mantida mesmo após seis meses de cura (Da-Cruz *et al.*, 2002). Acredita-se que os linfócitos TCD8⁺ estejam envolvidos no processo de cura clínica uma vez que foi observado que

pacientes que não curaram com o término do tratamento não tiveram o percentual de células TCD8+ aumentados (Da-Cruz *et al.*, 1994).

Entretanto, o percentual de subtipos de células T presente no infiltrado inflamatório não tem associação com o percentual de subtipos de células T presentes no sangue periférico ou mesmo com células T do sangue reativas a *Leishmania* (Modlin *et al.*, 1985; Da-Cruz *et al.*, 2005). Um menor percentual de células TCD8⁺ são encontrados no sangue periférico, adicionado ao fato de que é encontrada maior frequência de células reativas à *Leishmania* na lesão que no sangue periférico sugerem que processos migratórios atuam nessas células (Conceição-Silva *et al.*, 1990; Da-Cruz *et al.*, 2005). Estes dados apontam que, eventos imunológicos importantes e distintos de outros compartimentos devem estar ocorrendo no sítio inflamatório, e possivelmente desempenham um papel mais relevante na imunopatogenia da doença.

I.8- Caracterização histopatológica da lesão tegumentar de leishmaniose

O infiltrado inflamatório na leishmaniose tegumentar varia num espectro onde os extremos são reações não-resolutivas: um pólo anérgico (LCD) e o outro hiperérgico (LM); e no meio estão as forma auto-resolutivas (LC) (Ridley, 1979). O padrão histopatológico é bastante variável, com formação de granuloma e necrose (Ridley, 1980). É caracterizado como inflamação crônica granulomatosa com presença de necrose, onde o parasito, sempre escasso, é observado principalmente em lesões recentes (Magalhães *et al.*, 1986). A reação exudativa celular foi o padrão encontrado tanto nas fases iniciais quanto nas fases finais da leishmaniose (Magalhães *et al.*, 1986; Bittencourt & Barral, 1991). Em lesões cutâneas de infecção por *Leishmania* utilizando o modelo experimental símio, o que se observa é uma dinâmica celular, onde células do sistema imune inato aparecem em estágios agudos, logo após a inoculação do parasito, seguido de uma fase inicial de surgimento da úlcera, onde o infiltrado é principalmente de mononucleares com acúmulo de macrófagos. Por último, em estágios tardios, macrófagos diferenciados, linfócitos e plasmócitos compõem esse infiltrado (Souza-Lemos *et al.*, 2008). Corroborando com o achado experimental, lesões cutâneas de pacientes em fase inicial da doença apresentam maior percentual de polimorfonucleares, neutrófilos e eosinófilos quando comparado com pacientes com lesões tardias (Faria *et al.*, 2009). A dificuldade em classificar a lesão de leishmaniose em padrões histopatológicos é devida ao caráter transitório dos processos histopatológicos (Magalhães *et al.*, 1986). Soma-se a isto o fato que, numa mesma

lesão, podem ser encontrados diferentes padrões histopatológicos em regiões distintas (Bittencourt & Barral, 1991). A combinação de regiões com síntese e de degradação da matriz extracelular do granuloma, sugere que as lesões de leishmaniose possuem um quadro histopatológico transitório ou reversível (Esterre *et al.*, 1991). Por esta razão é que, talvez, nenhum padrão histopatológico se correlacione com o tempo de evolução (Gutierrez *et al.*, 1991).

I.9- Caracterização fenotípica das células do infiltrado inflamatório

O infiltrado inflamatório na leishmaniose tegumentar é constituído predominantemente por linfócitos, plasmócitos e macrófagos (Magalhães *et al.*, 1986). Cerca de 50% das células presentes nas lesões são linfócitos T (Modlin *et al.*, 1985; Barral *et al.*, 1987; Nilsen & Mshana, 1987; Pirmez *et al.*, 1990; Esterre *et al.*, 1992; Da-Cruz *et al.*, 2005). Em relação às subpopulações de células T presentes nas lesões de leishmaniose, o que observamos são resultados conflitantes. Independente da forma clínica analisada, um maior percentual de células T CD4⁺ sobre as células T CD8⁺ foi observado por Barral *et al.* (1987) e Pirmez *et al.* (1990); enquanto Lima *et al.* (1994) detectaram percentuais similares destas subpopulações. Um predomínio de linfócitos T CD8⁺ tem sido observado nas lesões cutâneas produzidas por *Leishmania* do Velho Mundo (Nilsen & Mshana, 1987) e por outras espécies do Novo Mundo (Modlin *et al.*, 1985; Isaza *et al.*, 1996). Contrariando estes resultados, dados obtidos com pacientes da Venezuela (Martinez-Arends *et al.*, 1991) e da Guiana Francesa (Esterre *et al.*, 1992) verificaram que a relação CD4⁺/CD8⁺ nas lesões cutâneas foi próxima a um, enquanto no México predominam os linfócitos CD4⁺ (Ritter *et al.*, 1996). Por outro lado, na infecção por *L.braziliensis*, um aumento da razão CD4/CD8 foi observado em lesões tardias quando comparadas com lesões recentes (Morgado *et al.*, 2008). Entretanto, uma heterogeneidade nos padrões da relação CD4⁺/CD8⁺ foi relatado por Palma & Saravia (1997) e por Da-Cruz *et al.* (2005). Esta variabilidade pode explicar os resultados controversos sobre a composição predominante das subpopulações de células T no infiltrado das lesões de pacientes de leishmaniose, sugerindo que há uma dinâmica de distribuição destas células no infiltrado nas diferentes fases da doença (Da-Cruz *et al.*, 2005). Por outro lado, um acúmulo de células TCD4⁺ e TCD8⁺ são observados em lesões tardias na LC (Da-Cruz *et al.*, 2005; Faria *et al.*, 2009). Isso pode ser devido a uma diminuição dos fenômenos apoptóticos observados em lesões tardias, o que mantém os linfócitos T nos infiltrados,

provavelmente por deficiência nos mecanismos regulatórios, o pode levar à cronicidade da inflamação (Bertho *et al.*, 2000).

O fenótipo de memória com a expressão CD45RO é predominante entre as células presentes no infiltrado, entretanto também são encontradas células “naive” ou com a expressão de CD45RA (Pirmez *et al.*, 1990; Martinez-Arends *et al.*, 1991; Esterre *et al.*, 1992).

As células ativadas, expressando diferentes moléculas e em variados estágios de ativação, estão presentes no infiltrado inflamatório (Pirmez *et al.*, 1990; Martinez-Arends *et al.*, 1991; Esterre *et al.*, 1992; Diaz *et al.*, 2002; Da-Cruz *et al.*, 2005). Lesões crônicas de LC apresentam maior número de células ativadas, expressando CD69 (Diaz *et al.*, 2002), assim como as lesões mucosas, onde as células expressam mais CD25 que em lesões cutâneas (Da-Cruz *et al.*, 2005), sugerindo que uma hiperreatividade das células contribuam para um mau prognóstico da doença.

Por outro lado, células T reguladoras TCD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺ (*Forkhead Box P3*) (Treg) migram para lesões de leishmaniose (Campanelli *et al.*, 2006) e exercem papel supressor no infiltrado inflamatório de lesões leishmaniose cutânea (Bourreau *et al.*, 2009a). Uma maior expressão gênica de FoxP3 em pacientes com LC crônica e em pacientes refratários ao tratamento sugerem que as células Treg nas lesões sejam funcionalmente supressoras, influenciando a patogênese de doença (Bourreau *et al.*, 2009a; Bourreau *et al.*, 2009b).

Já as células TCD8⁺ com função citotóxica, expressando a molécula TIA-1 (*cytotoxic granule-associated RNA-binding protein -1*; grânulo citotóxico associado à proteína ligadora de RNA), está presente em lesões de LC. Mais de 50% das células expressam essa molécula, e esta ocorre em áreas onde há a co-expressão de CD8 e CD56 (células NK) (Machado *et al.*, 2002). As células TCD8⁺ produtoras de granzima A estão correlacionadas com a destruição tecidual, uma vez que estão mais presentes em lesões ulceradas (Faria *et al.*, 2009).

As células TCD3⁺, mas que não exibem nem CD4 nem CD8, são conhecidas como células T duplo negativas (DN – CD3⁺CD4⁻CD8⁻) (Gollob *et al.*, 2008). A presença destas células na leishmaniose foi primeiramente mostrada como sendo a segunda maior fonte celular de IFN- γ após o estímulo de células sanguíneas (Bottrel *et al.*, 2001). Estudo posterior mostrou que existem duas subpopulações de células TCD3⁺ DN: uma população majoritária de células DN expressando TCR β ⁺, e outra minoritária expressando TCR $\gamma\delta$ ⁺ (Antonelli *et al.*, 2006).

I.10 – Perfil de citocinas e presença de quimiocinas no infiltrado inflamatório de lesões de LTA

As lesões de leishmaniose apresentam um perfil misto de citocinas, com a presença de citocinas do tipo I (IL-2, IFN- γ) e do tipo II (IL-4, IL10, IL13) presentes na mesma lesão (Pirmez *et al.*, 1993). Entretanto, citocinas do tipo I parecem predominar sobre as citocinas do tipo II em lesões de LC e LM (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993). Entretanto, nas lesões causadas por *L. guyanensis*, o que parece ocorrer é uma dinâmica entre estes fatores solúveis, onde citocinas do tipo II predomina na fase recente, um balanço de citocinas do tipo I e do tipo II ocorre em fase intermediária e em fase mais tardia predominam as citocinas do tipo I (Bourreau *et al.*, 2003). Por outro lado, lesões crônicas possuem maior expressão de TNF- α , IL-10 e TGF- β (Melby *et al.*, 1994). Uma maior expressão de IL-10 também é observada em pacientes com falha terapêutica, sugerindo assim que IL-10 pode regular a resposta na LC, inibindo a resposta do tipo I (Bourreau *et al.*, 2009b).

Existe um perfil diferente de citocinas, dependendo da forma de leishmaniose estudada (Cáceres-Dittmar *et al.*, 1993; Pirmez *et al.*, 1993). As lesões de LM possuem maior expressão de IL-4 do que lesões de LC, o que aponta para que mecanismos que mantêm a replicação do parasito e podem explicar a cronicidade destas lesões (Pirmez *et al.*, 1993). A hiperreatividade observada na LM pode ser explicada por estas lesões apresentarem maiores níveis de IFN- γ e granzima A, associado a níveis similares de IL-10 e uma baixa expressão do receptor de IL-10 (Faria *et al.*, 2005).

O papel das quimiocinas na leishmaniose tem sido investigado. Em modelo experimental, o papel e os níveis de quimiocinas dependem da espécie de *Leishmania*. Em estágios iniciais da infecção por *L. major* é observado um rápido recrutamento de células e um grande aumento da expressão das quimiocinas CCL5/RANTES, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL2/MCP-1 e CXCL10/IP-10 (Matte & Olivier, 2002). Enquanto, baixos níveis das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α , CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES e CXCL2/MIP-2 são observadas na infecção por *L. amazonensis* (Ji *et al.*, 2003). Essas diferenças na produção das quimiocinas podem afetar a capacidade migratória, a função efetora e conseqüentemente a progressão da doença. Níveis mais aumentados de CCL5/RANTES está correlacionado com a resistência na infecção por *L. major* (Santiago *et al.*, 2004). Já a infecção de camundongos com cepas de *L. braziliensis* com diferentes graus de virulência mostrou que, apesar do número de parasitos nas lesões serem semelhantes

entre as duas infecções, o padrão de quimiocinas foi diferente entre elas (Teixeira *et al.*, 2005). A cepa mais virulenta atraiu mais células que a cepa menos virulenta, sugerindo que o parasito pode modular a presença de quimiocinas e consequentemente influenciar na migração celular (Teixeira *et al.*, 2005).

Na leishmaniose cutânea humana causada por *L. mexicana*, CCL3/MIP-1 α foi mais expressa que CCL2/MCP-1. Observou-se que os níveis de CCL2/MCP-1 foi maior na LC do que na LDiss, enquanto que o CCL3/MIP-1 α estava mais expresso na LDiss, sugerindo que o CCL3/MIP-1 α participava ativamente da forma mais grave da doença (Ritter *et al.*, 1996). Posteriormente, foi observado que a presença de CCL3/MIP-1 α em culturas de monócitos infectados com *Leishmania* não era capaz de induzir a ativação destas células, consequentemente de eliminar o parasito (Ritter & Moll, 2000).

Da-Cruz (1999) observou que células mononucleares do sangue periférico e de lesões de pacientes de LC produziam CCL5/RANTES após estímulo com antígeno de *Leishmania*. Curiosamente, a produção de CCL3/MIP-1 α , mas não de CCL2/MCP-1 e Rantes, foi diminuída em relação às células não estimuladas, sugerindo que antígenos do parasito poderiam inibir a produção desta quimiocina (Da-Cruz, 1999). Entretanto, não há estudos que mostram a presença *in situ* destas quimiocinas em lesões de leishmaniose causadas por *L. braziliensis*.

Diante dos dados que sugerem a existência de um processo migratório entre sangue e lesão, devido a um maior número de células TCD4⁺ e TCD8⁺ nas lesões do que no sangue periférico de pacientes de leishmaniose, e de que existem dados na literatura que são contraditórios em relação ao percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ presentes no infiltrado é necessário estudar quais são os mecanismos migratórios dos linfócitos e o perfil de quimiocinas presentes nas lesões de leishmaniose, além de compreender se antígenos parasitários influenciam nesse processo migratório. Os padrões histopatológicos observados nas lesões de leishmaniose não possuem correlação com a evolução da doença. Desta forma é necessária uma melhor caracterização fenotípica das células T presente no infiltrado em termos de ativação e diferenciação celular e perfil citotóxicos, para melhor compreender se os eventos imunológicos que ocorrem no local da infecção têm correlação com a patogênese da doença.

II. Objetivos

II.1 Geral:

Caracterizar o perfil fenotípico dos linfócitos das lesões de leishmaniose tegumentar, avaliando a migração celular, grau de ativação, perfil de diferenciação linfocitário e sua correlação com a patogênese e a resolução da doença.

II.2 - Objetivos específicos.

- 1) Avaliar a migração linfocitária através da identificação de moléculas de adesão (CLA e CD62L) envolvidas no direcionamento das células TCD4⁺ e TCD8⁺ específicos para *Leishmania* entre compartimentos do sistema imune (sangue e pele);
- 2) Caracterizar as células T das lesões em termos de ativação celular, perfil de memória e citotoxicidade, além de analisar como estes fatores podem influenciar na evolução da leishmaniose;
- 3) Estudar a presença das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES na patogênese da leishmaniose cutânea;
- 4) Correlacionar os perfis imunológicos identificados nas lesões com a patogênese da doença, em termos de tempo de evolução, IDRM e área da lesão.

III. Resultados

III.1 – Artigo 1 (Publicado)

Título: “The skin homing receptors cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during cutaneous leishmaniasis”

Autores: Mendes-Aguiar, CO, Gomes-Silva, A, Nunes Jr, E, Nogueira, RS, Pereira-Carvalho, R, Oliveira-Neto, MP, Bertho, AL, Da-Cruz, AM.

Clin Exp Immunol. 2009; 157:377-84.

RESUMO

O receptor associado ao antígeno leucocitário (CLA) pode direcionar linfócitos T *Leishmania*-específicos para lesões inflamatórias de pele. Os receptores de migração CLA, antígeno associado a linfócitos 1 (LFA-1) ou L-selectina (CD62L) foram analisados em linfócitos do sangue periférico e de lesões de leishmaniose cutânea (CL). Pacientes CL com lesões ativas (A-CL) apresentaram baixos níveis de linfócitos T com o fenótipo CLA⁺ (TCD4⁺ = 10,4% ± 7,5% e TCD8⁺ = 5,8% ± 3,4%) que em comparação aos indivíduos sadios (HS) (TCD4⁺ = 19,3% ± 13,1% e TCD8⁺ = 21,6% ± 8,8%), principalmente em TCD8⁺ (p<0,001). Em pacientes clinicamente curados, esses percentuais voltam aos níveis observados nos HS. Os antígenos de *Leishmania* regulam positivamente o CLA em células T de pacientes A-CL (CLA⁺ em TCD4⁺ = 33,3%±14,1%; CLA⁺ em TCD8⁺ = 22,4%±9,4%), mas não nos indivíduos sadios. Um enriquecimento de células CLA⁺ foi observado nas lesões (CLA⁺ em TCD4⁺ = 45,9%±22,5%; CLA⁺ em TCD8⁺ = 46,4%±16,1%) em comparação ao sangue (CLA⁺ em TCD4⁺ = 10,4%±7,5%; CLA⁺ em TCD8⁺ = 5,8%±3,4%). Enquanto que o LFA-1 foi altamente expresso em células TCD8⁺ e aumentado em células TCD4⁺ do sangue periférico de pacientes A-CL. Por outro lado, o percentual de CD62L nos linfócitos T não foi afetado. Esses resultados sugerem que os antígenos de *Leishmania* podem modular moléculas responsáveis pela migração para lesões de pele, influenciando potencialmente a composição do infiltrado inflamatório na leishmaniose ou mesmo a severidade da doença.

The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis

C. de O. Mendes-Aguiar,*

A. Gomes-Silva,* E. Nunes Jr,*†

R. Pereira-Carvalho,* R. S. Nogueira,*

M. de P. Oliveira-Neto,‡ A. L. Bertho§

and A. M. Da-Cruz*†

*Laboratório de Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, †Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e Sorting, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, ‡Disciplina de Parasitologia, DMIP, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro,

§Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Accepted for publication 27 April 2009

Correspondence: A. M. Da-Cruz, Av. Brazil

4365, Pavilhão Leônidas Deane sala 408,

Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, CEP

21040-900, Brazil.

E-mail: alda@ioc.fiocruz.br

Introduction

Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by many *Leishmania* species, but differences in clinical, diagnostic and therapeutic aspects of the disease points to intrinsic characteristics of the parasite influencing the pathogenesis [1]. CL due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the most common clinical form of leishmaniasis observed in Brazilian patients, characterized by a single or a few localized skin lesions [2]. The skin lesions are characterized by a chronic granulomatous inflammatory infiltrate consisting mainly of lymphocytes, plasmacytes and histiocytes [3]. Memory T lymphocytes predominate in lesions [4], but the proportions of T CD4⁺ and T CD8⁺ cells are variable [5,6], suggesting that these T cell subsets can have distinct requirements for their recruitment to lesions.

Several reports have suggested that a huge influx of T cells takes place in lesions [4,7,8], as not only is a higher frequency observed of local lymphocytes responding to *L. braziliensis*

Summary

The cutaneous leucocyte-associated antigen receptor (CLA) can direct *Leishmania*-specific T lymphocytes towards inflamed skin lesions. Homing receptors [CLA, lymphocyte-associated antigen 1 (LFA-1) or CD62L] were analysed in lymphocytes from blood and cutaneous leishmaniasis (CL) lesions. CL patients with active lesions (A-CL) presented lower levels of T lymphocytes expressing the CLA⁺ phenotype (T CD4⁺ = 10.4% ± 7.5% and T CD8⁺ = 5.8% ± 3.4%) than did healthy subjects (HS) (T CD4⁺ = 19.3% ± 13.1% and T CD8⁺ = 21.6% ± 8.8%), notably in T CD8⁺ ($P < 0.001$). In clinically cured patients these percentages returned to levels observed in HS. Leishmanial antigens up-regulated CLA in T cells (CLA⁺ in T CD4⁺ = 33.3% ± 14.1%; CLA⁺ in T CD8⁺ = 22.4% ± 9.4%) from A-CL but not from HS. An enrichment of CLA⁺ cells was observed in lesions (CLA⁺ in T CD4⁺ = 45.9% ± 22.5%; CLA⁺ in T CD8⁺ = 46.4% ± 16.1%) in comparison with blood (CLA⁺ in T CD4⁺ = 10.4% ± 7.5%; CLA⁺ in T CD8⁺ = 5.8% ± 3.4%). Conversely, LFA-1 was highly expressed in CD8⁺ T cells and augmented in CD4⁺ T from peripheral blood of A-CL patients. In contrast, CD62L was not affected. These results suggest that *Leishmania* antigens can modulate molecules responsible for migration to skin lesions, potentially influencing the cell composition of inflammatory infiltrate of leishmaniasis or even the severity of the disease.

Keywords: cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA), homing molecules, L-selectin (CD62L), leishmaniasis lesions, T lymphocytes

in comparison with blood [9], but also an increased proportion of T CD4⁺ and T CD8⁺ cells is reported in older lesions [5,6]. Although the effector T cell response mounted in response to the parasite can lead to a cure, it also seems to be responsible for tissue damage [10,11]. However, even considering the importance of lymphocyte traffic to the formation of inflammatory infiltrates, few reports have addressed the mechanisms underlying the cell-homing to leishmaniasis lesions [12–15].

Lymphocyte migration is a complex process involving many molecules that direct cells specifically to an appropriate compartment. Selectins and integrins are families of adhesion molecules that not only mediate the migration process towards lymphoid organs (p.ex. CD62L), but also direct cells to inflamed tissues through the endothelial epithelium [16]. For access to the skin compartment, T cells utilize a skin 'code' named the cutaneous leucocyte-associated antigen receptor (CLA). CLA is a member of the selectin family that is expressed in memory T cells and binds

to the E-selectin receptor on endothelial cells of inflamed skin [17]. CLA is found in 10–25% of circulating CD3⁺CD45RO⁺ T cells, as well as in other blood cells such as neutrophils, monocytes and dendritic cells [18,19]. CLA-E-selectin is the first adhesion step in migration, followed by very late antigen-4 (VLA-4) and lymphocyte-associated antigen 1 (LFA-1) attachment to activated endothelium and further lymphocyte transmigration to inflamed skin [20,21]. CLA has been recognized as one of the most important skin-homing molecules and its expression in activated lymphocytes can affect cell composition of the inflammatory infiltrate. Consequently, CLA has been associated with the pathogenesis or severity of many inflammatory skin diseases, such as atopic dermatitis [22], psoriasis [23] and leprosy [24].

Molecules involved in the adhesion of *Leishmania*-infected macrophages [25] or recruitment of effector lymphocytes to the skin can potentially influence the magnitude of immunopathological process in response to the infection [6,24,26,27]. *In situ* analyses have shown high levels of LFA-1a- and LFA-1b-positive cells in the dermis of leishmaniasis patients, although expressed differentially in CL and diffuse cutaneous leishmaniasis [28]. High percentages of activated cells expressing CD62L^{high}, LFA-1a and LFA-1b are found in peripheral blood in comparison to the lymph nodes of CL patients in the early stages of the disease, suggesting that these cells are available for recruitment to lesion sites [15]. The percentage of skin cells presenting CLA is very low, comprising less than one-third of the cells from CL [14,29], which is surprising considering the high percentage of memory T cells in the inflammatory infiltrate [4]. Differences in the expression of migration molecules in CD4⁺ and CD8⁺ T cells indicate that there are specific requirements for the homing of these cells to a leishmaniasis lesion [13,15,26]. However, it is not known whether CD4⁺ or CD8⁺ T cells express CLA differentially in leishmaniasis lesions and blood.

Considering the importance of CLA in directing activated T cells to skin lesions, we performed flow cytometry studies to investigate their relationship on the frequency of this molecule on T cell subsets in blood and leishmaniasis lesions. Our hypothesis was that leishmanial antigens stimuli can up-regulate CLA, facilitating the homing of *Leishmania*-specific T lymphocytes towards the inflammatory infiltrate of cutaneous leishmaniasis. We believe that differences in the expression of CLA in T CD4⁺ or T CD8⁺ can affect the T cell composition of leishmaniasis lesions.

Materials and methods

Patients

Thirty-one CL patients [22 male and nine female; mean age \pm standard deviation (s.d.) 39.4 \pm 16 years old] and eight healthy subjects (HS, four male, four female) were

studied. Patients had acquired the disease in endemic areas for *L. braziliensis* infection in Rio de Janeiro, Brazil. The diagnosis of active cutaneous leishmaniasis (A-CL) was confirmed by clinical, parasitological and immunological criteria as described elsewhere [30]. Patients were treated with pentavalent antimonial (*N*-methyl-glucamine), according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health, and then followed-up. Patients were grouped as follows: active disease (A-CL; *n* = 16), at the end of therapy (early cured CL: ECCL; *n* = 8) and 1 year after the end of therapy (late cured CL: LCCL; *n* = 11). Four patients were followed-up ECCL and LCCL. Blood was drawn after informed consent was obtained from each subject. All procedures were approved by the Ethical Committee of the Fundação Oswaldo Cruz and of the IPEC, Ministério da Saúde, Rio de Janeiro, Brazil.

Acquisition of mononuclear cells from blood and leishmaniasis lesions

Peripheral mononuclear blood cells (PBMC) were separated by centrifugation over a gradient of Ficoll-Hypaque (Histo-paque 1077; Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA). Cells were resuspended in RPMI-1640 supplemented with 10% heat-inactivated human antibody Rh⁺ serum, 10 mM HEPES, 1.5 μ M L-glutamine, 0.04 mM 2-mercaptoethanol, 200 IU of penicillin per ml and 200 μ g of streptomycin per ml (RPMI supplemented; Sigma). PBMCs were adjusted to 3 \times 10⁶/ml and processed for phenotypical analyses of surface molecules or *in vitro* stimulation with *Leishmania* antigens. An incisional biopsy from the skin lesion border was performed for diagnostic purposes, and part of the tissue fragment was separated for cell extraction. Mononuclear cells from leishmaniasis lesions (LeMC) were obtained as described elsewhere [6]. In brief, the skin specimen, stripped of subcutaneous fat, was placed into a tissue sieve, fitted with a 64 μ m mesh filter and containing RPMI supplement. The cells were separated mechanically using a stick. The single-cell suspension was washed once and the mononuclear cells separated by centrifugation over a Ficoll-Hypaque gradient (Histo-paque 1077; Sigma). LeMCs (10⁶/ml) were resuspended in cold phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.01% sodium azide (NaN₃; Sigma) and 10% fetal bovine serum (PBSAz/FBS), and processed for phenotypical analysis.

In vitro stimulation of PBMC with *Leishmania braziliensis* antigens

PBMC (3 \times 10⁶ in a final volume of 2 ml) were cultured in 24-well flat-bottomed plates (Nunc, Roskilde, Denmark) with medium alone or in the presence of 5 \times 10⁶ disrupted *L. (V.) braziliensis* promastigotes (MHOM/BR/75/M2903). Cells were incubated for 5 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. *L. braziliensis*-stimulated T cells were washed and adjusted to 3 \times 10⁶/ml in PBSAz/FBS for phenotypical analysis.

Phenotypical characterization of T cell subsets and surface molecules related to migration

Ex-vivo PBMC, *Leishmania*-stimulated PBMC and *ex-vivo* LeMC (10^6 cells in 200 μ l of PBSAz/FBS) were incubated for 30 min at 4°C in the presence of 5 μ l of fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE) or tandem conjugate phycoerythrin–cyanine 5 (PC5)-labelled monoclonal antibodies. After incubation, the cells were washed in PBSAz/FBS and resuspended in a fixing solution containing 1% paraphormaldehyde in PBS prior to the analysis. Monoclonal antibodies for anti-CD3, -CD4, -CD8 and -CD11a (LFA-1) labelled with PC5, PE or FITC (Immunotech, Beckman Coulter Corporation, Marseille, France); anti-CLA and -CD62L labelled with PE or FITC (Becton Dickinson Bioscience Pharmingen, Franklin Lakes, NJ, USA). Three-colour cytofluorimetry protocols were created for each sample, including: CD3-PC5/CD4-FITC/CD8-PE and CD4, CD8 and one homing molecule (CLA, CD62L or CD11a). For flow cytometry analysis, 10 000 events per sample were acquired in a fluorescence activated cell sorter (FACS-Calibur flow cytometer, Becton Dickinson Bioscience). Surface molecules were analysed for total lymphocytes or in gates defined electronically in T CD4⁺ and in T CD8⁺ cell populations using Summit 4.3 software (DakoCytomation, Fort Collins, CO, USA). The total lymphocyte gate (R1) was settled based on size (forward scatter: FSC) and granularity (side-scatter: SSC). Positive cells were defined (or gated) based on the control sample with isotype antibodies. T cell subtypes (CD4⁺ or CD8⁺) were defined in lymphocyte gated cells. The frequency of positive CLA, CD62L or CD11a was determined in this positive T cell subpopulation (CD4⁺ or CD8⁺) or in the total lymphocyte gate. For *Leishmania*-stimulated T cell analysis, the lymphocyte gate was expanded and defined to also cover the blast population with higher FSC and SSC. The results were expressed as a percentage of positive cells and mean fluorescence intensity.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed by the two-tailed Mann–Whitney and Kruskal–Wallis tests using the GraphPad Prism software version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The results were expressed as the mean \pm s.d. and median.

Results

CLA, CD62L and LFA-1 molecules in blood T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients and healthy volunteers

To determine whether leishmaniasis alters the expression of homing molecules in circulating lymphocytes, CLA (skin homing), CD62L^{high} (lymph node homing) and CD11a

(LFA-1, adhesion molecule to inflamed endothelium) phenotypes were evaluated *ex vivo* in the total lymphocyte population and in CD4⁺ or in CD8⁺ T cell subpopulations. For the CLA phenotype, CL patients were evaluated with the active disease (A-CL), at the end of therapy (ECCL) and long-term clinically cured (LCCL).

In A-CL patients, the CLA⁺ phenotype was significantly higher among T CD4⁺ ($10.4\% \pm 7.5\%$, median = 9.6%) than T CD8⁺ cells ($5.8\% \pm 3.4\%$, median = 5.2%), but this difference was not observed in HS (T CD4⁺: $19.3\% \pm 13.1\%$, median = 14.6%; T CD8⁺: $21.6\% \pm 8.8\%$, median = 22.1%) (Fig. 1). Moreover, the CLA⁺ phenotype was significantly lower in A-CL patients for both T cell subsets in comparison with HS (Fig. 1). This is notably a more expressive decrease of CD8⁺ T cells displaying CLA molecules ($P < 0.001$, Fig. 1). These low levels of T cells presenting CLA were maintained even at the end of therapy (ECCL) for both T cell subsets (Fig. 4a and b). An increase in the percentage of T CD4⁺CLA⁺ ($P < 0.01$) was seen only long-term after therapy, when the proportions of these cells were comparable to HS. Although LCCL showed an increase of CD8⁺ T cells displaying the CLA⁺ phenotype, these levels were still lower than those observed in HS ($P < 0.01$; Fig. 4b). These results show that CD8⁺ rather than CD4⁺ T cells presenting CLA are reduced in blood during active leishmaniasis. These lower levels could be caused by the down-modulation of CLA in T cells or the migration of CLA⁺ T lymphocytes to the lesions.

A-CL and HS showed a similar mean percentage of the CD62L^{high} phenotype not only among CD4⁺ T cells (A-CL = $6.6\% \pm 5.5\%$, median = 5.3%; HS = $6.8\% \pm 2.8\%$, median = 7.5%), but also in CD8⁺ T cells (A-CL = $8.2\% \pm 5\%$, median = 7.9%; HS = $8.6\% \pm 4.9\%$, median = 7.8%). Indeed, no significant difference regarding the CD62L^{high} phenotype was observed among T cell subsets.

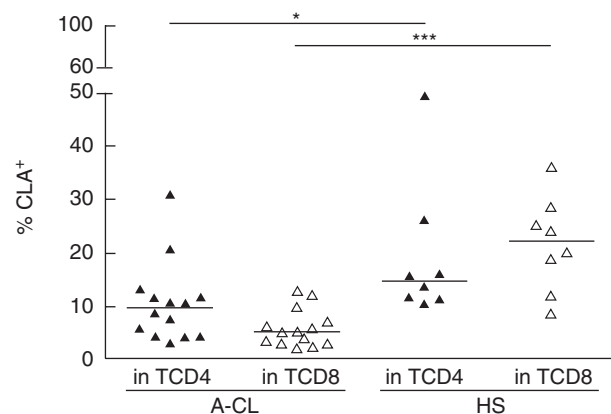


Fig. 1. *Ex vivo* analysis of cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) in peripheral blood cells from active cutaneous leishmaniasis patients (A-CL) and healthy subjects (HS). Comparison of CLA⁺ cells in T CD4⁺ (▲) and in T CD8⁺ (△) lymphocytes. Each point represents one individual and the short bar represents the median of results. * $P < 0.05$; *** $P < 0.001$.

Higher percentages of the CD11a (LFA-1) phenotype were detected among total lymphocytes population in A-CL ($60.8\% \pm 19.3\%$, median = 56.1%) in comparison with HS ($45.3\% \pm 10.6\%$, median = 46.1%). This difference was detected markedly among CD4⁺ T cells, as CD4⁺CD11a⁺ T cells were detected more in A-CL ($51.3\% \pm 21.3\%$, median = 45.1%) than in HS ($30.1\% \pm 11.8\%$, median = 30.9%). By contrast, similar levels of CD8⁺ T cells displaying CD11a were seen in both A-CL ($80.1\% \pm 13.4\%$, median = 78.6%) and HS ($75.8\% \pm 18.6\%$, median = 83.6%). However, up-regulation of CD11a⁺ was observed only in CD4⁺ T and not in CD8⁺ T cells during infection, reinforcing the idea that the disease is related to a differential homing profile in these two lymphocyte populations (data not shown).

T lymphocytes displaying CLA and CD11a, but not CD62L molecules, are more numerous in cutaneous leishmaniasis lesions than in blood

Considering that the presence of CLA on cell surfaces should facilitate lymphocyte migration to leishmaniasis lesions, we evaluated whether an enrichment of CLA⁺ T cells was set in the lesion inflammatory infiltrate in comparison with blood. The two compartments were compared individually for each patient.

In the total lymphocyte population of LeMC, 25.8% were CLA-positive cells. The frequency of T lymphocytes displaying CLA molecules was much higher in lesions than in blood for both T CD4⁺ (lesion = $45.9\% \pm 22.5\%$, median = 38.47% ; blood = $10.4\% \pm 7.5\%$, median = 9.6% ; $P < 0.01$) (Fig. 2a) and T CD8⁺ cells (lesion = $46.4\% \pm 16.1\%$, median = 51.1% ; blood = $5.8\% \pm 3.4\%$, median = 5.2% ; $P < 0.001$) (Fig. 2b). Although the frequency of CLA⁺ in lesions cells was similar in both T subsets, the enrichment of cells displaying this CLA in relation to blood was more expressive among T CD8⁺ than in T CD4⁺. In a similar manner, the frequency of CD11a on lymphocytes was also higher in lesions than in blood, but this enrichment in lesions was due to T CD4⁺ (lesion = $76.9\% \pm 22\%$, median = 79.3% ; blood = $51.3\% \pm 21.7\%$, median = 45.1%) and not to T CD8⁺ cells (lesion = $80.9\% \pm 26.9$, median = 92.6% ; blood = $80.1\% \pm 13.4$, median = 78.6%). As observed in blood, the frequency of T CD8⁺ cells displaying CD11a was also higher than T CD4⁺.

Opposite results were obtained for the CD62L^{high} molecule, which showed a lower frequency in lesions for both T cell subsets (T CD4⁺ = $1.8\% \pm 0.7\%$, median = 1.8% , $P < 0.05$; and T CD8⁺ = $2.7\% \pm 1.5\%$, median = 1.9% , $P < 0.01$) in comparison with blood (Fig. 2c and d).

These results show that lymphocytes displaying CLA and CD11a are enriched in lesions, suggesting that these molecules could contribute to the homing of T lymphocytes to the CL inflammatory infiltrate.

Leishmania antigens stimuli increase the frequency of T lymphocytes displaying CLA, but reduce CD62L^{high}

T cell activation by *Leishmania* could play a role in modulating the expression of homing molecules on lymphocyte surfaces. Thus, we decided to analyse whether CLA or CD62L^{high} are up-regulated under the parasite stimuli and also if these molecules are expressed differently in T CD4⁺ or T CD8⁺. For those purposes, *Leishmania*-stimulated PBMC were compared individually with *ex vivo* PBMC cells in A-CL and HS.

In A-CL patients, *in vitro* *Leishmania* antigen stimulation led to a significant increase ($P < 0.05$) in the frequency of both subtypes of T cells displaying CLA in comparison with *ex vivo* cells (Fig. 3a and b). It is worthy of mention that antigen stimulation did not affect the frequency of lymphocytes expressing CLA from HS (Fig. 3c and d), showing that *Leishmania* antigens *per se* do not up-regulate CLA in non-activated specific lymphocytes. A fourfold increase in the percentage of cells expressing CLA after parasite stimuli was observed for both T CD4⁺ and T CD8⁺ cells (Fig. 3a and b). Only two patients failed to exhibit an increase of CLA⁺ on *Leishmania*-reactive T CD4⁺. However, the frequency of CLA⁺ in T CD4⁺ ($33.3\% \pm 14.1\%$, median = 27.9%) after antigen stimulation was higher than in T CD8⁺ ($22.4\% \pm 9.4\%$, median = 23.5%), maintaining the relationship observed in *ex-vivo* cells (CLA⁺ in CD4⁺ = $10.4\% \pm 7.5\%$, median = 9.6% ; CLA⁺ in CD8⁺ = $5.8\% \pm 3.4\%$, median = 5.2%) (Fig. 3). A significant decrease in CLA expression on *Leishmania*-reactive T CD4⁺ was observed in ECCL and also in LCCL in comparison with A-CL. However, after therapy (ECCL) the percentage of CLA expression among *Leishmania*-reactive T CD8⁺ cells was still high and only decreased more than 1 year after treatment (LCCL) ($P < 0.01$; Fig. 4c and d). Only after long-term therapy did the percentages of *Leishmania*-reactive T CD4⁺ and T CD8⁺ presenting CLA return to the levels observed in control HS.

These data show that during the pathological process there is an up-regulation of molecules driving T cells to inflamed skin. The frequency of CD62L^{high} was not affected in T CD4⁺ ($8.4\% \pm 5.1\%$, median = 8.0%) or T CD8⁺ ($5.5\% \pm 4.5\%$, median = 4.5%) *Leishmania*-reactive cells in relation to *ex vivo* cells (data cited above).

Discussion

In this study we observed a decrease in the percentage of CLA⁺ cells in PBMC of CL patients. Post-therapy, this percentage was increased to comparable levels for HS. In parallel, we observed a high frequency of positive CLA and LFA-1 cells and low frequency of CD62L^{high} in lesions. In active patients, specific T cells up-regulate the CLA expression but not CD62L^{high}, while in HS this pattern was not observed. Thus, it is possible that parasites can influence the modulation of homing molecules during the clinical course of

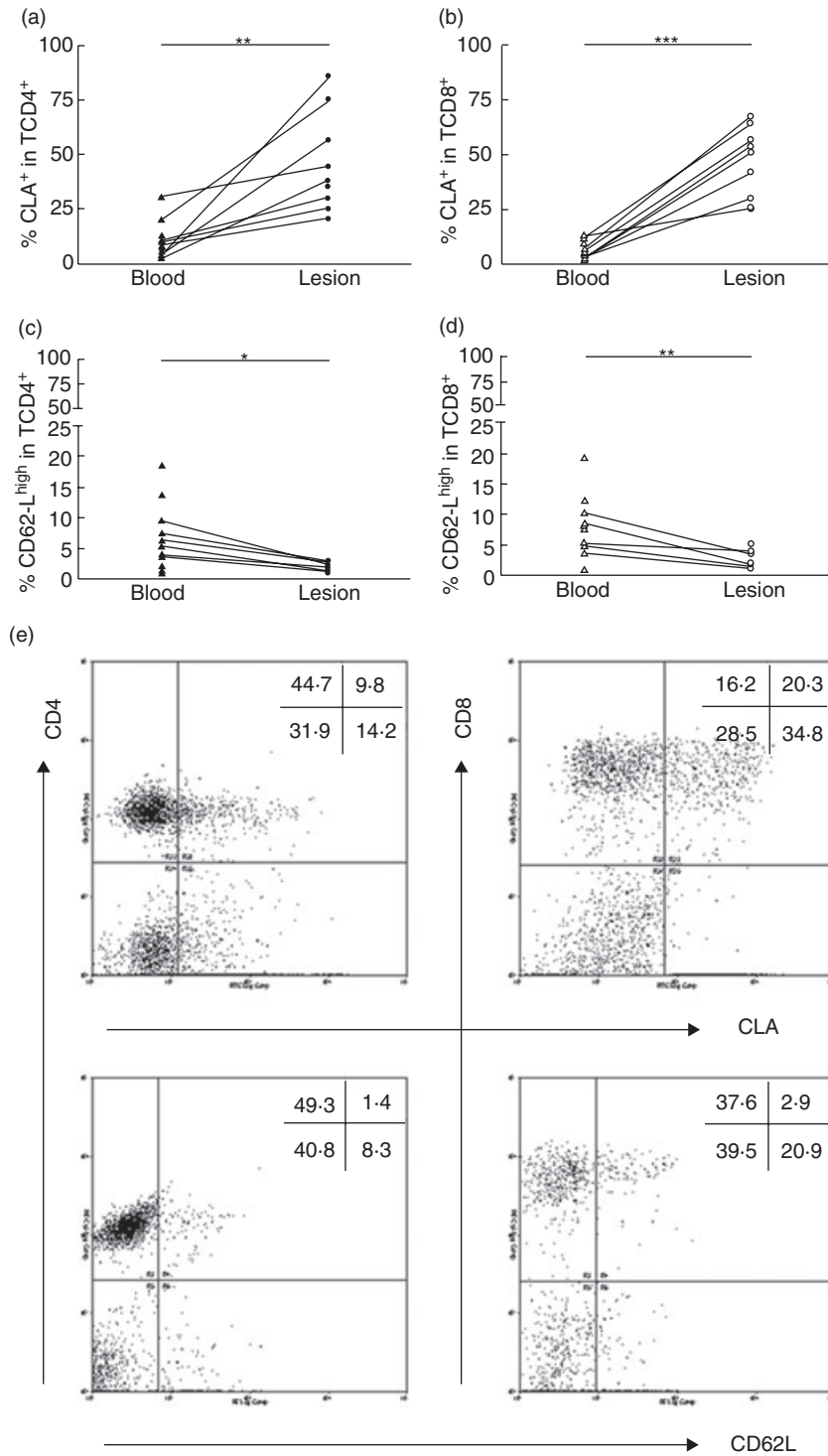


Fig. 2. *Ex vivo* analysis of cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) and CD62L in blood and lesions T cell subsets of lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients. The percentage of CLA (a, b) and CD62L^{high} (c, d) positive cells were analysed in T CD4⁺ (▲) or in T CD8⁺ (△) lymphocytes. Each point represents one individual. The lines represent results obtained simultaneously in a same patient. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001. (e) Double-staining analysis of T CD4⁺ and T CD8⁺ plus anti-CLA or anti-CD62L from leishmaniasis lesions showed by dot plot graphs.

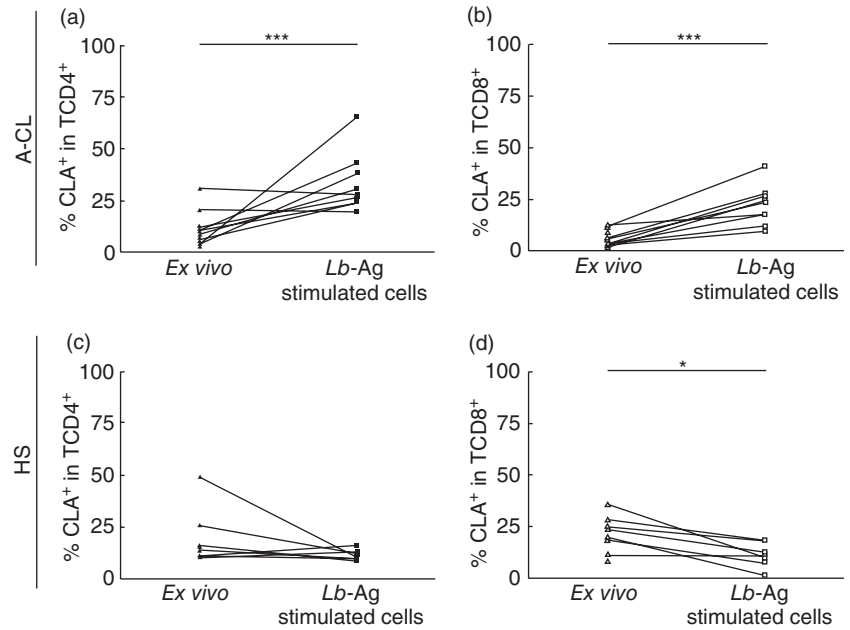


Fig. 3. Cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) but not CD62L molecules are up-regulated by *Leishmania*-antigens. CLA⁺ expression in *ex-vivo* and *Leishmania*-stimulated T CD4⁺ (▲) or T CD8⁺ (△) from cutaneous leishmaniasis patients (a, b) or healthy subjects (c, d). Each point represents one individual. ****P* < 0.001.

leishmaniasis, modifying the migration capability of inflammatory cells to skin lesions.

Modulation of homing molecules on lymphocytes can influence the function and migration pattern of effector cells. During active leishmaniasis CLA and LFA-1, but not CD62L^{high}, were affected in different ways on circulating CD4⁺ or CD8⁺ T cells. While both T cell subsets had a decreased percentage of CLA-positive cells, heightened levels of LFA-1 were expressed highly in lymphocytes in comparison with HS. However, these molecules were modulated differently on CD4⁺ or CD8⁺ T cell subsets. Although A-CL presented lower proportions of CLA⁺ cells in comparison to HS, a decreased tendency was most evident for T CD8⁺ than

for T CD4⁺. On the other hand, even considering that the vast majority of T CD8⁺ circulating lymphocytes are LFA-1⁺, we observed an increase of T CD4⁺ cells expressing these molecules in CL patients. This fact can indicate that the ability of T CD4⁺ cells to interact with the inflamed endothelium via LFA-1 is greater during active leishmaniasis. Conversely, in psoriasis, a disease also characterized by an influx of T lymphocytes to skin inflammatory infiltrate, CLA but not LFA-1 is up-regulated in T cells [23,31]. Additionally, high levels of blood CD8⁺ CLA⁺ T cells are related closely to the severity of the psoriasis [23]. Thus, expression of adhesion molecules seems to be dependent upon the nature of the stimuli triggering the lymphocytes.

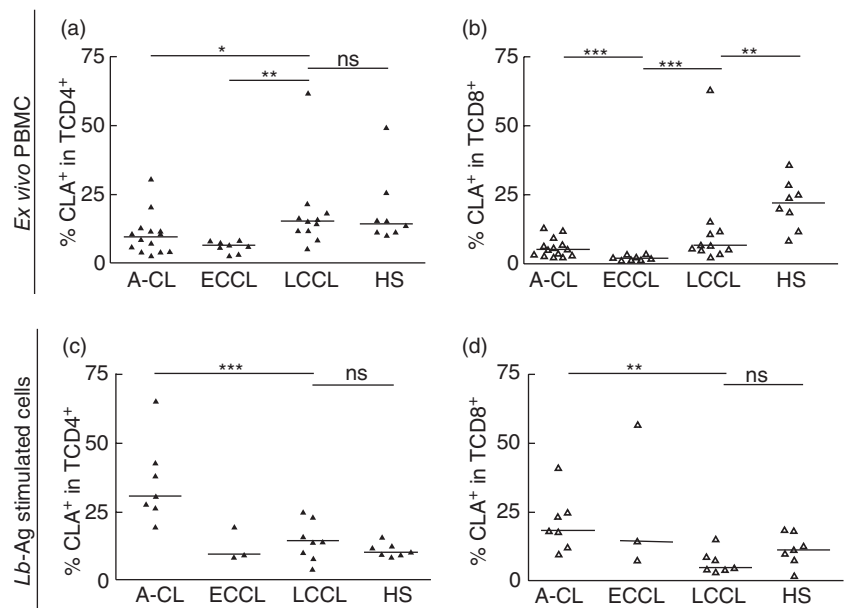


Fig. 4. Cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) molecules are differently expressed on CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the clinical course of cutaneous leishmaniasis. Patients were evaluated during active cutaneous leishmaniasis (A-CL), after the end of therapy (early cured, ECCL), and 1 year after the end of therapy (late cured, LCCL). Healthy subjects (HS) were used as control negative cases. The percentage of cells presenting CLA molecules in blood lymphocytes was verified for both T CD4⁺ (▲) and T CD8⁺ (△) either *ex-vivo* (a, b) and after *in vitro* stimulation with *Leishmania braziliensis* antigens (Lb-Ag) (c, d). Each point represents one individual and bars represent the median of the results. **P* < 0.05; ***P* < 0.01; ****P* < 0.001; n.s.: not significant.

T lymphocytes are activated in lymph nodes soon after *Leishmania* infection [15,32] and this activation leads to loss of expression of some molecules associated with permanence in lymph nodes or T cell migration to blood. Proinflammatory mediators, such as interleukin (IL)-1 and tumour necrosis factor (TNF)- α , released as a consequence of tissue injury due to an infected *Phlebotomus* bite, up-regulate adhesion molecules [p. ex. E-selectin, intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)] on endothelial cells from inflamed tissues [17], which can contribute to cell recruitment towards the inflamed skin compartment. Consequently, parasite-activated T cells are directed by adhesion molecules to affected tissues. It was demonstrated herein that *Leishmania* stimuli led to a fourfold increase of CLA on both CD4⁺ and CD8⁺ T cells cultured *in vitro*. Similar results were observed in mycobacterium or streptococcal antigen-stimulated PBMC from patients of leprosy or psoriasis, respectively [24,33]. That effect was observed in association with the immunopathological conditions present during active leishmaniasis, as it was not seen in clinically cured patients. No effect was seen for CD62L in A-CL. Thus, it was shown that *Leishmania* antigens can mediate the up-regulation of skin homing molecules on circulating activated specific T cells, which in addition to increased secretion of chemokines or expression of adhesion molecules in endothelium conjointly enable the cell influx into affected tissues [34,35]. Preliminary results have shown that this effect was related directly to leishmanial antigens, because this profile was not seen in lymphocytes stimulated *in vitro* with *Toxoplasma gondii* antigens. In this connection, the effect of non-related antigens on expression of homing molecules in *Leishmania* reactive cells is being investigated currently.

In addition to immunohistochemical studies showing positive CLA in lesions [14,29], we demonstrated that the proportion of CLA⁺ cells was higher in T CD4⁺ than in CD8⁺. Although other mononuclear cells than T cells such as monocytes and dendritic cells can express CLA [19], lymphocytes expressing CLA comprised 25% of the lesion cells. This number is much lower than that observed in psoriasis, where CLA-positive cells account for up to 90% of lesion T cells [36]. Several possibilities could explain the low frequency of T cells expressing CLA in CL lesions: (i) that *Leishmania*-specific T cells utilize other molecules (ligands or receptors) than CLA to enter the skin compartment; (ii) that after entering inflamed skin these cells down-regulated CLA expression; and (iii) or even after antigen activation, lesion-proliferating lymphocytes do not express *de novo* CLA.

An enrichment of CLA and LFA-1-positive cells was observed in lesions in comparison to blood. The lower levels of CLA-positive cells in blood can be a consequence of the migration of lymphocytes to a lesion. It is worthy of mention that the increase of cells expressing CLA was more expressive among CD8⁺ T cells (14.1-fold) in comparison to CD4⁺ T cells (eightfold), while LFA-1-positive cells were observed markedly among CD4⁺ T lymphocytes. Combining the

results obtained from blood and lesions open the discussion as to whether these CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets utilize different molecules preferentially to enter lesions. LFA-1 is already expressed highly in CD8⁺ T cells, and CLA up-regulation in *Leishmania*-reactive cells potentially improves its ability to migrate to the skin. On the other hand, homing CD4⁺ T cells can be facilitated by up-regulation of both CLA and LFA-1 on *Leishmania*-reactive cells. Interestingly, CLA-positive cells can use both VLA-4/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 for extravasation on skin surfaces [20], in congruence with the concept that redundant interactions are important to ensure cell migration.

In conclusion, CLA receptors are enriched in T lymphocytes from lesions of leishmaniasis patients, and leishmanial antigens are able to up-regulate these molecules in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. Functional studies can help understanding of the role of adhesion molecules in the traffic of inflammatory cells between T cell compartments and injured tissues. An intervention in CLA or other receptors proven to be important in pathogenesis can be a useful therapeutic strategy in the treatment of leishmaniasis.

Acknowledgements

We are grateful to the researchers of the Laboratório de Imunoparasitologia/IOC for the discussions, to Dr W. Savino and Dr S. Silva-Barbosa for their valuable suggestions, to the Unidade de Citometria de Fluxo, Faculdade de Ciências Médicas/UERJ, RJ, Brazil and to Rosângela Pellegrino for secretarial assistance. This work was supported financially by IOC/FIOCRUZ internal funds, CNPq Ed. Universal (475110/2006-4), FAPERJ (E-26/ 110-357/2008). PAPES IV/VPPDT/FIOCRUZ. E. N. J. is a postgraduate student of the Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas-FCM-UERJ. C. O. M.-A. and A. G.-S. are doctorate students sponsored by CNPq, Brazil. A. M. D.-C. was sponsored by CNPq and FAPERJ research fellows.

Disclosure

The authors have no financial conflicts of interest.

References

- 1 Romero GA, Guerra MVF, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: clinical findings and diagnostic approach. *Clin Infect Dis* 2001; **32**:1304–12.
- 2 Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA *et al.* American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro state, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 2000; **39**: 506–14.
- 3 Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN *et al.* Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. I. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1986; **28**:253–62.
- 4 Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK,

- Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 1990; **145**:3100–4.
- 5 Palma GI, Saravia NG. *In situ* characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. *Am J Dermatopathol* 1997; **19**:585–90.
 - 6 Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 2005; **153**:537–43.
 - 7 Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR *et al.* *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1985; **60**:241–8.
 - 8 Barral A, Jesus AR, Almeida RP *et al.* Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 1987; **9**:487–97.
 - 9 Conceição-Silva F, Dórea RCC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 1990; **79**:221–6.
 - 10 Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O *et al.* Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 1999; **180**:1731–4.
 - 11 Carvalho LP, Passos S, Bacellar O *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 2007; **29**:251–8.
 - 12 Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA. Epidermal immune privilege in American cutaneous leishmaniasis. In: Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sanchez MA, eds. *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. Texas: RG Landes Co., 1996; 139–52.
 - 13 Bourreau E, Prévot G, Gardon J *et al.* LACK-specific CD4⁺ T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun* 2002; **70**:3122–9.
 - 14 Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV, Convit J, Rondon AJ, Tapia FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp Dermatol* 2002; **11**:34–41.
 - 15 Costa RP, Gollob KJ, Machado PRL *et al.* Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4⁺ T cells from lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. *Immunol Lett* 2003; **90**:155–9.
 - 16 Schön MP, Zollner TM, Boehncke WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol* 2003; **121**:951–62.
 - 17 Santamaria-Babi LF. CLA⁺ T cells in cutaneous disease. *Eur J Dermatol* 2004; **14**:13–18.
 - 18 Picker LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol* 1994; **6**:394–406.
 - 19 Kieffer JD, Fuhlbrigge RC, Armerding D *et al.* Neutrophils, monocytes, and dendritic cells express the same specialized form of PSGL-1 as do skin-homing memory T cells: cutaneous lymphocyte antigen. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; **285**:577–87.
 - 20 Santamaria Babi LF, Moser R, Soler MTP, Picker LJ, Blaser K, Hauser C. Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *J Immunol* 1995; **154**:1543–50.
 - 21 Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996; **272**:60–6.
 - 22 Antúnez C, Torres MJ, Mayorga C, Cornejo-García JA, Santamaria-Babi LF, Blanca M. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte associated antigen⁺ T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2004; **34**:559–66.
 - 23 Sigmundsdóttir H, Gudjónsson JE, Jónsdóttir I, Lúdvíksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA⁺ CD8⁺ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol* 2001; **126**:365–9.
 - 24 Sieling PA, Legaspi A, Ochoa MT, Rea TH, Modlin RL. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. *Immunology* 2007; **120**:518–25.
 - 25 Pinheiro NF, Hermida MDR, Macedo MP, Mengel J, Bafica A, Dos-Santos WLC. *Leishmania* infection impairs β_1 -integrin function and chemokine receptor expression in mononuclear phagocytes. *Infect Immun* 2006; **74**:3912–21.
 - 26 Kariminia A, Bourreau E, Ronet C *et al.* Selective expression of the V β 14 T cell receptor on *Leishmania guyanensis*-specific CD8⁺ T cells during human infection. *J Infect Dis* 2007; **195**:739–47.
 - 27 Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Amato Neto V, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin Immunol* 2008; **128**:442–6.
 - 28 Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA, Fernández CT, Rondón AJ, Convit J. Adhesion molecules in lesions of American cutaneous leishmaniasis. *Exp Dermatol* 1994; **3**:17–22.
 - 29 Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV *et al.* Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol* 2007; **158**:50–8.
 - 30 Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME *et al.* Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol* 2008; **47**:926–32.
 - 31 Pont-Giralt M, Giménez-Arnau AM, Pujol RM, Santamaria-Babi LF. Circulating CLA⁺T cells from acute and chronic psoriasis patients manifest a different activation state and correlation with disease severity and extension. *J Invest Dermatol* 2006; **126**:227–8.
 - 32 Bomfim G, Andrade BB, Santos S, Clarêncio J, Barral-Neto M, Barral A. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am J Trop Med Hyg* 2007; **77**:854–9.
 - 33 Baker BS, Garioch JJ, Hardman C, Powles A, Fry L. Induction of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression by group A streptococcal antigens in psoriasis. *Arch Dermatol Res* 1997; **289**:671–6.
 - 34 El Hassan AM, Gaafar A, Theander TG. Antigen-presenting cells in human cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clin Exp Immunol* 1994; **99**:445–53.
 - 35 Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA *et al.* CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 2006; **193**:1313–22.
 - 36 Teraki Y, Miyake A, Takebayashi R, Shiohara T. Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol* 2004; **29**:658–63.

III.2 - Artigo 2

Título: “T-cells specific to *Leishmania* and other non-related microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions.”

Autores: Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG.

J Invest Dermat (em impressão)

RESUMO

Estudos patológicos têm contribuído para a caracterização *in situ* do infiltrado inflamatório na leishmaniose cutânea (CL). Entretanto, pouco se sabe sobre a reatividade das células T dessas lesões. Nosso objetivo foi analisar a responsividade dos linfócitos de lesões de CL a antígenos de *Leishmania* e outros antígenos não relacionados, em termos de proliferação e produção de citocinas. Células mononucleares foram extraídas de lesões e de sangue de pacientes infectados com *Leishmania (Viannia) braziliensis*. As células ativadas representavam 35-45% dos subtipos de células T. Níveis elevados de células T C1.7/CD244⁺CD8⁺ sugerem o envolvimento de células com funções efetoras citotóxicas. Linfócitos isolados de lesões de leishmaniose proliferaram e produziam IFN- γ em resposta aos antígenos de *Leishmania*, mas também a antígenos irrelevantes como o de *Toxoplasma gondii* (Tg). Os pacientes com lesões de maior tamanho apresentaram maior índice de proliferação linfocitária. Uma alta frequência de células Tg-específicas foi detectada em lesões por análise de diluição limitante, similar à frequência encontrada para as células *Leishmania*-específicas. As células Tg-reativas não foram encontradas nas lesões de pacientes sem história pregressa de toxoplasmose. A proporção de células TCD4⁺ e TCD8⁺ reativas a antígenos de *Leishmania* nas lesões foram variáveis. Esses resultados sugerem que células T reativas a antígenos não relevantes podem migrar para lesões de leishmaniose e possivelmente influenciar na patogênese da doença.

T Cells Specific to *Leishmania* and Other Nonrelated Microbial Antigens Can Migrate to Human Leishmaniasis Skin Lesions

Alda M. Da-Cruz¹, Manoel P. Oliveira-Neto², Álvaro L. Bertho³, Carolina O. Mendes-Aguiar¹ and Sergio G. Coutinho⁴

Immunopathological studies have contributed to the characterization of *in situ* inflammatory infiltrates in cutaneous leishmaniasis (CL). However, little is known about the T-cell antigen reactivity of these lesions. Our objective was to analyze the responsiveness of lymphocytes from CL lesions to leishmanial and nonrelated antigens in terms of proliferation and the production of cytokines. Mononuclear cells were extracted from lesions, and blood from CL patients infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Activated cells accounted for 35–45% of lesions T-cell subsets. Elevated levels of C1.7/CD244⁺CD8⁺ T cells suggest *in situ* cytotoxic effector function. Lymphocytes isolated from the leishmaniasis lesions proliferated and produced IFN- γ in response to leishmanial antigens as well as to irrelevant antigens such as *Toxoplasma gondii* (Tg). Patients presenting with larger lesions had the highest lymphocyte proliferation indexes. A high frequency of Tg-specific cells was detected in the lesions by limiting dilution assay, similar to the frequency of *Leishmania*-specific cells. Importantly, Tg-reactive cells were not found in lesions of patients without a history of toxoplasmosis. The proportion of *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells in the lesions was quite variable. Overall, these data suggest that T cells reactive to nonrelevant antigens can migrate to leishmanial lesions and possibly influence the pathogenesis of the disease.

Journal of Investigative Dermatology advance online publication, 28 January 2010; doi:10.1038/jid.2009.428

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common clinical form of American tegumentary leishmaniasis; in Brazil, it is caused mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Lb) (Oliveira-Neto *et al.*, 2000). CL lesions have the following pathological characteristics: (i) a transitory, but reversible, cellular pattern that can be modified according to disease progression (Magalhães *et al.*, 1986); (ii) distinct histopathological findings in the same lesion (Bittencourt and Barral 1991); and (iii) a granulomatous organization involving both the synthesis and the degradation of the extracellular matrix (Esterre *et al.*, 1991). In contrast to other skin diseases such as leprosy (Sarno *et al.*, 1984; Modlin *et al.*, 1985) and psoriasis (Nikaein *et al.*, 1991), the histopathological pattern has no

correlation with the clinical phase and does not predict the outcome of the infection (Magalhães *et al.*, 1986; Bittencourt and Barral, 1991). T lymphocytes are the predominant cells in the lesions, but the distribution of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets is extremely variable (Barral *et al.*, 1987; Pirmez *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 1994; Palma and Saravia, 1997; Amato *et al.*, 2003; Da-Cruz *et al.*, 2005; Campanelli *et al.*, 2006) and does not correlate with the proportion of *Leishmania*-specific T cells in blood (Tapia *et al.*, 1994; Da-Cruz *et al.*, 2005). These data suggest that the local skin microenvironment and immunoregulatory factors can favor the recruitment, proliferation, or even death of specific T-cell populations within the lesions (Tapia *et al.*, 1994; Santamaria Babi *et al.*, 1995; Butcher and Picker, 1996; Orteu *et al.*, 1998; Bertho *et al.*, 2000; Eidsmo *et al.*, 2005).

In situ immunopathological studies have improved our understanding of the microanatomical distribution of skin-infiltrating cells (Barral *et al.*, 1987; Pirmez *et al.*, 1990; Lima *et al.*, 1994; Palma and Saravia, 1997), as well as the pattern of cytokines and chemokines that are produced in American tegumentary leishmaniasis lesions (Pirmez *et al.*, 1993; Ritter *et al.*, 1996). However, given the difficulty in obtaining a sufficient number of cells for *ex vivo* analysis, very few studies have examined the antigen reactivity of the T cells present in the lesions and how parasites infecting tissues can modulate the local immune response. *Leishmania*-specific

¹Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; ²Instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas, IPEC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; ³Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Análise e Sorting, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil and ⁴Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil

Correspondence: Alda M. Da-Cruz, Laboratório Interdisciplinar de Pesquisas Médicas, Instituto Oswaldo Cruz, Av. Brasil 4365, Pavilhão Gomes Faria térreo, Manguinhos, Rio de Janeiro, CEP 21040-900, Brazil.
E-mail: alda@ioc.fiocruz.br

Received 28 May 2009; revised 10 October 2009; accepted 4 November 2009

T-cell clones generated from lesions proliferate in response to *Leishmania*, but not in response to other nonrelated antigens, such as purified protein derivative (Pirmez *et al.*, 1993). Moreover, the fact that Lb-specific T cells are present at a higher frequency in lesions than in blood clearly shows that fundamental immunological events are occurring at this site (Conceição-Silva *et al.*, 1990).

In experimental leishmaniasis, parasite-specific T cells can contribute to tissue damage (Titus *et al.*, 1984). However, although nonspecific cells have been shown to be involved in the pathogenesis of several immune-based inflammatory diseases (Gijbels *et al.*, 1994; Sitia *et al.*, 2004), this possibility has not been examined in parasitic diseases. Our study was based on the observation that, despite the high frequency of *Leishmania*-reactive T cells in the lesions (Conceição-Silva *et al.*, 1990), they probably do not constitute the total population of memory lymphocytes found in the affected tissues. To address the immunoresponsiveness of the cells infiltrating skin lesions, we evaluated T-cell activation and the production of cytokines in response to leishmanial antigens in American tegumentary leishmaniasis lesions. Moreover, we investigated the possibility that lymphocytes reactive to nonrelated antigens are also found in leishmanial lesions.

RESULTS

Responsiveness of lesion-derived T lymphocytes to leishmanial antigens

Primary *in vitro* cell cultures were grown to determine the level of cell activation based on the lymphocyte proliferative response (LPR) and IFN- γ production (Tables 1 and 2). The LPR to *Leishmania* antigens was positive (stimulation index >2.5) in lesions from 12 of 23 patients, and IFN- γ was detected in 12 of 18 cases. Seventeen patients were studied using both assays. Of these 17 patients, 14 (82.4%) had activated lymphocytes in the lesions (9 had a positive LPR and produced IFN- γ , 3 showed only a positive LPR, and 2 produced only IFN- γ); only 3 (17.6%) were not responsive in either test. Importantly, the mononuclear cells from leishmanial lesions (LMNCs) of all these patients were activated under mitogenic stimuli (Table 2). There was no correlation between the LPR or IFN- γ production and the lesion size or induration in a Montenegro skin test, a delayed-type hypersensitivity-based test against leishmanial antigens. However, patients with lesions larger than 20 mm (patients 17, 41, and 42) tended to show the highest levels of lymphocyte proliferation; this increase was statistically significant compared with those presenting with lesions smaller than 20 mm ($P=0.05$; Table 1). There was no association between the T-cell phenotype and the magnitude of leishmanial antigen-induced lymphocyte proliferation. In the absence of exogenous stimuli, LMNC cultures, like the control peripheral blood mononuclear cell (PBMC) cultures, did not proliferate. In addition, only two samples showed a low level of IFN- γ production in nonstimulated LMNC cultures (Table 2). Thus, the T cells that had infiltrated the lesions were able to properly respond to leishmanial antigens, although in a minority of cases no response was observed.

T cells derived from lesions are activated by *Toxoplasma* antigens

To determine whether T lymphocytes specific for antigens not related to *Leishmania* infection were present in leishmaniasis lesions, we stimulated LMNCs with *Toxoplasma gondii* (Tg), a parasite that is not phylogenetically related to *Leishmania*, and *Trypanosoma cruzi*, which is known to have cross-immunity with leishmanial antigens (Carvalho *et al.*, 1987).

Sixteen leishmaniasis patients with serological evidence of previous *Toxoplasma* infection were evaluated along with seven seronegative patients (Table 3). In 12 of 16 (75%) chronic toxoplasmosis patients, lymphocytes from the leishmaniasis lesions were activated in response to *Toxoplasma* antigens, as shown by positive LPR and/or IFN- γ production. PBMCs from all Tg-infected Lb patients studied were positive in these tests (Table 3). A high level of IFN- γ was detected in the LMNC cultures, indicating that these lymphocytes were able to secrete cytokines *ex vivo* in response to non-leishmanial stimuli. Importantly, LMNCs and PBMCs from leishmaniasis patients without evidence of chronic toxoplasmosis did not show significant lymphocyte proliferation or IFN- γ production in response to *Toxoplasma* antigens (Table 3). These data show that circulating lymphocytes can be recruited to inflamed lesions independent of their specificity to leishmanial antigens.

As expected, blood lymphocytes responded to *T. cruzi* (data not shown), but, curiously, lymphocyte reactivity to these antigens was detected in only 2 (IE = 11.3 and 3.4, IFN- γ = 150 and 1,190 pg ml⁻¹, respectively) of 18 lesions.

To ensure that there was no cross-reactivity between the parasite antigens, we expanded short-term cultures of T lymphocytes *in vitro* in the presence of *Leishmania* or *Toxoplasma* antigens and restimulated with the parasite antigens. T cells responding to *Leishmania* proliferated in response to leishmanial antigens but not to Tg antigens (data not shown).

To exclude the possibility that the responding lymphocytes present in the LMNCs were a consequence of blood extravasation during the biopsy procedure, we compared the frequency of cells responsive to *Leishmania* and *Toxoplasma* antigens in blood with that of lesions from three patients also chronically infected by Tg using a limiting dilution assay (Figure 1). As expected, a low frequency of *Leishmania*-specific T cells was observed in the blood, in contrast to the higher frequency detected in the lesions. Interestingly, a similar profile was observed for *Toxoplasma*-reactive T cells. Because the frequency of *Toxoplasma*-specific T lymphocytes was greater in the lesions than in the PBMCs (Figure 1), we can exclude the possibility of blood contamination. Therefore, T lymphocytes reactive to non-related antigens not only are attracted to leishmaniasis lesions but are found in frequencies as high as those observed for *Leishmania*-reactive T cells.

Type 2 cytokine production by cells from leishmaniasis lesions

Because type 2 cytokines are expressed in leishmaniasis lesions (Pirmez *et al.*, 1993), we investigated whether leishmanial antigens could induce LMNCs to secrete IL-4

Table 1. Phenotypic profile of lesion-derived T lymphocytes and immune responsiveness of cells obtained from cutaneous leishmaniasis lesions to leishmanial antigens

Patient number	Lesion size (cm ²)	Number of cells obtained from lesion	MST (mm)	Phenotype of lesion T lymphocytes <i>ex vivo</i>			Lymphoproliferative response to Lb		IFN- γ production (pg ml ⁻¹)
				CD3 ⁺ (%)	CD4 ⁺ (%)	CD8 ⁺ (%)	c.p.m.	SI	
Pt 07	5.9	5 × 10 ⁶	12	37.1	31.6	16.1	210	5.3	2,520
Pt 09	3.4	5 × 10 ⁶	10	78.6	35.7	27.6	26,070	8.4	11,300
Pt 12	11.8	4.5 × 10 ⁶	15	ND	35.2	25.4	3,820	7.1	3,140
Pt 13	6.3	0.7 × 10 ⁶	08	ND	17.6	25.3	394	1.7	ND
Pt 15	4.9	3 × 10 ⁶	50	ND	19.9	46.2	850	0.4	3,890
Pt 17	29.8	12 × 10 ⁶	20	ND	42.3	37.8	8,520	22.3	1,320
Pt 19	3.9	1.5 × 10 ⁶	02	ND	23.4	60.1	450	0.9	ND
Pt 20	5.9	2.5 × 10 ⁶	14	ND	26.4	54.8	2,720	5.1	3,480
Pt 21	4.5	5.0 × 10 ⁶	12	55.0	29.7	27.0	1,060	1.7	ND
Pt 25	7.7	9.0 × 10 ⁶	10	72.5	37.9	26.3	ND	ND	ND
Pt 39	2.4	3.5 × 10 ⁶	46	65.4	40.6	31.1	250	0.7	0
Pt 41	25.5	2.0 × 10 ⁶	22	ND	31.8	19.2	7,680	28.8	1,760
Pt 42	28.3	13 × 10 ⁶	55	87.3	30.5	49.4	2,500	11.6	4,380
Pt 43	61.2	1.5 × 10 ⁶	20	54.9	28.5	19.0	2,500	3.0	0
Pt 44	5.9	2.2 × 10 ⁶	15	66.0	7.0	23.0	4,020	22.4	3,570
Pt 45	7.9	1.0 × 10 ⁶	11	32.8	9.2	24.8	316	1.6	ND
Pt 46	15.7	3.7 × 10 ⁶	26	ND	47.2	28.6	2,180	3.0	0
Pt 47	3.4	1.7 × 10 ⁶	36	ND	12.1	27.8	198	1.2	0
Pt 48	11	5.1 × 10 ⁶	22	ND	15.4	21.8	2,030	4.0	792
Pt 50	9.8	1.7 × 10 ⁶	32	ND	ND	ND	1,810	2.3	632
Pt 51	16.5	8.1 × 10 ⁶	13	ND	ND	ND	524	1.0	374
Pt 53	18.8	3.9 × 10 ⁶	16	ND	ND	ND	178	1.3	0
Pt 55	12.9	2.3 × 10 ⁶	39	ND	ND	ND	511	4.2	ND
Pt 56	5.9	0.5 × 10 ⁶	23	ND	ND	ND	147	1.1	0

Abbreviations: c.p.m., counts per minute; Lb, *Leishmania (Viannia) braziliensis*; MST, Montenegro skin test; ND, not determined; Pt, patient; SI, stimulation index.

and IL-5. No IL-4 was detected by ELISA in either the stimulated PBMCs or the LMNCs. IL-5 was detected in the cultures of PBMCs from four patients (9.9–41.1 pg ml⁻¹), but this cytokine was not detected in LMNC cultures. These data indicate that very low levels of IL-5 are secreted by lesion-derived cells. It is possible that similar effects occur with IL-4, although we cannot certify this on the basis of our current data.

Phenotypic analysis of T lymphocytes derived from leishmaniasis lesions

Because the cellular infiltrate of lesions seemed to include subsets of lymphocytes that recognized different antigens, we investigated the proportion of CD4⁺ or CD8⁺ T cells directly *ex vivo* (Table 1) and following expansion with leishmanial stimuli (Figure 2).

The mean fraction of activated T cells expressing CD25 or CD69 (Figure 3) among the CD4⁺ T cells (CD25⁺ =

44.7 ± 20.5%, median = 39.4%; CD69⁺ = 59.4 ± 18.4%, median = 54.8%; *n* = 7) and the CD8⁺ T cells (CD25⁺ = 35.8 ± 19.3%, median = 35.7%; CD69⁺ = 36.3 ± 12.9%, median = 38.6%; *n* = 7) was higher in lesions than in blood (*P* < 0.05). Furthermore, a high proportion of CD8⁺ T cells expressed C1.7 (79.3 ± 10.5%; median = 78.9%; *n* = 7), a molecule associated with cytotoxicity.

The percentage of *Leishmania*-reactive CD4⁺ or CD8⁺ T cells isolated from the lesions was quite variable after antigenic stimulation. The cultures from five patients contained a higher percentage of *Leishmania*-reactive CD4⁺ T cells than CD8⁺ T cells; cultures from four patients had a predominance of CD8⁺ T cells, and cultures from four other patients showed similar proportions of both T-cell subsets. A similarity between the proportion of nonstimulated CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and *Leishmania*-responsive T-cell subsets in skin lesions was seen in 6 of 13 patients. However, there was no significant association between the proportion

Table 2. Lymphocyte proliferative responses and IFN- γ production of LMNCs or PBMCs from cutaneous leishmaniasis patients after *in vitro* stimulation with *Leishmania* antigens or mitogen concanavalin A

<i>In vitro</i> T-cell stimulation	LMNC ^{1,2}		PBMC ^{1,2}	
	LPR (c.p.m.)	IFN- γ (pg ml ⁻¹)	LPR (c.p.m.)	IFN- γ (pg ml ⁻¹)
Control	553 \pm 144 (-/23)	409 \pm 215 (2/11)	610 \pm 220 (-/22)	0 (-/12)
Concanavalin A	6,600 \pm 1,510 (21/23)	4,360 \pm 1,260 (11/11)	9,820 \pm 2,520 (22/22)	2,920 \pm 590 (10/10)
<i>Leishmania</i> antigens	5,230 \pm 2,028 (12/23)	3,100 \pm 844 (12/18)	8,420 \pm 1,540 (22/22)	4,610 \pm 1,390 (15/15)

Abbreviations: c.p.m., counts per minute; -, no cases; LMNC, mononuclear cell derived from lesion; LPR, lymphocyte proliferative responses; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

¹Values are presented as the mean \pm standard deviation.

²In parenthesis, number of patients with positive results (LPR \geq 2.5 or IFN- γ \geq 62.5 pg ml⁻¹)/number of patients analyzed.

Table 3. Lymphocyte proliferative responses and IFN- γ production of LMNCs and PBMCs from cutaneous leishmaniasis patients after *in vitro* stimulation with *Toxoplasma gondii* antigens

Indirect immunofluorescent assays to <i>Toxoplasma gondii</i> ¹	LMNC ^{2,3}		PBMC ^{2,3}	
	LPR (c.p.m.)	IFN- γ (pg ml ⁻¹)	LPR (c.p.m.)	IFN- γ (pg ml ⁻¹)
Seropositive	8,360 \pm 5,010 (10/16)	3,350 \pm 1,370 (5/11)	9,240 \pm 4,840 (15/15)	6,070 \pm 2,120 (11/11)
Seronegative	300 \pm 52 (7/7)	0 (2/2)	1,290 \pm 572 (7/7)	0 (2/2)

Abbreviations: c.p.m., counts per minute; -, no cases; LMNC, mononuclear cell derived from lesion; LPR, lymphocyte proliferative responses; PBMC, peripheral blood mononuclear cell.

¹The leishmaniasis patients were grouped according to the presence (seropositives) or absence (seronegatives) of serum antibodies against *Toxoplasma gondii*.

²Values are presented as mean \pm standard deviation.

³In parenthesis, number of patients with positive results (LPR \geq 2.5 or IFN- γ \geq 62.5 pg ml⁻¹)/number of patients analyzed.

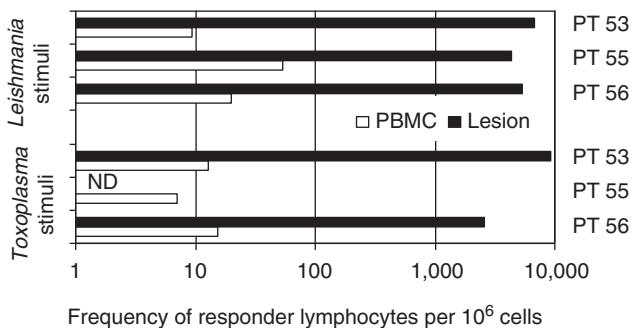


Figure 1. Mononuclear cell from leishmanial lesion (LMNC) and PBMC proliferation in response to parasite antigens. The frequency of cells specific for *Leishmania braziliensis* or *Toxoplasma gondii* (Tg) antigens was determined using limiting dilution assays as described in Materials and Methods. The results are from three leishmaniasis patients who were also chronically infected by Tg and are expressed as the number of parasite-specific cells per 10⁶ mononuclear cells. ND, not determined; PT, patient.

of lesion-derived, Lb-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in culture (Figure 2a) and their proportion in the inflammatory infiltrate (Figure 2b).

DISCUSSION

Clones of lesion-derived T cells grown in IL-2-supplemented culture medium have been used for immunological studies of leishmaniasis (Pirmez *et al.*, 1990) and other inflammatory

diseases, such as psoriasis (Menssen *et al.*, 1995), leprosy (Modlin *et al.*, 1986), Chagas disease (Cunha-Neto *et al.*, 1998), and tuberculosis (Tan *et al.*, 1997). However, the addition of cytokines to the medium can modify the population of T-cell subsets (Tan *et al.*, 1997) and also interfere with the cytokine network (Jung *et al.*, 1995). In this study, lesion-derived lymphocytes were able to proliferate and/or produce IFN- γ in primary *ex vivo* cell cultures stimulated with Lb antigens. Although patients with larger lesions tended to show higher levels of lymphocyte proliferation, no other clinical parameter was associated with the immunological data. Only a small number of patients (17.6%) did not respond to the antigens, probably because of an advanced stage of differentiation of their lesion skin cells. IL-4 and IL-5 were not detected in the supernatants of cell cultures derived from any lesion, but mRNA or *in situ* detection of these cytokines has already been demonstrated (Pirmez *et al.*, 1993; Diaz *et al.*, 2002).

The proportion of lesion *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes could not be consistently associated with the T-cell subsets infiltrating these skin lesions. An equivalent blood CD4⁺/CD8⁺ ratio seems beneficial, given that these ratios are most frequently observed during the healing process (Da-Cruz *et al.*, 1994). Although the proportion of T cells from the lesions was variable after expansion with leishmanial antigens, the majority of cases presented the same profiles that could favor CD8⁺ T-cell function. Accordingly, cytotoxic CD8⁺ T cells and NK cells

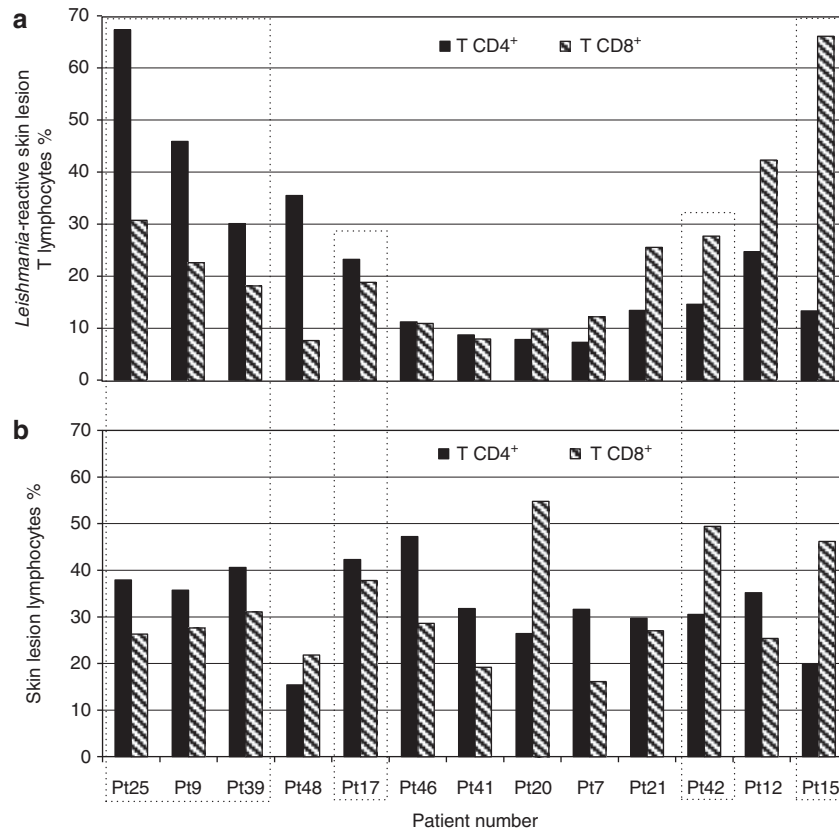


Figure 2. Phenotype of lesion-derived CD4⁺ and CD8⁺ T cells directly ex vivo and after stimulation with leishmanial antigens. Comparison of the proportions of *Leishmania*-specific CD4⁺ and CD8⁺ T-cell mononuclear cells from leishmanial lesions (LMNCs) from 13 cutaneous leishmaniasis patients after *in vitro* stimulation with *Leishmania braziliensis* antigens (a) and directly ex vivo (b). The boxes highlight the cases presenting similar T-cell subset profiles. Pt, patient.

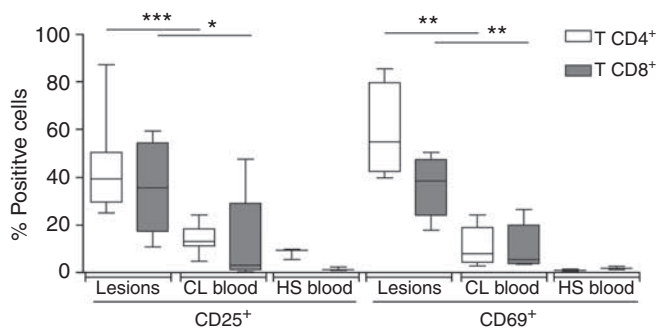


Figure 3. Activation phenotype of lesion- and blood-derived CD4⁺ and CD8⁺ T cells directly ex vivo. Comparison of the proportions of CD4⁺ and CD8⁺ T-cell presenting molecules associated with activation status (CD25 and CD69) measured directly ex vivo in mononuclear cells from lesions and blood of cutaneous leishmaniasis patients (CL) and healthy subjects (HS). **P*<0.05, ***P*<0.005, ****P*<0.001.

were observed *in situ* in the dermal infiltrate of Lb patients (Machado *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005). However, the presence of these effector cells, which was also suggested by the high level of CD8⁺ T cells expressing C1.7 observed in this study, does not guarantee clearance of the infection. The observation that CD4⁺CD25⁺Treg cells derived from CL lesions are able to suppress the proliferation of allogeneic

PBMCs suggests that these regulatory cells could impair effector T-cell function, possibly contributing to parasite persistence and the chronic nature of the lesions (Campanelli *et al.*, 2006). Therefore, the functional analysis of these *Leishmania* antigen-expanded T cells should help to clarify the balance of immune mechanisms contributing to clearance of the infection.

The observation that the frequency of *Leishmania*-reactive T cells is higher in lesions than in blood reinforces the idea that an enrichment of lymphocytes occurs at the inflammatory site (Conceição-Silva *et al.*, 1990). It is therefore conceivable that parasites present in the lesions can lead to the local expansion of T cells and to the release of soluble factors contributing to the maintenance of inflammatory infiltrate. Local regulatory phenomena occurring at the lesion possibly redirect the immune response of lymphocytes that migrate from the blood. Given that memory T cells are the predominant, but not exclusive, type of lymphocyte in lesions (Pirmez *et al.*, 1993), it is possible that lymphocytes with other specificities are present in the inflammatory infiltrate. We showed that *Toxoplasma*-specific T cells are present in leishmaniasis lesions at an elevated frequency, even as high as the frequency of *Leishmania*-reactive lymphocytes. Moreover, these nonspecific cells not only proliferate but also produce cytokines such as IFN- γ after stimulation with *Toxoplasma*-derived antigens. Indeed, these nonspecific cells

can be activated by cytokines released after the stimulation of specific cells by *Leishmania* antigens (Unutmaz *et al.*, 1994).

The finding of T lymphocytes specific to other antigens within leishmanial lesions was predictable, because the inflammatory reaction induces a change in the expression of endothelial adhesion molecules and the release of chemoattractive cytokines, both of which facilitate the influx of circulating cells with different specificities to the inflamed tissue (Tapia *et al.*, 1994; Santamaria Babi *et al.*, 1995; Butcher and Picker 1996; Ritter *et al.*, 1996; Mendes-Aguiar *et al.*, 2009). However, the low frequency of *T. cruzi*-reactive cells in lesions compared with blood is unexpected and suggests the selective direction of circulating *T. cruzi*-specific lymphocytes into the inflammatory site (Menssen *et al.*, 1995; Butcher and Picker, 1996).

The demonstration of nonspecific cells also reopens the question of how these lymphocytes participate in the immunopathogenesis of leishmaniasis. In an experimental *L. major* infection model, irrelevant ovalbumin-specific T cells enhanced the progression of lesions when the mice were injected with the parasite in addition to ovalbumin (Titus *et al.*, 1984). Moreover, it is known that associated diseases can influence the outcome of leishmaniasis (Santiago *et al.*, 1999; Da-Cruz *et al.*, 2000; O'Neal *et al.*, 2007). It has been shown that non-antigen-specific mononuclear cells lead to tissue damage in hepatitis (Sitia *et al.*, 2004) and autoimmune encephalomyelitis (Gijbels *et al.*, 1994). These data suggest that recruitment of lymphocytes specific for other antigens is a critical step in the generation of the inflammatory infiltrate, thereby influencing the outcome of the disease.

Taken together, our results show that T cells from leishmaniasis lesions are able to proliferate and produce IFN- γ , not only in response to leishmanial antigens but also after stimulation with antigens from other nonrelated parasites. Therefore, cell populations specific for other antigens can also migrate to the leishmanial lesion. Modulation of chemokine production by parasite antigens can certainly contribute to the differential migration of cell populations. Finally, we hypothesize that although the initial stimulus is induced by *Leishmania* antigens, once tissue injury is established, maintenance of the inflammatory process is not only a consequence of the specific immune response. As demonstrated in other diseases, nonspecific T cells can effectively contribute to the pathological process, either by producing cytokines or by inducing regulatory mechanisms. Therefore, elucidating the role of lymphocytes specific for *Leishmania* or nonrelevant antigens during recovery from or aggravation of leishmaniasis is important in understanding the pathogenesis of the disease.

MATERIALS AND METHODS

Patients

Twenty-four CL patients (16 men and 8 women; mean age 31.2 ± 17.1 years, median 26.5 years) were studied. The diagnostic criteria were based on clinical, parasitological, histological, and immunological parameters. The mean duration of the illness before diagnosis was 83.3 ± 42.9 days (median 67.5 days). Parasites were isolated from 20 of the 24 cases and were determined to be Lb

(Cupolillo *et al.*, 2003). *Leishmania*-specific antibodies were detected by indirect immunofluorescence in 9 of 24 patients. To investigate a history of toxoplasmosis, we assessed the presence of *Toxoplasma*-specific antibodies in the serum using an indirect immunofluorescence assay. Blood samples from seven healthy subjects were used as controls.

This study was conducted according to the Declaration of Helsinki Principles and was approved by the ethics committee of the Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde, Brazil. Participants gave their written informed consent.

Mononuclear cells from leishmanial lesions

Skin biopsies were taken for diagnostic purposes, and mononuclear cells were obtained from the lesions (Modlin *et al.*, 1986; Da-Cruz *et al.*, 2005). In brief, the tissue was cut into pieces and pushed through a 64- μ m mesh filter using surgical scalpels. The single-cell suspension was washed, pelleted by centrifugation, and resuspended in conical tubes. After decanting for 5 minutes, the supernatant, which was free of debris, was centrifuged over a Ficoll-Hypaque gradient (Histopaque 1077; Sigma Chemical Co., St Louis, MO). The ring containing the mononuclear cells was collected and adjusted to 10^6 cells per milliliter in complete RPMI 1640 supplemented with 10% human AB Rh⁺ serum.

Lymphocyte proliferative assays

PBMCs were obtained by centrifugation over a Ficoll-Hypaque gradient (Da-Cruz *et al.*, 1994). LMNCs (10^5 cells) were cocultured with 2×10^5 irradiated (5,000 Grays; Theratron 780; AEC, Gaithersburg, MD) autologous PBMCs as "feeder cells." The LMNCs and PBMCs (3×10^5 per well) were seeded in triplicate into 96-well, round-bottom plates (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) in a final volume of 200 μ l. "Feeder cells" were also cultured alone as a control. The cells were incubated for 4 days at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂ in air in the presence of (i) the equivalent of 10^6 disrupted promastigotes of Lb (MHOM/BR75/M2903) per well, (ii) 2×10^6 taquizoites of Tg, (iii) 2×10^6 epimastigotes of *T. cruzi*, (iv) 4 μ g per well of concanavalin A (Sigma), or (v) medium alone. After 4 days of culture, 1 μ Ci of ³H-labeled thymidine (Amersham International, Amersham, UK) was added to each well, and the cultures were incubated for an additional 16 hours (Da-Cruz *et al.*, 1994). The results are expressed as counts per minute or as stimulation indexes, the mean count in the wells containing antigens or mitogen divided by the background (mean count in nonstimulated wells). Stimulation indexes equal to or greater than 2.5 were considered positive. In addition, the supernatants of these cultures were collected and stored at -20 °C until use. Timed kinetic experiments had been performed previously to establish the period of maximum proliferation of cells and the peak of cytokine production.

Flow cytometric analysis of tissue-derived T cells

Leishmanial antigen-reactive T cells were obtained after *in vitro* stimulation of LMNCs (10^6 per well) cocultured with "feeder cells" (2×10^6 per well). The cells were plated in 24-well, flat-bottom plates (Nunc, Roskilde, Denmark) and cultured in the presence of 5×10^6 disrupted Lb promastigotes (2 ml per well) under the conditions described above. After 4 days in culture, the Lb-specific cells were separated by centrifugation over a discontinuous Percoll gradient (Sigma). *Ex vivo* LMNCs as well as Lb-specific blast cells

were stained with 5 μ l of monoclonal antibodies: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25, anti-CD69, and anti-C1.7/CD244 (Beckman Coulter, Hialeah, FL). For flow cytometric analysis, 10,000 events per sample were acquired using an EPICS ALTRA flow cytometer (Beckman Coulter), and the data were analyzed using EXPO32 software (Beckman Coulter).

Limiting dilution assays for analysis of the frequency of *Leishmania*- or *Toxoplasma*-specific T cells

The quantification of the frequency of Lb-specific T cells from blood and lesions was performed (Conceição-Silva *et al.*, 1990), with some modifications. Briefly, 32 wells of LMNCs were cultured at four concentrations (5, 10, 50, or 100 viable cells per well) using 96-well round-bottom plates in the presence of 2×10^5 "feeder cells" and 5×10^5 Lb promastigotes per well. The same procedures were used for the analysis of Tg-reactive T cells. As a control, 48 wells containing 2×10^5 "feeder cells" per well along with the parasite antigens, as well as 24 replicate wells containing 10 responder cells and 10^5 "feeder-cells" without exogenous antigens, were used.

For analysis of the frequency of parasite antigen-reactive lymphocytes from the blood, 32 wells of PBMCs were cultured at three concentrations (1×10^4 , 4×10^4 , and 8×10^4 cells per well) in 200 μ l per well for 7 days in the presence of *Leishmania* or *Toxoplasma* antigens as described above. The estimate of the minimal T-cell frequency was calculated using the χ^2 -test method. The frequency of parasite-specific T cells was estimated as the reciprocal of the cell concentration at which the *in vitro* cultures were negative. The frequency analysis showed that a single-hit Poisson model was followed in all experiments. The estimated frequencies were calculated using ELIDA 1.1 software (Carls Taswell), and results are expressed as the number of parasite antigen responder lymphocytes per 10^6 cells.

Quantification of cytokines

The culture supernatants were collected for quantification of IL-4 (day 3), IL-5 (day 3), and IFN- γ (day 4). IFN- γ was measured by ELISA using a human IFN- γ -specific antibody for capture (clone NIB4S; Pharmingen, San Diego, CA) and a biotinylated IFN- γ -specific antibody for detection (clone 4S.B3). The limit of detection was 62.5 pgml⁻¹. IL-4 and IL-5 were quantified using commercial Quantikine kits (R&D Systems, Minneapolis, MN) according to the manufacturer's protocol, and the limit of detection was 31.2 and 7.8 pgml⁻¹ for IL-4 and IL-5, respectively.

Statistical analysis

A Mann-Whitney *U*-test or Spearman's rank correlation was performed using GraphPad InStat V2.04 software (GraphPad Software, San Diego, CA).

CONFLICT OF INTEREST

The authors state no conflict of interest.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Instituto Oswaldo Cruz (internal funds) and by European Economic Community grants. We gratefully acknowledge W Savino for revising this paper; C Pirmez, H Goto, and J Louis for their valuable suggestions; Wilson J Silva for serological analysis; R Nogueira and VP Lima for their important help in the laboratory; and R Pellegrino for her

secretarial support. We are indebted to the clinicians who contributed to this work and to the Serviço de Radioterapia of Instituto Nacional do Cancer/MS for the use of the Theratron 780 teletherapy unit.

REFERENCES

- Amato VS, Andrade HF Jr, Duarte MIS (2003) Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop* 85:39-49
- Barral A, Jesus AR, Almeida RP *et al.* (1987) Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 9:487-97
- Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM *et al.* (2000) Detection of early apoptosis and cell death in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 33:317-25
- Bittencourt AL, Barral A (1991) Evaluation of the histopathological classification of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 86:51-6
- Butcher EC, Picker LJ (1996) Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 272:60-6
- Campanelli AP, Roselino AM, Cavassani KA *et al.* (2006) CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis* 193:1313-22
- Carvalho EM, Reed SG, Johnson WD Jr (1987) Cross reactivity between *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in the lymphocyte blastogenesis assay. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 81:82-4
- Conceição-Silva F, Dórea RCC, Pirmez C *et al.* (1990) Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 79:221-6
- Cunha-Neto E, Rizzo LV, Albuquerque F *et al.* (1998) Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz J Med Biol Res* 31:133-7
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB *et al.* (2003) Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol* 41:3126-32
- Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP *et al.* (2005) Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 153:537-43
- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL *et al.* (1994) *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:2614-8
- Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP *et al.* (2000) Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 94:569-71
- Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV *et al.* (2002) Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of lesion. *Exp Dermatol* 11:34-41
- Eidsmo L, Nylen S, Khamesipur A *et al.* (2005) The contribution of the Fas-FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis. *Am J Pathol* 166:1099-108
- Esterre P, Dedet JP, Guerret S *et al.* (1991) Matrix remodeling and fibroblast phenotype in early lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Path Res Pract* 187:924-30
- Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J Jr *et al.* (2005) Decreased *in situ* expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73:7853-9
- Gijbels R, Galardy RE, Steinman L (1994) Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 94:2177-82

- Jung T, Schauer U, Rieger C *et al.* (1995) Interleukin-4 and interleukin-5 are rarely co-expressed by human T cells. *Eur J Immunol* 25:2413-6
- Lima HC, Vasconcelos AW, David JR *et al.* (1994) American cutaneous leishmaniasis: *in situ* characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg* 50:743-7
- Machado P, Kanitakis J, Almeida R *et al.* (2002) Evidence of *in situ* cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 12:449-51
- Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN *et al.* (1986) Histopatologia da leishmaniose tegumentar por *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med trop São Paulo* 28:253-62
- Meeusen ENT, Premier RR, Brandon MR (1996) Tissue-specific migration of lymphocytes: a key role for Th1 and Th2 cells? *Immunol Today* 17:421-4
- Mendes-Aguiar CO, Gomes-Silva A, Nunes E Jr *et al.* (2009) The skin homing receptor cutaneous leukocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 157:377-84
- Menssen A, Trommler P, Vollmer S *et al.* (1995) Evidence for an antigen-specific cellular immune response in skin lesions of patients with psoriasis vulgaris. *Immunol* 155:4078-83
- Modlin RL, Mehra V, Wong L *et al.* (1986) Suppressor T lymphocytes from lepromatous skin leprosy lesions. *J Immunol* 137:2831-4
- Modlin RL, Tapia FJ, Bloom BR *et al.* (1985) *In situ* characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 60:241-8
- Nikaein A, Phillips C, Gilbert SC *et al.* (1991) Characterization of skin-infiltrating lymphocytes in patients with psoriasis. *J Invest Dermatol* 96:3-9
- O'Neal SE, Guimarães LH, Machado PR *et al.* (2007) Influence of helminth infections on the clinical course of and immune response to *Leishmania braziliensis* cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis* 195:142-8
- Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA *et al.* (2000) American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro state, Brazil: main clinical and epidemiological characteristics. *Int J Dermatol* 39:506-14
- Orteu CH, Poulter LW, Rustin MHA *et al.* (1998) The role of apoptosis in the resolution of T cell-mediated cutaneous inflammation. *J Immunol* 161:1619-29
- Palma GI, Saravia NG (1997) *In situ* characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. *Am J Dermatopathol* 19:585-90
- Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M *et al.* (1990) Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 145:3100-4
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K *et al.* (1993) Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91:1390-5
- Ritter U, Moll H, Laskay T *et al.* (1996) Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis* 173:699-709
- Santamaria Babi LFS, Moser R, Soler MTP *et al.* (1995) Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *J Immunol* 154:1543-50
- Santiago HC, Oliveira MAP, Bambirra EA *et al.* (1999) Coinfection with *Toxoplasma gondii* inhibits antigen-specific Th2 immune responses, tissue inflammation, and parasitism in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *Infect Immun* 67:4939-44
- Sarno EN, Kaplan G, Alvaranga F *et al.* (1984) Effect of treatment on the cellular composition of cutaneous lesions in leprosy patients. *Int J Lepr Other Mycobact Dis* 52:496-500
- Sitia G, Isogawa M, Iannaccone M *et al.* (2004) MMPs are required for recruitment of antigen-nonspecific mononuclear cells into the liver by CTLs. *J Clin Invest* 113:1158-67
- Tan JS, Canaday DH, Boom WH *et al.* (1997) Human alveolar T lymphocyte responses to *Mycobacterium tuberculosis* antigens. *J Immunol* 159:290-7
- Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA (1994) Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Today* 15:160-5
- Titus RG, Lima GC, Engers HD *et al.* (1984) Exacerbation of murine cutaneous leishmaniasis by adoptive transfer of parasite-specific helper T cell populations capable of mediating *Leishmania major* specific delayed-type hypersensitivity. *J Immunol* 133:1594-600
- Unutmaz D, Pileri P, Albrignani S (1994) Antigen-independent activation of naive and memory resting T cells by a cytokine combination. *J Exp Med* 180:1159-64

III.3 – Resultados não publicados

III.3.1 Material e Métodos

III.3.1.1 - Casuística

Foram estudados no período entre outubro de 2005 e janeiro de 2009, um total de 19 pacientes de leishmaniose cutânea, sendo: 11 casos do Estado do Rio de Janeiro, atendidos no Ambulatório de Leishmaniose do IPEC, Fiocruz, RJ, pelo Dr. Manoel Paes de Oliveira-Neto e provenientes do Estado do Rio de Janeiro (RJ). E oito casos provenientes da área endêmica de Corte de Pedra, Tancredo Neves (BA), atendidos no Centro de Saúde de Corte de Pedra pela equipe médica coordenada pelo Dr. Edgar Carvalho, chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgar Santos (UFBA). Em ambas as regiões (RJ ou BA) há a predominância da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Oliveira-Neto, 2000; Guimarães *et al.*, 2005).

O diagnóstico de leishmaniose cutânea foi determinado segundo: (1) História clínica e epidemiológica; (2) Positividade na intradermoreação de Montenegro (IDRM); (3) Detecção de anticorpos específicos para *Leishmania* através de reação de imunofluorescência indireta e/ou ELISA; (4) Detecção e caracterização do parasito (cultura em meio NNN, impressão em lâmina e/ou histopatologia) ou de DNA de *Leishmania* (amplificação por PCR) nos fragmentos de lesões (Pirmez *et al.*, 1999); revisto em Da-Cruz & Pirmez, 2005). As amostras biológicas para o diagnóstico (histopatologia, impressão em lâmina e detecção de DNA de *Leishmania*) foram enviadas para o Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas (IOC). A caracterização da espécie de *Leishmania* isoladas dos fragmentos de tecido foi realizada pelo Laboratório de Pesquisas em Leishmanioses (IOC – FIOCRUZ, RJ) e no Serviço de Imunologia da UFBA.

Os pacientes que concordaram em participar deste estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Após a confirmação do caso de leishmaniose, os pacientes foram tratados como preconiza o Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2007). Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Humanos da FIOCRUZ (protocolo no. 291/05) e do IPEC (protocolo no. 390/07).

A média de idade (média \pm desvio padrão) dos pacientes foi 35 \pm 13 anos. Em relação ao sexo dos pacientes, 13 eram do sexo masculino e quatro eram do sexo feminino.

Os casos estudados foram analisados considerando os seguintes parâmetros:

- Tempo de evolução: lesões recentes - com o tempo de evolução igual ou menor que 30 dias; e lesões tardias - com o tempo superior a 30 dias de evolução.

- Área da lesão: a área da lesão foi calculada segundo a fórmula matemática para calcular área de elipse, sendo esta:

$$\text{Área da lesão} = \frac{D1 \times D2 \times \pi}{4}$$

- Intradermoreação de Montenegro (IDRM): o tamanho da IDRM foi expresso em milímetros no maior diâmetro observado da endureção;

Tabela 2- Dados clínicos dos pacientes analisados quanto ao perfil fenotípico celular do infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea estudados

Pacientes (n°)	Idade (anos)	Sexo	N° lesões	Tempo de evolução (dias)	Área da lesão (cm²)	IDRM (mm)	Proveniência
8	47	M	3	NA	NA	NA	RJ
14	NA	NA	NA	NA	NA	NA	RJ
15	19	F	1	90	3,93	NA	RJ
16	34	M	1	90	2,07	15	RJ
17	71	M	1	30	0,38	45	RJ
18	37	M	1	120	NA	52	RJ
19	52	M	2	60	NA	07	RJ
20	41	M	4	60	2,12	NA	RJ
21	19	F	1	180	NA	10	RJ
22	27	M	3	60	NA	NA	RJ
23	43	M	4	45	NA	10	RJ
BA-1	39	M	1	30	1,43	16	BA
BA-2	23	F	1	30	1,30	21	BA
BA-3	24	M	2	30	1,51	14	BA
BA-4	28	M	2	40	2,09	27	BA
BA-5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	BA
BA-6	49	M	1	20	2,36	30	BA
BA-7	28	F	1	30	1,57	21	BA
BA-8	27	M	1	30	0,33	20	BA

NA – não avaliado; M – masculino; F – feminino; RJ – Rio de Janeiro; BA – Bahia; n° – número do paciente; IDRM – intradermorreação de Montenegro.

III.3.1.2 - Metodologia

– Obtenção de material biológico para ensaios laboratoriais

Para o ato da biópsia, a área foi desinfetada com álcool iodado e a pele anestesiada com cloridrato-de-lidocaína a 2%. Os fragmentos de lesão foram divididos em três partes para os seguintes procedimentos: 1. histopatologia; 2. estudos de imunohistoquímica; 3. isolamento de células mononucleares das lesões (CML) e parasitos.

Foram coletados 40 mL de sangue periférico em tubos de heparina (BD, Franklin Lakes, NJ, EUA) dos pacientes com lesões cutâneas provenientes do Ambulatório de Leishmaniose do IPEC, Fiocruz, RJ, pelo Dr. Manoel Paes de Oliveira-Neto.

– Obtenção das células mononucleares de lesão cutânea

O fragmento foi colocado sobre uma tela de malha de aço inoxidável (trama 80) em placa de Petri contendo 1mL de meio RPMI 1640 (Sigma Chemical Co, St. Louis MO, EUA) completo, isto é, suplementado com 10mM de HEPES (Sigma), 1,5mM de L-glutamina (Sigma), 0,04mM de 2-mercaptoetanol (Merck, RJ, Brasil) e 200UI de penicilina e 200µg de estreptomicina (Sigma). O material foi divulsionado com auxílio de um bastão plástico. A suspensão obtida foi colocada em tubo de poliestireno cônico de 15 mL (TPP Tissue Culture Labware, Suíça) e lavada uma vez por centrifugação a 1800rpm (670xg), durante 10 minutos na temperatura de 4°C (centrífuga modelo IEC CL40R, Thermo Scientific, Alemanha). O sedimento era ressuspensão em seis mililitros de meio RPMI completo e colocado em repouso por cinco minutos a fim de que os resíduos não divulsionados se precipitassem. Esse material não divulsionado era utilizado para isolamento do parasito em meio de cultura NNN. As CML estavam contidas no sobrenadante e eram separadas após centrifugação sob gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma) na proporção de 1:2 de CML. O gradiente era então centrifugado a 1400rpm (420xg) durante 10 minutos a temperatura de 20°C. O anel formado pelas CML foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur. Após, as células serem lavadas uma vez por centrifugação e ressuspensas em um mililitro de meio RPMI completo, o número de células viáveis era determinado por contagem em câmara de Neubauer, sendo que as células marcadas com o corante azul de Trypan (Sigma, EUA) eram excluídas. As CML eram ajustadas para 10⁶/mL para a utilização das mesmas na caracterização fenotípica por citometria de fluxo.

– Obtenção das células mononucleares do sangue periférico

O sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 em meio RPMI 1640 (Sigma, EUA) completo com, isto é, suplementado com 10mM de HEPES (Sigma, EUA), 1,5mM de L-glutamina (Sigma, EUA), 0,04mM de 2-mercaptoetanol (Merck, RJ, Brasil) e 200UI de penicilina e 200µg de estreptomicina (Sigma, EUA). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque 1077, Sigma) na proporção de 1:2, a 2400 rpm (1200xg) por 20 minutos a 20°C (centrífuga modelo IEC CL40R, Thermo Scientific, Alemanha). O anel formado contendo as CMSP foi coletado com auxílio de pipeta Pasteur. As células obtidas foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1800rpm (670xg), durante 10 minutos na temperatura de 4°C. O número de células viáveis era determinado por contagem em câmara de Neubauer, sendo que as células marcadas com o corante azul de Trypan (Sigma, EUA) eram excluídas. As CMSP eram ajustadas para 3×10^6 /mL para a utilização das mesmas na caracterização fenotípica por citometria de fluxo.

– Caracterização fenotípica por citometria de fluxo das células mononucleares de lesões e do sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea

Um equivalente a 10^5 células em 20µl de PBS era colocado em mini-tubo cônico de prolipropileno de 1,2 mL (Scientific Specialties Inc., CA, EUA) e incubado com cinco microlitros dos seguintes anticorpos monoclonais: 1) População e subpopulação linfocitária: anti-CD3, -CD4 e -CD8 (Immunotech, Beckman Coulter, Marseille, França); 2) Ativação celular: anti-CD69 (BD Biosciences, BD Pharmingen, CA, EUA), -CD25 (BD) e -CD38 (Caltag, Invitrogen, CA, EUA); 3) citotoxicidade: anti-CD244 (Ag C1.7) (Beckman Coulter); 4) função e diferenciação celular: anti-CD45RO (Beckman Coulter) e -CCR7 (R&D System Inc., MN, EUA). A tabela 3 mostra a combinação de anticorpos monoclonais utilizada neste estudo.

Após a incubação por 30 minutos a 4°C, as células eram lavadas em PBS por centrifugação (1800rpm, 10 minutos a 4°C), ressuspensas em PBS contendo 1% de paraformaldeído (Sigma) e armazenadas a 4°C até o momento da aquisição em citômetro de fluxo.

Tabela 3 – Combinação de anticorpos monoclonais utilizados na caracterização dos linfócitos de lesões de leishmaniose cutânea.

Painel de anticorpos utilizados para a fenotipagem de linfócitos	
CD3-PC5/ CD4-PE /CD8-FITC	População e subpopulação linfocitária
CD4-PC5/CD8-FITC/CD25-PE CD4-PC5/CD8-PE/CD69-FITC	Ativação celular
CD3-PC5/CD8-FITC/CD244-PE	Citotoxicidade
CD4-PC5/CD45RO-PE/CCR7-FITC CD8-PC5/CD45RO-PE/CCR7-FITC	Função e diferenciação celular

– Aquisição de células mononucleares imunomarcadas e análise fenotípica por citometria de fluxo

As amostras foram adquiridas no citômetro Cyan utilizando o software Summit 4.3 (DakoCytomation, Fort Collins, CO, EUA) da Plataforma de Citometria de Fluxo e Sorting do Instituto Oswaldo Cruz, coordenado pela Dra Andrea Henriques Pons e operado pelo técnico Alessandro Marins. Para cada amostra foram adquiridos no máximo 10.000 eventos dentro da população definida eletronicamente como região de linfócitos (R1). Foram descartadas as amostras que apresentavam na análise final menos de 2.000 eventos. As análises das amostras foram feitas pelo programa Summit 4.3 (Dakocytomation, EUA).

A região de linfócitos (R1) (foco das análises) foi definida em gráfico de tamanho (*forward scatter* - FSC) x granularidade (*side scatter* - SSC) das células totais adquiridas. As análises das amostras foram feitas das seguintes formas:

- O percentual de linfócitos TCD3⁺ foi observado dentro do universo de células presentes na região definida de linfócitos (R1); enquanto que o percentual das subpopulações de linfócitos (TCD4⁺ e TCD8⁺) foi determinado dentro do total de células TCD3⁺;

- O percentual de determinada molécula de superfície (CD25, CD69, CD38, CD244, CD45RO) teve como universo as subpopulações de células TCD4⁺ ou TCD8⁺ observadas dentro da região de linfócitos (R1);

- O percentual das células duplo-marcado para avaliação de memória (CD45RO-CCR7) foi avaliado em gráfico do tipo *dot plot*, sempre tendo como universo as subpopulações de células TCD4⁺ ou TCD8⁺ observadas dentro da região de linfócitos (R1) (vide Figura 4).

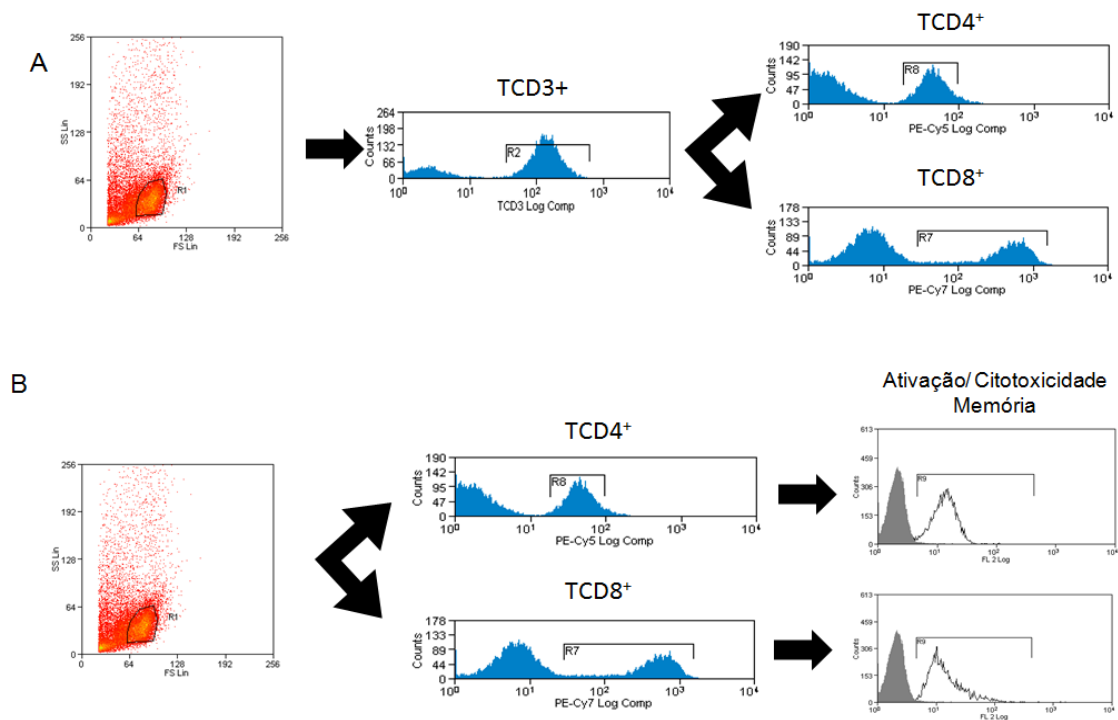


Figura 1. Esquema representativo das análises citofluorimétricas realizadas para as células mononucleares de lesões. Gráfico tipo *dot plot* de tamanho (FSC) x granularidade (SS) onde, a região de linfócitos é marcada eletronicamente como região R1. A partir dessa região R1 são criados histogramas para a análise das células TCD3 (A), TCD4 ou TCD8 (B). A região positiva para essas células T são eletronicamente selecionadas (R2, R8 e R7, respectivamente). (B) A análise final é realizada através de histogramas dentro das subpopulações TCD4⁺ e TCD8⁺.

– Imunohistoquímica para detecção de células TCD4⁺, TCD8⁺ e quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES nas lesões de pacientes de leishmaniose cutânea

Para a avaliação da presença de quimiocinas no infiltrado inflamatório foram estudados 15 casos de lesões cutâneas de LTA provenientes do Estado do Rio de Janeiro e atendidos no IPEC entre os anos de 2003 a 2007 (tabela 4). Os fragmentos de lesões selecionados para esse estudo, fazem parte no banco de fragmentos de pele do Laboratório Interdisciplinar de Pesquisa Médicas (IOC) e encontravam-se embebidos em OCT, (ornithine carbamyl transferase compound; Tissue Tek, Illinois, EUA) e armazenados em nitrogênio líquido (-196°C). Os casos selecionados apresentavam lesão cutânea única, idade entre 18 e 57 anos (36 \pm 11; mediana= 39) e eram moradores do estado do Rio de Janeiro sem história progressiva de viagem a outros estados.

Tabela 4 – Características clínicas dos pacientes estudados quanto ao perfil fenotípico celular e presença de quimiocinas no infiltrado inflamatório das lesões de leishmaniose cutânea por imunohistoquímica

Pacientes (n°)	Idade (anos)	Tempo de evolução (dias)	IDRM (mm)	Área da lesão (cm²)
1	52	30	15	28,2
2	26	20	NA	1,5
3	41	14	22	2,9
4	27	30	10	6,35
5	42	60	21	6,28
6	39	60	25	NA
7	47	60	24	3,3
8	27	60	19	3,9
9	33	60	12	7,2
10	57	33	52	1,0
11	24	120	26	9,4
12	42	120	12	2,8
13	46	120	22	1,0
14	18	120	25	9,5
15	26	120	41	3,5

NA – não avaliado; n° – número; IDRM – intradermorreação de Montenegro

Os blocos contendo o fragmento congelado foram recortados na espessura de 3 - 4µm em criostato (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha), na temperatura de aproximadamente -22°C. Os recortes foram aderidos em lâminas de vidro, silanizadas (DakoCytomation, EUA) e deixadas para secar em temperatura ambiente por duas horas. Após este período, o material foi fixado com solução de formol tamponado Millonig 36%, metanol P.A. (Merck) e acetona P.A. (Merck) (2:19:19) durante dois minutos para as marcações de quimiocinas; e apenas por acetona P.A. (Merck) por 10

minutos para a imunofenotipagem das células T. As demais etapas foram: hidratação e bloqueio de ligações inespecíficas com água oxigenada (VETEC, Duque de Caxias, RJ, Brasil) e albumina de soro bovino 2% (Sigma, EUA) e incubação com os seguintes anticorpos monoclonais para a detecção das células TCD4 (1:150) e TCD8 (1:100) (Dako Cytomation, EUA); e para as quimiocinas CCL2/MCP-1 (1:30) (Santa Cruz Biotechnology, CA, EUA), CCL3/MIP-1 α (1:30) e CCL5/RANTES (1:30) (R&D Systems, EUA). Os anticorpos secundários utilizados foram: anti-cabra (1:100; Dako, A/S, Dinamarca) e anti-camundongo (1:100; Amershan Biosciences, Reino Unido). Para o controle negativo, omitimos o anticorpo primário da reação. As reações bioquímicas são desencadeadas com a adição da água oxigenada (H₂O₂) a 3% (Vetec, Brasil) e reveladas com 3-amino-9-etil-carbazol (AEC, Sigma, EUA), que produz um precipitado insolúvel que confere cor vermelha nas áreas marcadas. Finalmente, as lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Meyer (Merck) e montadas com meio gelatina/glicerina e lamínula.

– Quantificação de células imunomarcadas e análise das imagens obtidas dos cortes histológicos estudados por imunohistoquímica

Os fenótipos celulares presentes no infiltrado inflamatório através de marcação pela imunohistoquímica foram avaliados por microscopia óptica e analisados por dois observadores independentes. O resultado expresso por uma percentagem média e um cálculo de desvio padrão. Foi considerado o método mais utilizado pela literatura, de contagem de 500 células totais em pelo menos cinco campos aleatórios com aumento de 1000X. Após esta quantificação, os dados foram calculados para obtenção da percentual de células positivas, de acordo com a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de células positivas} = \frac{\text{número de células positivas}}{\text{número de células totais}}$$

Para a análise das quimiocinas, utilizamos uma metodologia que avalia a intensidade de coloração em determinada área, através do uso do programa computacional de análise de imagens Image Pro (ImagePro Plus 4.5.1.29, Media Cybernetics, Maryland, EUA). A utilização deste programa para a análise dos níveis de expressão das quimiocinas possibilita resultados mais precisos, pois permite detectar mínimas quantidades da molécula alvo no infiltrado inflamatório. Assim, todas as lâminas foram fotografadas em cinco campos representativos. As imagens foram

capturadas em câmera digital Cool Snap-Pro Color (Media Cybernetics, EUA) acoplada ao microscópio Nikon, Eclipse E600 (Nikon Corporation, Tóquio, Japão), no aumento de 1000x. Para o cálculo do percentual de área marcada de cada indivíduo estudado, foram avaliadas as cinco imagens fotografadas, obtendo-se assim cinco valores de intensidade da área marcada e cinco valores de área total do campo. Esses valores obtidos foram colocados na fórmula abaixo para determinação do percentual de área marcada:

$$\% \text{ de área marcada positivamente} = \frac{\text{média área marcada} \times 100}{\text{média da área total do campo}}$$

– Análise estatística

Para as comparações entre grupos realizamos o teste não-paramétrico Mann-Whitney e para as análises de correlação utilizamos o teste de Correlação de Spearman. Todas as análises estatísticas, assim como gráficos, foram realizadas no programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Instat, CA, EUA). Foram considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

III.3.2 – Resultados

III.3.2.1 - Caracterização fenotípica das células mononucleares de lesão na leishmaniose cutânea

Os resultados das análises fenotípicas das células mononucleares do infiltrado inflamatório de 19 lesões de leishmaniose cutânea (Tabela 2) por citometria de fluxo estão representados por: média±desvio padrão%; mediana%.

As células TCD3⁺ presentes na região de linfócitos (R1) compreendeu 54,4%±18,8% (mediana= 49,5%) do total de células presentes nesta região. Destes, os linfócitos TCD4⁺CD3⁺ eram 48,0%± 14,6% (mediana= 43,4%) das células, enquanto que 39,8%±12,1% (mediana= 39,6%) eram linfócitos TCD8⁺CD3⁺ (Fig 2A e B). Observa-se uma grande dispersão no percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ presentes nas lesões. Essa dispersão observada no percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ ocorre independente da técnica utilizada. Utilizando-se outro grupo de pacientes foi verificado que esta dispersão no percentual das subpopulações de linfócitos T também ocorre nas análises por imunohistoquímica (Figura 2). Entretanto o percentual de células detectado é mais baixo por imunohistoquímica (TCD4⁺: 29,6%±8,7%; 32%; TCD8⁺: 27,3%±10,0%; 28,2%) do que por citometria de fluxo. Essa heterogeneidade também influencia na razão TCD4⁺/TCD8⁺ destes pacientes (1,36±0,73; 1,1).

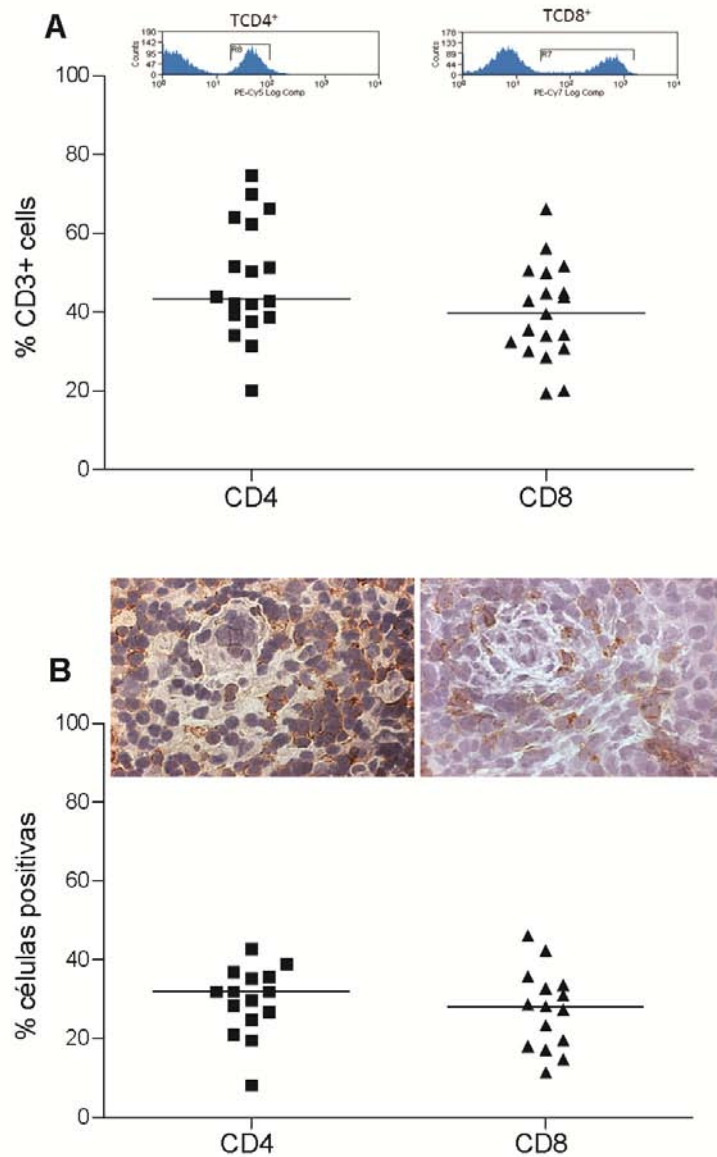


Figura 2. Análise do percentual de células T e suas subpopulações no infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea. (A) Percentual das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ por citometria de fluxo. Nos detalhes, histogramas representativos da análise citofluorimétrica. (B) Percentual das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ por imunohistoquímica. Nos detalhes fotos representativas da marcação de imunohistoquímica. Cada indivíduo é representado por um ponto no gráfico e a barra horizontal representa a mediana dos valores.

Em relação às células duplo-negativas (DN), o estudo se limitou a apenas avaliar a presença deste tipo celular no infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose por citometria de fluxo. A análise citofluorimétrica realizada para avaliar as células DN está representada na figura 3.

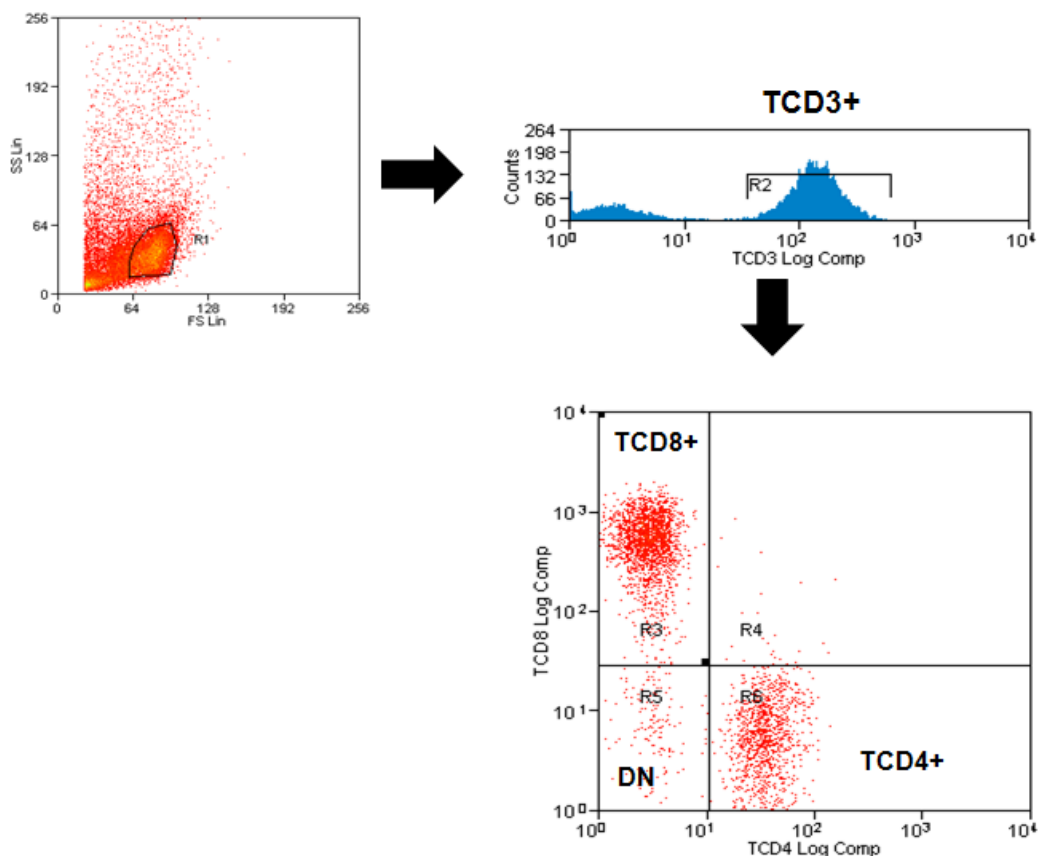


Figura 3. Análise citofluorimétrica para detecção do percentual de células duplo negativas (DN) de lesões de leishmaniose cutânea. R1 – população de linfócitos definida por tamanho (FSC) x granularidade (SSC). Definição da populações de linfócitos TCD3⁺ (R2). Gráfico *dotplot* onde a abcissa é o TCD8⁺, a ordenada é o TCD4⁺, e os quadrantes R3, R6 e R5 correspondem às células TCD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) e TCD8⁺ (CD3⁺CD8⁺), e DN (CD4⁺CD8⁻), respectivamente.

As células DN representaram 7,8% das células TCD3⁺ (7,6%±3,1%). Não foi encontrada correlação entre percentual de células DN com nenhum dos parâmetros clínicos avaliados (tempo de evolução, área de lesão ou IDR) ou mesmo com o percentual de outras células presentes no infiltrado.

Para avaliação do grau de diferenciação das células de lesão foram estudados quatro casos e utilizou-se a análise percentual da molécula associada à memória da resposta imune CD45RO. Uma predominância de células TCD4⁺ contendo CD45RO

(83,8%±15,5%; 88,9%) foi observada em relação à presença de CD45RO pelas células TCD8⁺ (52,0%± 18,3%; 53,6%; p<0,01) (Figura 4).

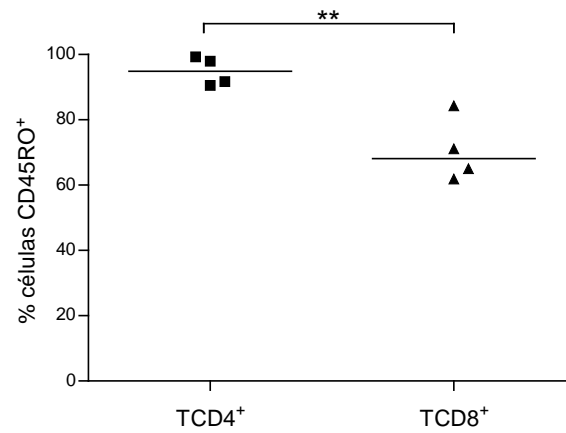


Figura 4. Avaliação da população de células consideradas de memória através da presença da molécula CD45RO em linfócitos TCD4⁺ (■) e TCD8⁺ (▲) nas lesões de leishmaniose cutânea. Cada indivíduo é representado por um ponto no gráfico e a barra horizontal representa a mediana dos valores. **p<0,01.

Os fenótipos de diferenciação celular dos linfócitos dentro das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ foram estudados utilizando as moléculas CD45RO e CCR7, como mostra o esquema de análise citofluorimétrica apresentado na Figura 5.

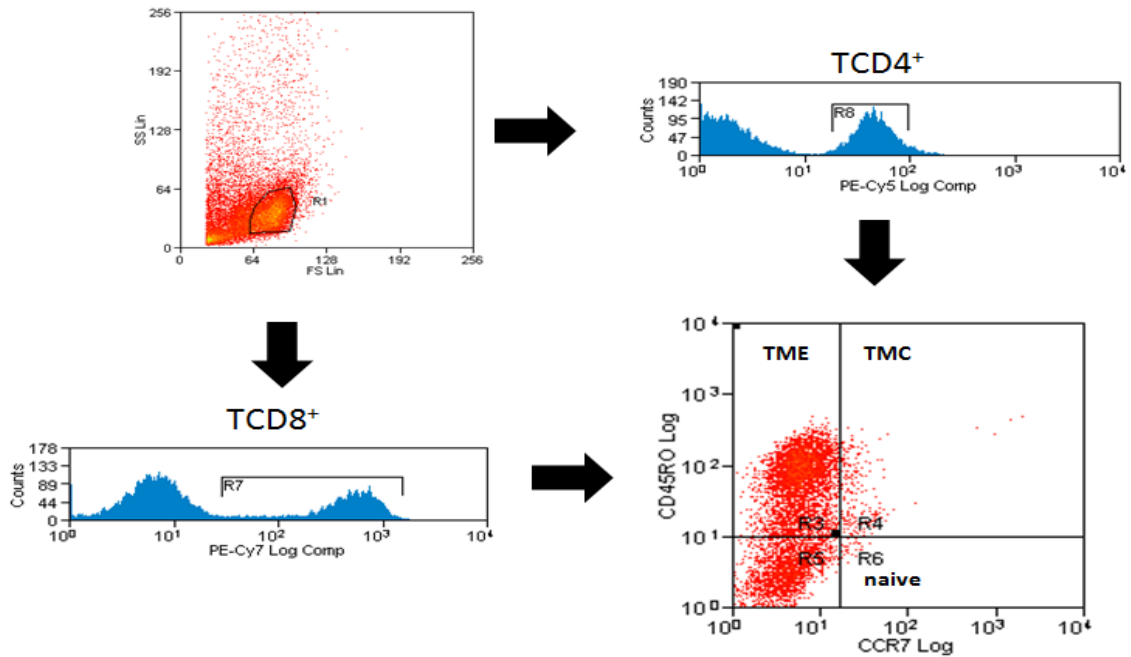


Figura 5. Análise citofluorimétrica das moléculas associadas à diferenciação celular CD45RO e CCR7 em células de lesões de leishmaniose cutânea. R1 – população de linfócitos definida por tamanho (*FSC*) e granularidade (*SSC*) nas células do infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea. Definição das subpopulações de linfócitos TCD4⁺ (R8) e TCD8⁺ (R7). Gráfico *dotplot* onde a abcissa é o CD45RO⁺, a ordenada é o CCR7⁺, e os quadrantes R3, R4 e R6 correspondem às células T de memória efetora T_{EM} (CD45RO⁺CCR7⁺), células T de memória central T_{CM} (CD45RO⁺CCR7⁺) e *naive* (CD45RO⁻CCR7⁺), respectivamente.

Deste modo, a análise das células de lesões de pacientes com LC mostrou que há predomínio de células T_{ME} (CD45RO⁺CCR7⁺) em TCD4⁺ (87,2%±7,1%; 90,2%; p<0,05; Figura 6A) e em TCD8⁺ (67,9%±21,3%; 68,5%; p<0,05; Figura 6B) frente às populações de células T_{MC} (CD45RO⁺CCR7⁺) e células “naive” (CD45RO⁻CCR7⁺). Um maior percentual de células T_{MC} TCD4⁺ (7,9%±3,3%; 7,3%) é observado em comparação com as células “naive” TCD4⁺ (1,3%±1,3%; 1,1%; p<0,05). Já as células TCD8⁺ T_{MC} (3,5%±1,2%; 3,4%) têm percentual semelhante ao percentual de células TCD8⁺ “naive” (2,0%±2,6%; 1,2%). Entre as células TCD4⁺ há um predomínio de células T_{ME} (p<0,05) e T_{MC} (p>0,05), mas não de células “naive” em relação as células TCD8⁺. A análise realizada no sangue periférico dos mesmos pacientes mostrou não haver diferenças entre o percentual de células T_{MC}, T_{ME} e naive tanto de células TCD4⁺ (T_{MC}: 27,1%±12,9%; 29,9%; T_{ME}: 37,3%±25,8%; 29,5%; naive: 21,3%±16,1%; 29,5%) quanto de células TCD8⁺ (T_{MC}: 7,2%±1,2%; 7,5%, T_{ME}: 15,6%±3,3%; 17,3; naive: 17,9%±8,7%; 13,4%). Entretanto, ao comparar o percentual de células T_{MC}, T_{ME} e naive entre sangue e lesão, o que pode ser observado é uma aumento significativo

de células TME e uma redução significativa de células TMC e naive nas lesões ($p < 0,05$). Esse fenômeno é observado tanto para $CD4^+$ quanto para $CD8^+$.

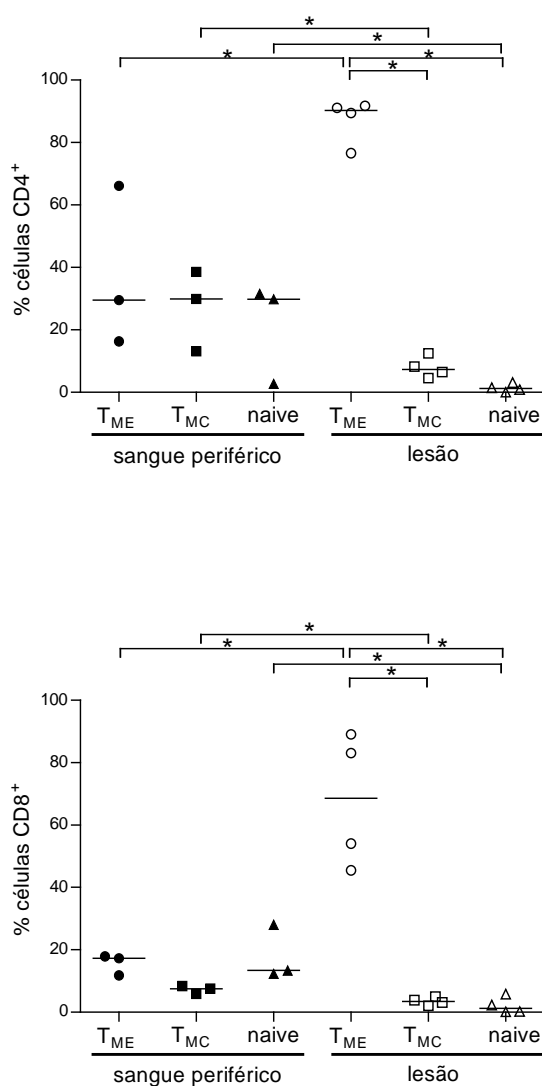


Figura 6. Avaliação do perfil de diferenciação celular das células $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B) por dupla avaliação das moléculas CD45RO e CCR7, distinguindo três subpopulações: células T de memória efetora (T_{EM} - $CD45RO^+CCR7^-$), células T de memória central (T_{CM} - $CD45RO^+CCR7^+$) e *naive* ($CD45RO^-CCR7^+$), nas células do infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea no sangue e nas lesões de pacientes com leishmaniose. Cada indivíduo é representado por um ponto no gráfico e a barra horizontal representa a mediana dos valores.

Considerando que a maioria das células presentes no infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose cutânea são células efetoras de memória, passou-se a avaliar

se essas células estavam ativadas e se continham molécula associada à citotoxicidade. A ativação linfocitária foi analisada pela presença das moléculas CD25 e CD69 que são expressas em diferentes fases da ativação linfocitária, sendo a molécula CD69 expressa precocemente e a molécula CD25 em fase mais tardia da diferenciação. A análise do percentual das células ativadas mostrou que cerca da metade das células TCD4⁺ (CD69: 52,1%±23,1%; 53,3%; CD25: 51,3%±25,2%; 45,1%) e das células TCD8⁺ (CD69: 57,1%±30,4%; 46,3%; CD25: 46,6%±32,8%; 41,5%) exibiam as moléculas CD25 ou CD69. Entretanto, houve uma grande dispersão do percentual de células tanto TCD4⁺ quanto TCD8⁺, expressando as moléculas de ativação (Figura 7).

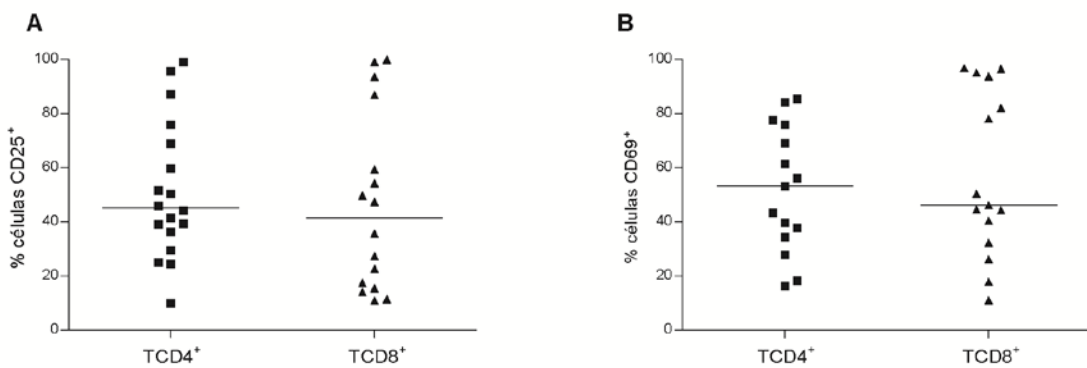


Figura 7. Percentual de linfócitos TCD4⁺ (■) e TCD8⁺ (▲) ativados, expressando as moléculas CD25 (A) e CD69 (B) em células de lesão de pacientes com leishmaniose cutânea. Cada indivíduo é representado por um ponto no gráfico e a barra horizontal representa a mediana dos valores.

Na figura 8, observou-se que a maioria das células TCD8⁺ apresentou moléculas associadas à ativação (CD38 - 77,9%±13,2%; 79,8%) e à citotoxicidade (CD244 - 81,2%±15%; 82,4%).

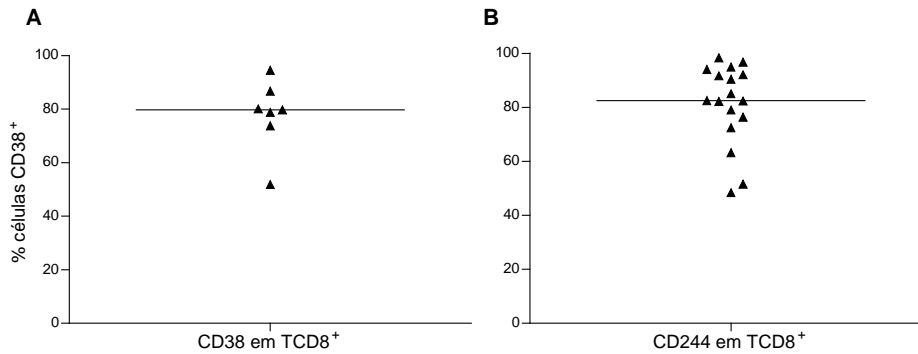


Figura 8. Percentual de células TCD8⁺ de lesões de pacientes de leishmaniose cutânea exibindo moléculas de ativação CD38 (A) e citotoxicidade CD244 (B). Cada ponto representa um indivíduo estudado. A barra horizontal representa a mediana dos valores.

III.3.2.2 - Correlação entre parâmetros clínicos e as análises imunológicas das células do infiltrado inflamatório das lesões de leishmaniose cutânea.

Para entender melhor a patogênese das lesões foram feitas as correlações entre os parâmetros clínicos e as análises imunológicas observadas nas lesões de leishmaniose cutânea. Assim, utilizamos como parâmetros os seguintes dados: IDRMs, tempo de evolução e área da lesão. O diâmetro da IDRMs não teve nenhuma correlação com as análises citofluorimétricas estudadas.

- Correlação entre o tempo de evolução das lesões e achados imunológicos das CML

O tempo de evolução das lesões influencia diretamente no percentual de células TCD4⁺ ativadas exibindo a molécula CD69 ($r=0,62$; $p<0,05$), mas não nas células TCD8⁺CD69⁺ presentes no infiltrado inflamatório. O percentual de células TCD3⁺ citotóxicas CD244⁺ ($r=0,53$; $p<0,05$) está positivamente correlacionado com o tempo de evolução, mas o mesmo não acontece para as células TCD3⁺CD8⁺ exibindo a molécula CD244.

- Correlação entre a área da lesão e os achados imunológicos das CML

A extensão da lesão de leishmaniose, medida através da área de lesão foi positivamente correlacionada com o percentual de células TCD3⁺ ($r=0,68$; $p<0,05$) e o percentual de células TCD8⁺ citotóxicas (CD244⁺) ($r=0,52$; $p<0,05$) presentes no infiltrado inflamatório.

III.3.2.3 - Caracterização fenotípica das CML em grupos de pacientes divididos segundo áreas endêmicas distintas (RJ x BA)

Os 19 pacientes de leishmaniose cutânea avaliados anteriormente foram divididos em dois grupos segundo área endêmica, sendo oito pacientes de área endêmica de Corte de Pedra (BA) e 11 pacientes provenientes do Estado do Rio de Janeiro. A divisão também coincidiu com o agrupamento dos pacientes segundo tempo de evolução, onde os pacientes de área endêmica de Corte de Pedra (BA) foram incluídos no grupo de lesões recentes e os pacientes do Estado do Rio de Janeiro (RJ) estavam alocados no grupo de lesões tardias (Tabela 5). Entretanto, entre os pacientes RJ existe um indivíduo que tinha tempo de evolução igual a 30 dias.

Tabela 5. Características clínicas dos pacientes provenientes do Rio de Janeiro e da Bahia.

Parâmetros clínicos	Procedência dos Pacientes	
	Rio de Janeiro	Bahia
Idade (anos)	39±16 (19-71 anos)	31±9 (23-49 anos)
Nº de lesões	2 (1-4)	1 (1-2)
Tempo de evolução (dias)	81±46 (30-180 dias)	30±6 ** (20-40 dias)
Área da lesão	2,12±1,0 (0,38-3,93cm ²)	1,51±0,65 (0,33-2,36 cm ²)
IDRM (mm)	23±20 (7-52 mm)	21±6 (14-30 mm)

Dados representados por média±desvio padrão (mínimo – máximo). **p<0,01

A análise das CML de pacientes dos grupos RJ e BA mostrou que o percentual de células TCD3⁺ nos pacientes RJ (TCD3⁺: 59,5%±16,6%; 54,0%) era mais elevado do que nos pacientes BA (TCD3⁺: 47,4%±20,4%; 46,4%) embora a diferença não fosse significativa (Figura 9A). Por outro lado, o percentual de células TCD4⁺ foi significativamente maior nos pacientes BA (55,6%±11,1%; 51,7%) quando comparados com pacientes RJ (43,1%±14,9%; 39,4%; p<0,05) (Figura 9B). Já o

percentual das células TCD8+ não mostrou diferenças entre os dois grupos de pacientes (BA - TCD8+: 39,0%±10,7%; 41,8% e RJ - TCD8+: 40,3%±13,5%; 35,5%) (Figura 9B). As lesões dos pacientes da BA apresentaram maior percentual de células TCD4+ que TCD8+ ($p < 0,05$) (Figura 9B). As diferenças entre os percentuais de TCD4+ e TCD8+ nos grupos de pacientes estudados influenciou a razão CD4/CD8, que tendeu a ser maior nos pacientes BA ($1,7 \pm 0,9$; 1,2/ RJ: $1,1 \pm 0,5$; 1,1; $p = 0,09$) (Figura 9c).

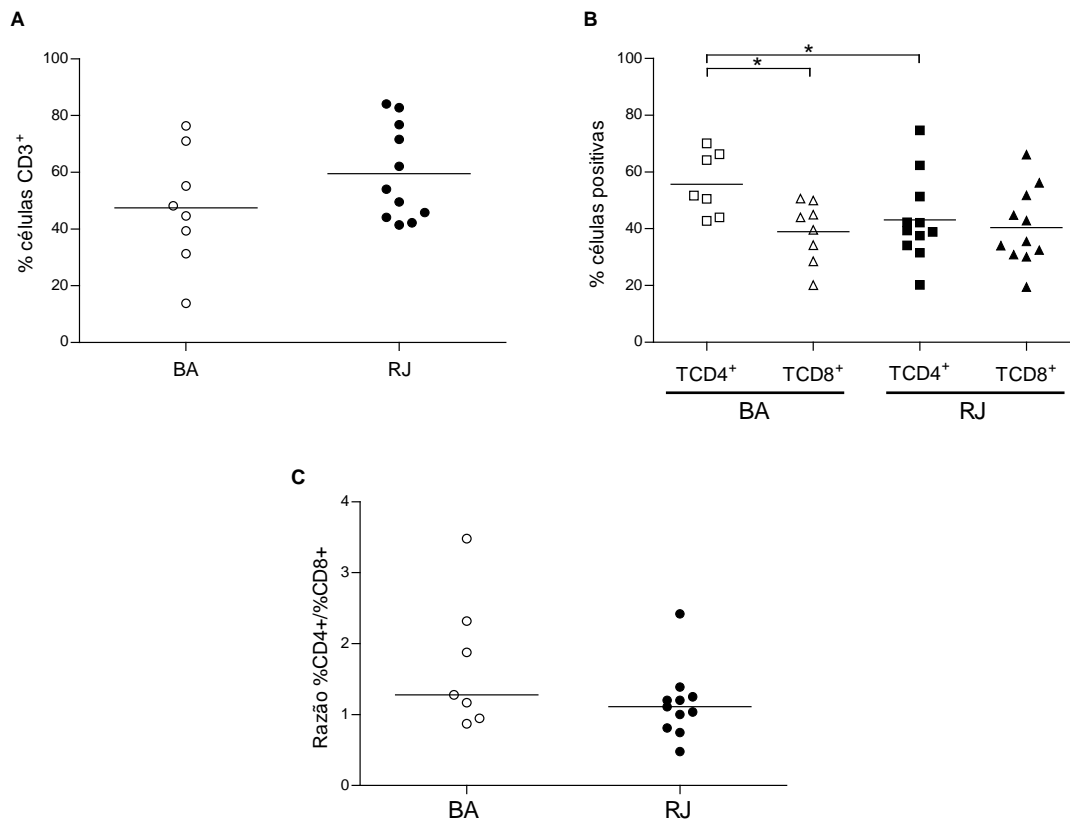


Figura 9. Análise imunofenotípica de linfócitos da lesão de leishmaniose cutânea de pacientes provenientes de duas regiões endêmicas distintas. Percentual de células TCD3+ avaliado em células mononucleares de lesões de pacientes da Bahia (branco) e do Rio de Janeiro (preto) (A); Percentual de células TCD4+ (■) e TCD8+ (▲) em CML de pacientes da BA e do RJ (B); Razão %TCD4/%TCD8 (◆) entre os pacientes da BA e RJ. Cada indivíduo é representado por um ponto no gráfico e a barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$.

O estado de ativação dos linfócitos do infiltrado inflamatório de lesões cutâneas na leishmaniose foi avaliado pelo percentual de células positivas para CD25 e CD69.

Observa-se uma grande dispersão dos percentuais de células positivas para a molécula CD25 e CD69 em ambas as subpopulações tanto nos pacientes BA (TCD4⁺CD25⁺: 61,4%±32,7%; 68,9%; TCD8⁺CD25⁺: 57,6%±40,1%; 47,4%; TCD4⁺CD69⁺: 32,7%±16,4%; 31,2%; TCD8⁺CD69⁺ 63,8%±36,7%; 69,1%) quanto nos pacientes do RJ (TCD4⁺CD25⁺:45,0%±18,0%; 41,5%; TCD4⁺CD69⁺: 65,1%±17,3%; 69,1% e TCD8⁺CD25⁺:41,6±29,7%; 35,7%; TCD8⁺CD25⁺: 52,6%±26,8%; 46,3%) (Figura 10A e B). Uma análise mais refinada desses resultados mostra que os pacientes BA, com lesões recentes, têm maior percentual de células TCD4⁺CD25⁺ do que células TCD4⁺CD69⁺, enquanto que nos pacientes RJ esse perfil é o oposto, com maior percentual de células TCD4⁺CD69⁺ do que células TCD4⁺CD25⁺ (Figura 10C). Além do fato de existirem mais células TCD4⁺CD69⁺ nas lesões RJ do que nas lesões BA. Entretanto esse cenário só é observado para TCD4. As células TCD8 apresentam grande dispersão nos resultados tanto de CD25 quanto de CD69 (Figura 10D).

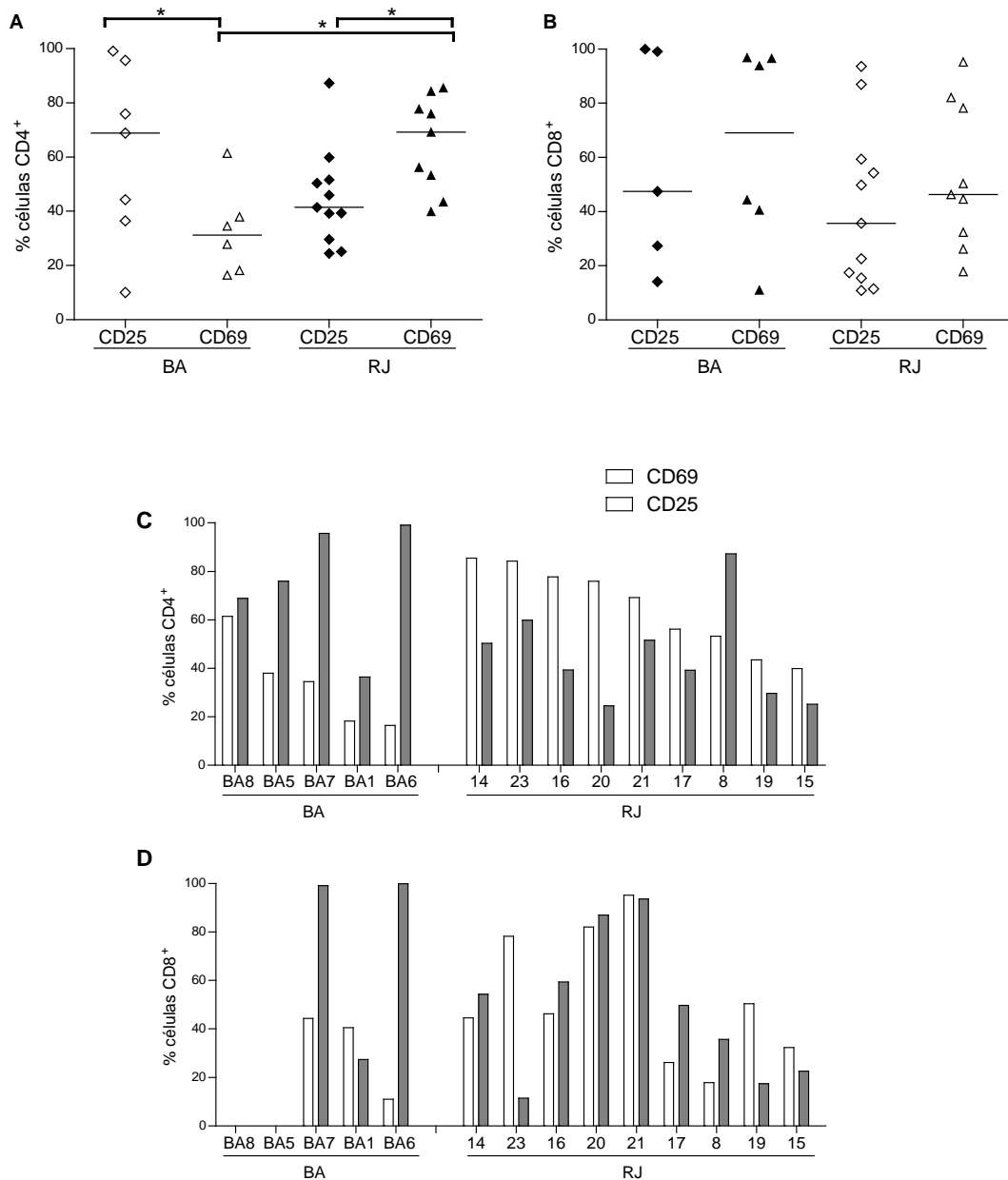


Figura 10. Percentual de células T expressando as moléculas de ativação CD25 e CD69 em linfócitos de lesão de leishmaniose cutânea de pacientes provenientes de duas regiões endêmicas distintas. (A) Percentual de células TCD4⁺ expressando as moléculas CD25 e CD69 nos células de lesões de pacientes BA e RJ, e (B) Percentual de células TCD8⁺ expressando as moléculas CD25 e CD69 nos células de lesões de pacientes BA e RJ. Cada ponto representa um indivíduo estudado. A barra horizontal representa a mediana dos valores. Avaliação do percentual de células ativadas no pacientes BA e RJ. (C) Gráfico de barras, onde cada barra representa o percentual de células TCD4⁺CD69⁺ (barra branca) e TCD4⁺CD25⁺ (barras cinza) de cada indivíduo avaliado. (D) Gráfico de barras, onde cada barra representa o

percentual de células TCD8⁺CD69⁺ (barra branca) e TCD8⁺CD25⁺ (barras cinza) de cada indivíduo avaliado. *p<0,05.

Foi observado um maior percentual de células TCD3⁺ exibindo moléculas relacionadas à função citotóxica, a molécula CD244, nos pacientes provenientes do RJ (57,3%±17,0%; 49,0%) quando comparados com pacientes BA (38,4%±13,8%; 30,7%; p<0,05), mas o mesmo não acontece com as células TCD8⁺, onde não se observa diferenças no percentual da molécula CD244 entre os grupos (RJ: 84,0±11,1%; 82,3%; BA: 76,0%±20,5%; 86,4%) (Figura 11).

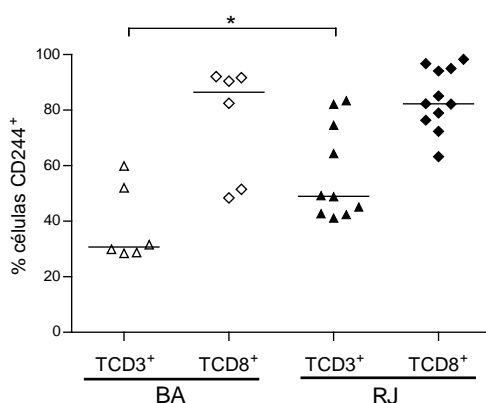


Figura 11. Percentual de células TCD3⁺ e TCD3⁺CD8⁺ expressando a molécula associada à citotoxicidade CD244 em linfócitos de lesão de leishmaniose cutânea de pacientes provenientes de duas regiões endêmicas distintas. Cada ponto representa um indivíduo estudado. A barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05.

III.3.2.4 – Influência da proporção entre TCD4⁺/TCD8⁺ observada no infiltrado inflamatório das lesões das lesões de leishmaniose cutânea na ativação e na função efetora dos linfócitos

A avaliação do percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ das CML dos 19 pacientes de leishmaniose cutânea estudados revelou que existem três perfis de pacientes através da análise da razão %TCD4⁺/%TCD8⁺, são eles: grupo I - %CD4 maior que %CD8 (0,7±0,1; 0,8; n=5 casos); grupo II - %CD4 igual ao %CD8 (1,1±0,1; 1,1; n=8 casos); e grupo III - %CD4 menor que %CD8 (2,2±0,7; 2,3; n=5 casos) (Figura 12A). A média da razão foi estatisticamente significativa entre os grupos (p<0,01).

O grupo III apresenta tempo de evolução mais reduzido (37 ± 15 dias; 30 dias) quando comparado com o grupo II (65 ± 32 dias; 60 dias; $p < 0,05$). Entretanto, por falta de dados de tempo de evolução no grupo I, não foi possível compará-lo com os outros grupos.

Além de diferenças na razão $TCD4^+ / TCD8^+$, foram observadas diferenças no percentual de linfócitos $TCD3^+$ presentes no infiltrado inflamatório entre os grupos grupo III ($52,2\% \pm 7,7\%$; 49,5%) e o grupo I ($73,1\% \pm 8,7\%$; 73,7%; $p < 0,05$); e o grupo I e o grupo II ($51,9\% \pm 14,4\%$; 45,2; $p < 0,05$), mas não entre o grupo II e o grupo III (Figura 12B).

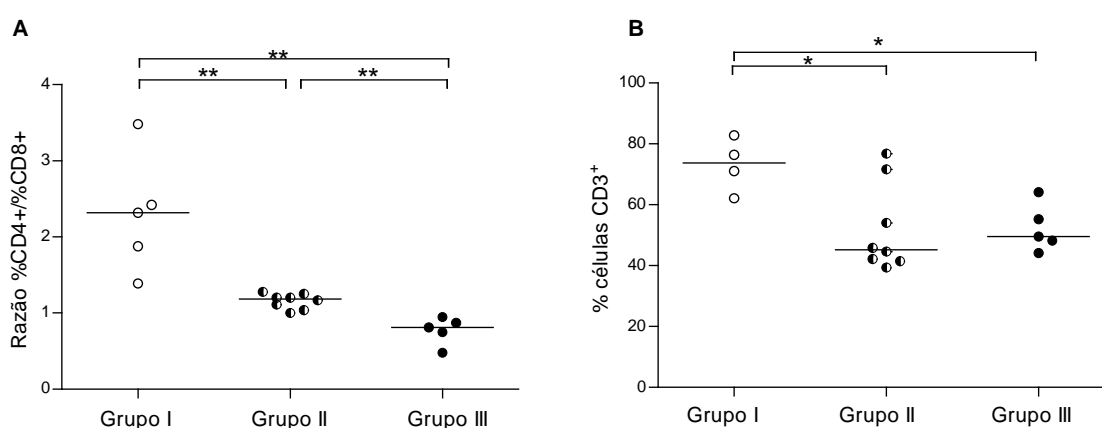


Figura 12. Análise da relação entre as subpopulações de linfócitos T (razão $TCD4/TCD8$) nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, onde o grupo I consiste nos pacientes com $\%TCD4^+$ maior que o $\%TCD8^+$; o grupo II são pacientes com o $\%TCD4^+$ igual ao $\%TCD8^+$; e o grupo III, pacientes com o $\%TCD4^+$ menor que o $\%TCD8^+$. (A) Razão $TCD4/TCD8$ dos grupos estudados; (B) Percentual de células $TCD3^+$ nos grupos de pacientes agrupados segundo a razão $TCD4/TCD8$. Cada ponto representa um indivíduo estudado. A barra horizontal representa a mediana dos valores. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

O percentual das células $TCD4^+$ e $TCD8^+$ exibindo a molécula CD25 foi significativamente menor no grupo II ($TCD4^+$: $33,4\% \pm 11,5\%$; 37,8; $TCD8^+$: $31,3 \pm 18,3$; 24,9%, $p < 0,01$) quando comparado com os outros grupos (grupo I: $TCD4^+$: $80,9\% \pm 19,4\%$; 82,2%; $TCD8^+$: $95,3\% \pm 7,3\%$; 99,1%; grupo III: $TCD4^+$: $62,9\% \pm 17,1\%$; 56,9%; $TCD8^+$: $62,7\% \pm 24,3\%$; 60,7%) (Figura 13A e 13B). O que se observou foi um

perfil de ativação das células TCD4⁺ mais baixo no grupo II quando comparado aos grupos I e II (p<0,05) (Figura 13A e B).

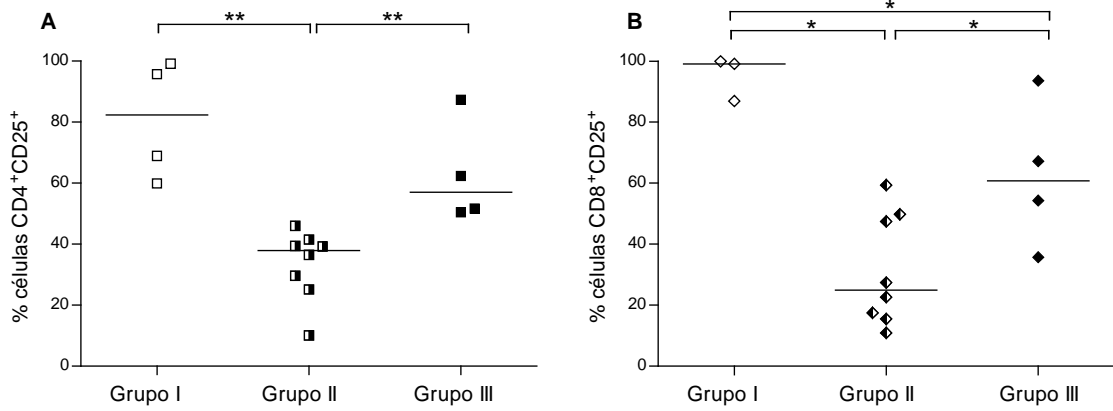


Figura 13. Percentual de células TCD4 e TCD8 ativadas obtidas de pacientes de leishmaniose cutânea nos grupos de pacientes estratificados segundo a razão TCD4/TCD8. (A) Percentual de células TCD4⁺CD25⁺ nos grupos de pacientes estudados; (B) Percentual de células TCD8⁺CD25⁺ nos grupos de pacientes estudados. Grupo I: %TCD4⁺ maior que o %TCD8⁺, Grupo II: %TCD4⁺ igual ao %TCD8⁺, Grupo III: %TCD4⁺ menor que o %TCD8⁺. Cada ponto representa um indivíduo estudado. A barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05; **p<0,01.

O percentual de células TCD8⁺TCD244⁺ foi significativamente mais elevado no grupo I (92,0%±1,8; 91,6%) em relação ao grupo II (75,5%±13,9%; 80,5%), mas estes grupos foram similares ao grupo III (80,7±21,8; 86,5%) (Figura 14).

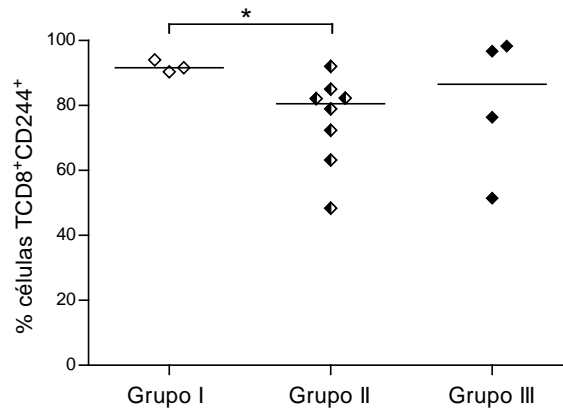


Figura 14. Percentual de células TCD8⁺CD244⁺ (citotóxicas) obtidas de pacientes de leishmaniose cutânea nos grupos de pacientes estratificados segundo a razão TCD4/TCD8. Grupo I: %TCD4⁺ maior que o %TCD8⁺, Grupo II: %TCD4⁺ igual ao %TCD8⁺, Grupo III: %TCD4⁺ menor que o %TCD8⁺. Cada ponto representa um indivíduo estudado. A barra horizontal representa a mediana dos valores. *p<0,05.

III.3.2.5 – Presença das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α e CCL5/RANTES em lesões cutâneas de leishmaniose causada pela *Leishmania (Viannia) braziliensis*

A análise da presença das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α e CCL5/RANTES em lesões cutâneas de LTA foi avaliada por imunohistoquímica. As quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α e CCL5/RANTES estão presentes em lesões de leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis*. A presença de CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES foi detectada em 10 de 15 casos estudados (66,6%). Em oito destes casos (53,3%) houve co-expressão destas quimiocinas e em dois casos houve expressão apenas de CCL3/MIP-1α (13,3%). Em quatro casos não houve expressão das quimiocinas estudadas (26,6%). O CCL2/MCP-1 foi observado em todos os casos avaliados (n=5). Esta quimiocina estava presente na derme, no interior de células e na matriz extracelular (Figura 15). Já o CCL3/MIP-1α foi observado em células mononucleares isoladas na derme, permeando o infiltrado inflamatório (Figura 16). As células marcadas para de CCL3/MIP-1α eram semelhantes a células dendríticas ou macrófagos. Por outro lado, o CCL5/RANTES foi detectado em focos na derme profunda e na matriz extracelular (Figura 17). Não foi encontrada marcação para CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1α ou RANTES na epiderme dos casos onde esta região estava preservada.

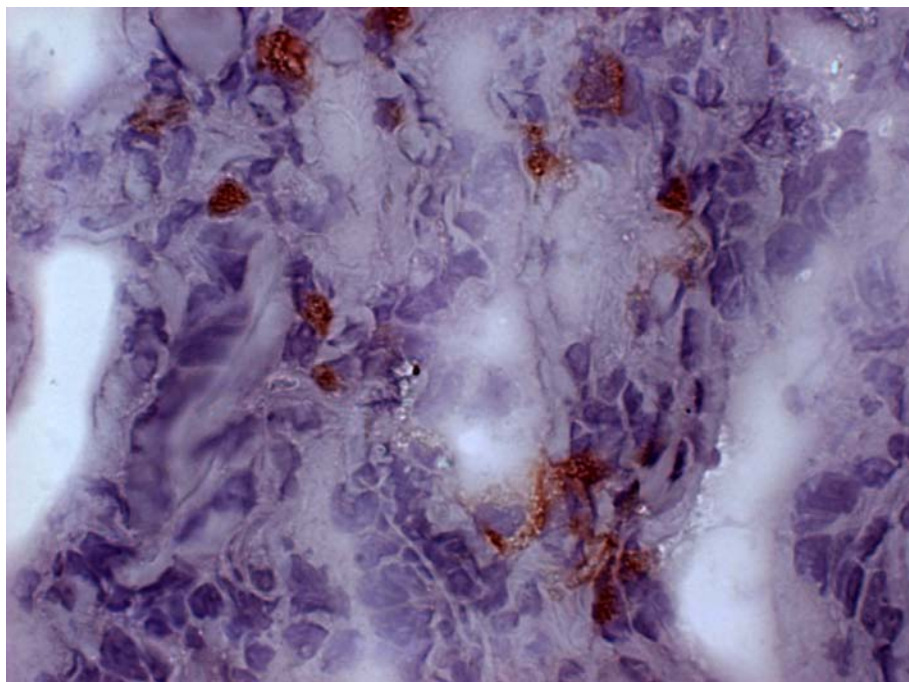


Figura 15. Foto representativa da marcação por imunohistoquímica para CCL2/MCP-1 em lesões cutâneas de leishmaniose. As células marcadas positivamente estão coradas de marrom-acastanhado. Aumento 1000x

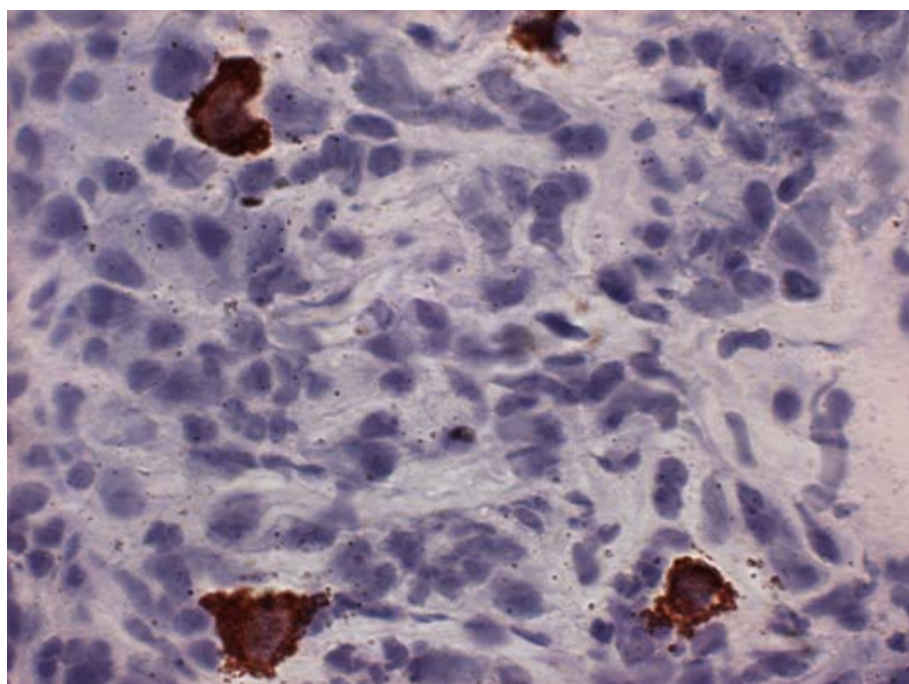


Figura 16. Foto representativa da imunomarcção para CCL3/MIP-1 α em lesões cutâneas de leishmaniose. As células marcadas estão coradas de marrom-acastanhado. As Células positivas para CCL3 estão dispostas isoladamente no infiltrado dérmico. Aumento 1000x

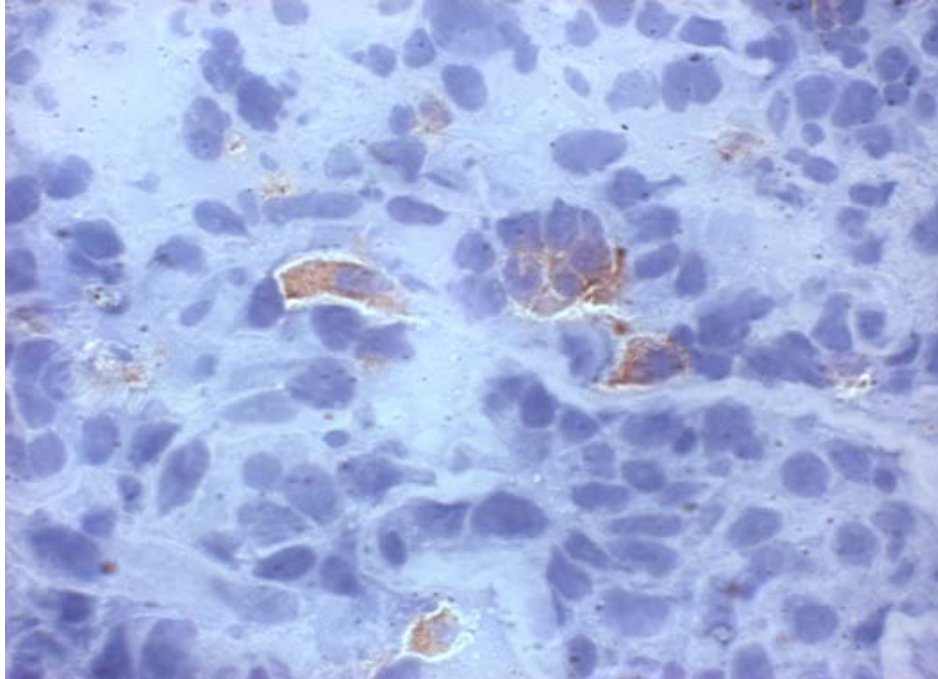


Figura 17. Foto representativa da imunomarcação para CCL5/RANTES em lesões cutâneas de leishmaniose. As células marcadas positivamente estão coradas de marrom-acastanhado. A marcação de CCL5/RANTES está presente dentro de células e isoladas ou agrupadas no infiltrado inflamatório. Aumento 1000x

Foi observada uma correlação positiva entre a intensidade de coloração de CCL3/MIP-1 α e de CCL5/RANTES ($r=0,77$; $p<0,001$). A fim de avaliar a possível participação das quimiocinas na atração de linfócitos, foi correlacionada a expressão destas com o percentual de células T presente no infiltrado. Foi observada uma correlação positiva entre a intensidade de marcação de CCL2/MIP-1 α e o percentual de células TCD4 $^+$ ($r=0,52$; $p<0,05$) presente no infiltrado, mas o mesmo não foi observado para as células TCD8 $^+$. Também não foi observada nenhuma correlação entre CCL5/RANTES e o percentual de TCD4 $^+$ ou TCD8 $^+$. Não foram observadas correlações entre a presença das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e parâmetros clínicos como IDRM, tempo de evolução ou área da lesão.

IV. Discussão

Estudos realizados no sangue periférico foram muito importantes para a compreensão da imunopatogenia da leishmaniose (Castés *et al.*, 1983; Carvalho *et al.*, 1985; Da-Cruz *et al.*, 1994; Da-Cruz *et al.*, 2002). Entretanto, o percentual de subtipos de células T presente no infiltrado inflamatório não tem associação com o percentual de subtipos de células T presente no sangue periférico ou mesmo com células T do sangue reativas a *Leishmania* (Modlin *et al.*, 1985; Da-Cruz *et al.*, 2005). Processos migratórios devem ocorrer entre esses dois compartimentos (sangue e lesão), por haver no sangue uma frequência mais baixa de células T reativas à *Leishmania* do que nas lesões (Conceição-Silva *et al.*, 1990). Considerando que é nas lesões onde deve ocorrer os principais eventos imunopatogênicos que determinam a evolução da doença torna-se fundamental compreender as características funcionais das células que compõem esse infiltrado inflamatório.

Neste estudo foi avaliado o recrutamento de células para o sítio inflamatório da leishmaniose, a pele, através da expressão membranar das moléculas CLA, LFA-1 e CD62L em células do sangue e de lesão de leishmaniose cutânea. Além disso, foi investigado se os antígenos de *Leishmania* eram capazes de modular a expressão destas moléculas. Também foi estudada a composição do infiltrado inflamatório de lesões cutâneas de leishmaniose com foco na avaliação de moléculas associadas à ativação e à citotoxicidade, e a diferenciação celular. As avaliações imunológicas foram correlacionadas com os parâmetros clínicos tempo de evolução, área da lesão e diâmetro da IDRM a fim de melhor entender a participação desses tipos celulares na patogênese da doença.

Os resultados aqui apresentados mostraram que os linfócitos T migraram para as lesões e que os antígenos de *Leishmania* modulam positivamente a molécula CLA, associada à migração de linfócitos para a pele em indivíduos com doença ativa, mas não em indivíduos curados ou em indivíduos saudáveis. Também foi observado um menor percentual de células ativadas e com moléculas associadas à função efetora no sangue periférico do que nas lesões. Nestas, os linfócitos predominantes são linfócitos de memória efetora, que estão ativados e expressando na membrana molécula associada à citotoxicidade. Entretanto, também foram encontrados linfócitos *naïve* e de memória central. O percentual de células TCD4⁺ ativadas (exibindo a molécula CD69) e de T citotóxicas (exibindo a molécula CD244) parecem influenciar na patogênese da doença, uma vez que está positivamente correlacionado com o tempo

de evolução e a área de lesão, respectivamente. Adicionalmente, foi verificado que a migração linfocitária pode ser influenciada pelas quimiocinas CCL2, CCL3 e CCL5 tendo em vista que estas quimiocinas estão presentes no infiltrado inflamatório das lesões de *L. braziliensis*.

Linfócitos T com fenótipo CLA⁺ se acumulam nas lesões de leishmaniose e os antígenos de *Leishmania* são capazes de aumentar a expressão desta molécula

Foi observado um menor percentual de células expressando na membrana CLA⁺ no sangue periférico dos pacientes quando comparados aos indivíduos saudáveis, e um percentual similar de células CD62L⁺. Essa diminuição nos percentuais de células com CLA pode indicar que os linfócitos exibindo esta molécula migraram para a lesão. Ou que a presença do patógeno poderia modular a expressão dessas moléculas. Diferenças entre o percentual de células TCLA⁺ entre o sangue e as lesões também foram observadas na psoríase, onde as células T são as principais células envolvidas na patogênese da doença (Teraki *et al.*, 2004). A análise feita no sangue periférico dos pacientes de leishmaniose mostrou que a diminuição no percentual de células CLA positivas foi mais marcante para as células TCD8⁺ do que para as células TCD4⁺. Por outro lado, um aumento de LFA-1 em células TCD4⁺, mas não em células TCD8⁺, foi mais observado nos pacientes de LC que nos indivíduos saudáveis. Essas diferenças no percentual de CLA e de LFA-1 entre os subtipos de células T podem influenciar na migração destas células T para o sítio inflamatório. E ainda, podendo determinar qual o tipo celular que está preferencialmente infiltrando a lesão.

Após o estímulo com antígenos de *Leishmania*, as células dos pacientes com doença ativa aumentaram a expressão membranar de CLA quando comparados com os percentuais de linfócitos circulantes, mas o mesmo não ocorreu com indivíduos controles. Adicionalmente, os níveis de CD62L não foram alterados com a estimulação antigênica. Resultados semelhantes foram observados com pacientes de psoríase estimulados com antígenos de *Streptococcus* (Baker *et al.*, 1997). Os achados desta tese sugerem que o estímulo específico torna as células capazes de migrar. Entretanto, não foi avaliado se esse fenômeno ocorre também com antígenos não relacionados à doença. Também não foi avaliado se, além da capacidade de migrar pela presença da molécula CLA, esses linfócitos específicos funcionalmente migram.

Com o término do tratamento e conseqüentemente evolução para a cura clínica, o percentual de linfócitos circulantes CLA positivos ainda foi inferior ao observado em indivíduos sadios. Entretanto, longo tempo após a cura, o perfil de expressão membranar da molécula CLA voltou a níveis similares ao observados nos indivíduos controles. O estímulo com antígeno de *Leishmania* aumenta a expressão de CLA nos linfócitos de pacientes em término do tratamento, mas não em indivíduos com longo tempo de cura. Em conjunto, esses resultados mostram que as células específicas para *Leishmania* expressam moléculas que as tornam capazes de migrar durante a fase ativa e ao final do término do tratamento. Entretanto, longo tempo após a cura, onde não há mais sinais clínicos da doença, há uma diminuição da capacidade migratória, o que seria compatível com a fase clínica que se encontram os pacientes, onde já não há processo inflamatório.

A presença de células CLA⁺ em lesões de LTA já havia sido relatada por outros autores (Diaz *et al.*, 2002; Morgado *et al.*, 2008). Os resultados aqui apresentados mostram que 25% dos linfócitos das lesões de leishmaniose são CLA positivas, mas tanto TCD4⁺ quanto TCD8⁺ exibem percentuais semelhantes desta molécula. Por outro lado, o percentual de células CLA⁺ encontrado em lesões de leishmaniose é menor do que o observado em lesões de psoríase (Teraki *et al.*, 2004). É interessante notar que em psoríase, apesar do infiltrado inflamatório predominante ser também linfocitário, este é menos intenso do que o observado na leishmaniose (Porto-Ferreira, 2008). Por outro lado, é possível que as células T possam estar utilizando outras moléculas além do CLA, como CCR4, CCR6 e CCR10, ou LFA-1 para entrar na pele acometida. Outra possibilidade é que após a entrada no sitio inflamatório, essas células percam a expressão membranar de CLA ou ainda que esses linfócitos estejam proliferando no local e não mais expressem essa molécula.

A presença de células CLA⁺ parece influenciar na patogênese de outras doenças dermatológicas (Teraki *et al.*, 2004; Pont-Giralt *et al.*, 2006; Sieling *et al.*, 2007). O percentual de células TCD8⁺ exibindo CLA no sangue de indivíduos com psoríase está diretamente correlacionado com a gravidade da doença (Sigmundsdottir *et al.*, 2001). Em dermatite atópica, o percentual de células TCD4⁺ CLA positivas no sangue periférico está relacionado com a cronicidade das lesões (Antunez *et al.*, 2006). Em hanseníase, um maior percentual de células CLA⁺ é observado na forma benigna da doença (Sieling *et al.*, 2007). É possível que a natureza do estímulo tenha influência na função linfocitária e na expressão da molécula CLA. Entretanto, os resultados aqui apresentados não mostraram associação entre o percentual de células

CLA⁺, tanto do sangue quanto das lesões, e parâmetros clínicos (tempo de evolução ou área da lesão).

O enriquecimento de linfócitos expressando na membrana CLA e LFA-1 foi observado nas lesões de pacientes de LC quando comparado com o sangue periférico. Os percentuais observados de CLA em células TCD4⁺ neste estudo foi semelhante ao observado em pele sadia por Bos *et al.* (1993). Entretanto, os níveis de TCD8⁺ expressando CLA na membrana observados neste estudo parecem ser maiores na LC do que o observado na pele normal (Bos *et al.*, 1993). Por outro lado, as lesões de leishmaniose estavam enriquecidas de células TCD4⁺ exibindo LFA-1, enquanto os níveis desta molécula já se encontravam altos em células TCD8⁺. O estímulo com antígenos de *Leishmania* induziu um aumento no percentual de células CLA⁺, principalmente em TCD4⁺. Em conjunto, esses dados sugerem as células TCD4⁺ e TCD8⁺ devem utilizar diferentes moléculas para a migração para a pele. Entretanto, para que haja migração uma sobreposição de moléculas ocorre, onde células CLA⁺ utilizam tanto LFA-1 quanto VLA-4 para a transmigração (Santamaria Babí *et al.*, 1995). A utilização de moléculas alternativas para a migração de linfócitos pode ter conseqüências na funcionalidade das células, influenciando a composição do infiltrado inflamatório e conseqüentemente a patogênese da doença.

As células CLA positivas migram especificamente para sítios inflamatórios cutâneos (Santamaria-Babí, 2004). Entretanto, a leishmaniose causada pela *L. braziliensis* causa lesões cutâneas, e também lesões mucosas (Oliveira-Neto, 1998). O acometimento mucoso é acompanhado de comprometimento da pele do nariz (Oliveira-Neto, 1998). É possível que as células dos pacientes de LM, por serem células hiperativadas (Da-Cruz *et al.*, 2005) e com maior freqüência de células respondedoras aos antígenos de *Leishmania* (Conceição-Silva *et al.*, 1990), expressem níveis mais altos de CLA do que os pacientes de LC. A migração linfocitária para o local da infecção deve ocorrer, devido ao acometimento da pele do nariz. Adicionalmente, deve ocorrer uma migração para o local uma vez que o endotélio está ativado, e expressa moléculas necessária para a transmigração celular.

Diferenças funcionais e de ativação das células T presentes no sangue e nas lesões de pacientes de leishmaniose cutânea

A presença de linfócitos no infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose já vem sido relatada desde estudos já antigos utilizando o método de histopatologia

(Ridley *et al.*, 1980; Magalhães *et al.*, 1986a). Estudos do nosso grupo passaram a utilizar a citometria de fluxo para analisar a celularidade de células das lesões de LC (Da-Cruz *et al.*, 2005). Os resultados aqui apresentados mostram que cerca da metade (49,5%) das células presentes no infiltrado inflamatório são linfócitos T. Esta proporção é similar ao encontrado por outros autores (Modlin *et al.*, 1985; Barral *et al.*, 1987; Nilsen & Mshana, 1987; Pirmez *et al.*, 1990; Esterre *et al.*, 1992; Da-Cruz *et al.*, 2005; Morgado *et al.*, 2008). Assim como Lima *et al.* (1994) e Morgado *et al.* (2008), esse estudo também não encontrou correlações do percentual de células TCD3⁺ com o tempo de evolução e com o diâmetro da IDRM. Entretanto, no presente estudo foi observada uma correlação positiva entre o percentual de células TCD3⁺ com a área da lesão. Além disto, as lesões com maior diâmetro tenderam a ter maior índice de estimulação das células da lesão frente aos antígenos de *Leishmania*, sugerindo que a extensão da lesão, e portanto o dano tecidual, é gerada pelo número de células T específicas que migraram para as lesões. Esta hipótese está em consonância com a demonstração de que a frequência de células respondedoras para *Leishmania* é mais elevada na forma mucosa do que na cutânea, associando-se assim com a gravidade da doença (Conceição-Silva *et al.*, 1990).

Resultados controversos são observados na literatura em relação ao percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ nas lesões de leishmaniose. Tanto um predomínio de TCD4⁺ (Barral *et al.*, 1987; Pirmez *et al.*, 1990), com um predomínio de TCD8⁺ (Modlin *et al.*, 1985; Nilsen & Mshana, 1987; Isaza *et al.*, 1996) ou percentuais semelhantes destas células (Lima *et al.*, 1994) podem ser encontrados em estudos envolvendo lesões de leishmaniose. Nesse estudo o que se pode observar foi a confirmação de que há uma grande variabilidade no percentual de células TCD4⁺ e no percentual de TCD8⁺ nos pacientes avaliados. Essa variabilidade de percentuais foi independente da técnica utilizada, já que foi possível constatá-la não só pela técnica de imunohistoquímica como também pela citometria de fluxo. Esses resultados heterogêneos em relação ao percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ também já foram descritos por Palma & Saraiva (1997) utilizando a técnica de imunohistoquímica e por Da-Cruz *et al.* (2005) utilizando a citometria de fluxo. De um lado, essa variabilidade é esperada na técnica de imunohistoquímica, já que esta avalia apenas um corte longitudinal do fragmento de lesão, e que numa mesma lesão de leishmaniose podem ser encontrados padrões histopatológicos distintos dependendo da região estudada (Bittencourt & Barral, 1991). Por outro, utilizando a técnica de citometria de fluxo, que avalia o “pool” de células presentes num fragmento de tecido contendo o infiltrado

inflamatório, também foi observada essa variação do percentual de célula TCD4⁺ e TCD8⁺. Tal fato pode ser explicado pelo caráter transitório do infiltrado inflamatório das lesões de leishmaniose, já que padrões de síntese e degradação da matriz extracelular são observados no granuloma (Esterre *et al.*, 1991), o que pode fazer com que as lesões sigam padrões evolutivos distintos.

As células T presentes nas lesões apresentaram fenótipo de células de memória, perfil este que já havia sido demonstrado por outros autores (Pirmez *et al.*, 1990; Martinez-Arends *et al.*, 1991; Esterre *et al.*, 1992). Notavelmente, o percentual de células TCD8⁺CD45RO⁺ foi significativamente mais baixo do que as células TCD4⁺CD45RO⁺. Esse fato poderia ser explicado pela presença de células TCD8⁺ altamente diferenciadas e com alta capacidade efetora, que passam a re-expressar as moléculas CD45RA chamadas de células T efetoras RA⁺ ou T_{EMRA} (Sallusto *et al.*, 2004). Quando avaliado o percentual de células TCD4⁺ *naive* em relação ao percentual de células TCD8⁺ *naive* não foram observadas diferenças entre esses subtipos de células. Essa diferença entre os subtipos de células T de memória pode ser devido ao maior percentual de eventos apoptóticos que ocorrem nas células TCD8⁺ durante a fase ativa (Bertho *et al.*, 2000).

A população de células T de memória pode ser subdividida em células de memória central (T_{MC}) e células de memória efetora (T_{ME}) (Sallusto *et al.*, 2004). Os resultados aqui apresentados mostraram que há um maior percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de memória efetora nas lesões de leishmaniose do que no sangue periférico dos mesmos indivíduos. A presença de células T_{ME} é essencial nos sítios inflamatórios e potencialmente eficaz na manutenção da homeostase dos tecidos (Badovinac & Harty, 2003). Por outro lado, um percentual significativamente maior de células T_{MC} está presente no sangue periférico dos pacientes do que nas lesões. As células T_{MC} apresentam em seu fenótipo de migração para o linfonodo e não para a pele (Sallusto *et al.*, 2004) e por isso podem ser encontradas em maior percentual no sangue periférico do que nas lesões. Adicionalmente, o percentual de células T_{MC} no sangue periférico foi semelhante ao percentual de células T_{ME} e *naive* neste mesmo compartimento. Essa semelhança nos percentuais de células T_{MC}, T_{ME} e *naive* pode ser devido à diversidade de especificidade das células que são circulantes, uma vez que avaliamos o fenótipo celular no total de células do sangue periférico. Entretanto, um enriquecimento de células T_{MC} estava presentes no infiltrado inflamatório. As células T_{MC} que tendem a migrar para os linfonodos, têm uma função efetora limitada, e que somente após um segundo encontro com o antígeno podem proliferar e passar

a exercer funções efetoras (Lanzavecchia & Sallusto, 2005). Na infecção experimental por *L. major*, as células TCD4⁺ com características de células T efetoras são protetoras e dependem presença do parasito. Enquanto que as células TCD4⁺ com características de células de memória, são geradas na presença do patógeno, medeiam a resposta imune protetora e sobrevivem mesmo na ausência do parasito (Zaph *et al.*, 2004).

Também compõem o infiltrado, raras células TCD4⁺ e TCD8⁺ *naive*. O percentual de células *naive* encontrado neste estudo é semelhante ao observado por outros autores (Pirmez *et al.*, 1990; Martinez-Arends *et al.*, 1991; Esterre *et al.*, 1992), indicando que a abordagem utilizada é válida. A presença destas células *naive* no infiltrado deve ocorrer por migração inespecífica destas células para a pele, uma vez que essas estão presentes tanto em pele normal como em outras lesões cutâneas (Bos *et al.*, 1989). Estas células devem desempenhar um papel inespecífico no infiltrado inflamatório, já que não foram primadas previamente.

A análise da ativação linfocitária foi determinada pela expressão de CD25 e CD69 nas células TCD4⁺ e TCD8⁺ das lesões de leishmaniose. Um enriquecimento de células TCD4⁺ e TCD8⁺ ativadas expressando as moléculas CD69 e CD25 na membrana foi observado nas lesões, quando comparado com o sangue periférico de pacientes de leishmaniose. Estudos anteriores mostraram a presença de células ativadas nas lesões (Pirmez *et al.*, 1990; Martinez-Arends *et al.*, 1991; Esterre *et al.*, 1992; Diaz *et al.*, 2002; Da-Cruz *et al.*, 2005) e no sangue periférico (Antonelli *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007). Entretanto estes estudos não compararam a presença de células ativadas entre o sangue e as lesões. Esse percentual é semelhante ao observado em estudo anterior (Esterre *et al.*, 1992). Cerca de 50% das células TCD4⁺ e TCD8⁺ das lesões expressam CD25 ou CD69 na membrana, embora fossem percentuais muito variáveis entre os pacientes avaliados. Por outro lado, como as moléculas CD69 e CD25 aparecem em fases distintas da ativação celular (Ullman *et al.*, 1990), pode-se supor que deste percentual, metade das células estavam em fase de ativação recente, expressando CD69 na membrana e a outra metade estava em fase da ativação tardia, expressando CD25 na membrana. A presença de populações de células em diferentes fases de ativação celular pode indicar que: i) as células estão proliferando no infiltrado inflamatório; ii) que essas populações exibindo diferentes moléculas de ativação podem exercer funções efetoras diversas; iii) novas células estão migrando para o infiltrado inflamatório e sendo ativadas no local.

A presença de células ativadas e com fenótipo de células T_{ME}, sugere que essas células estão em sua plena capacidade funcional, já que células T_{ME} parecem exercer sua função protetora imediata (Lanzavecchia & Sallusto, 2005). Entretanto, neste estudo não foi possível determinar a função efetora dessas células T_{ME}. Por outro lado, diversos autores observaram a presença de células exercendo funções efetoras na leishmaniose cutânea. A presença de células TCD4⁺ e TCD8⁺ produtoras de IFN- γ (Faria *et al.*, 2005), células TCD8⁺ produtoras de granzima A (Faria *et al.*, 2009) e a presença de células TCD4⁺CD25⁺ produtoras de IL-10 e TGF-B (Campanelli *et al.*, 2006) mostram que a composição de células efetoras presente no infiltrado inflamatório da leishmaniose é heterogêneo, isto é, com a expressão de citocinas do tipo I e do tipo II (Pirmez *et al.*, 1993).

A expressão da molécula CD244 confere um fenótipo de capacidade citotóxica de linfócitos T e de células NK (Valiante & Trinchieri, 1993). Já as células efetoras TCD8⁺CD244⁺ são capazes de produzir IFN- γ , granzima B e perforina (Speiser *et al.*, 2001). Os resultados aqui apresentados mostraram que as células TCD8⁺ de lesões de leishmaniose apresentavam alto nível expressão membranar de moléculas associadas à ativação (CD38) e à citotoxicidade (CD244). O percentual de células TCD8⁺CD38⁺ não teve correlação com nenhum parâmetro avaliado, ou seja, com o diâmetro da IDRM, com o tempo de evolução ou com a área da lesão. Entretanto, os percentuais de células TCD3⁺ e TCD8⁺ se correlacionaram positivamente com o tempo de evolução e com a área da lesão, respectivamente. Na leishmaniose, a presença de células TCD8⁺ reativas à *Leishmania* está correlacionada com a cura (Da-Cruz *et al.*, 1994; Da-Cruz *et al.*, 2002), mas altos níveis de TCD8⁺ citotóxicas (Brodszyn *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2009) estão associadas à patogênese da doença (Machado *et al.*, 2002) ou a formas mais graves como a leishmaniose mucosa.

O percentual de células TCD4⁺CD69⁺ e células TCD3⁺CD244⁺ (citotóxicas) presentes nas lesões foi positivamente correlacionado com o tempo de evolução. O fato de um acúmulo de células CD69⁺CLA⁺ (Diaz *et al.*, 2002) e de células TCD8⁺ produtoras de granzima A (Faria *et al.*, 2009) ser observado em lesões tardias, reafirma a hipótese de que a cronicidade das lesões se deve à migração de células ativadas com alto potencial citotóxico.

Este estudo mostrou que o infiltrado inflamatório de lesões de leishmaniose também é composto por células T duplo-negativas (CD3⁺CD4⁻CD8⁻, DN). O percentual observado neste estudo é maior do que o observado em pele sadia, onde 1-5% das

células TCD3⁺ são DN (Bos, 2005), o que sugere a migração e o envolvimento destas células na patogênese da lesão de leishmaniose. A presença destas células tanto no sangue periférico como em lesões de leishmaniose mostrou que elas produzem IFN- γ (Bottrel *et al.*, 2001; Faria *et al.*, 2005; Antonelli *et al.*, 2006). Avaliações do perfil e função das células DN devem ser realizadas para melhor entendimento da participação destas células na patogênese da LTA.

Análise fenotípica dos linfócitos de lesões de pacientes de duas áreas endêmicas distintas de *Leishmania (V.) braziliensis*

Nesse estudo foram avaliados pacientes de duas áreas endêmicas de leishmaniose distintas: pacientes do Estado do Rio de Janeiro (RJ) e pacientes da região de Corte de Pedra, Estado da Bahia (BA). Nestas duas áreas de estudo, circulam a mesma espécie, ou seja, *Leishmania (V.) braziliensis* (Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2005).

Os pacientes BA foram considerados com leishmaniose recente, pois tinham tempo de evolução menor de 30 dias. Enquanto que os pacientes RJ foram considerados com leishmaniose tardia, pois tinham tempo de evolução maior que 60 dias. Essa estratificação segundo tempo de evolução e local de residência se deve ao fato de que em Corte de Pedra (BA) tínhamos como objetivo recrutar os pacientes com lesões com tempo de evolução inferior a 30 dias. Entre os outros parâmetros clínicos avaliados (idade, número de lesões, IDR, área da lesão) não houve diferenças entre os dois grupos. Entretanto, foi atendido no ambulatório do RJ um paciente com tempo de evolução de 30 dias. Assim, neste trabalho optou-se por denominar os grupos de pacientes segundo a área estudada, embora tenha que se considerar as limitações que esta estratificação venha a imprimir na interpretação dos resultados. Além disso, sabe-se que os pacientes da área endêmica da Bahia têm características diferentes do Rio de Janeiro, como por exemplo, a necessidade de utilizar repetidos esquemas de antimônio para obter eficácia terapêutica (informação pessoal, Oliveira-Neto MP e Guimarães LH).

Embora não houvesse diferenças significativas, foi observado um aumento no percentual de células TCD3⁺ nos pacientes RJ quando comparados com os pacientes BA. Contudo, o tempo de evolução não tem influência no percentual de células TCD3⁺ em lesões de leishmaniose (Lima *et al.*, 1994).

Um maior percentual de células TCD4⁺ foi observado nos pacientes BA do que nos pacientes RJ, mas o mesmo não foi observado para TCD8⁺. Esses dados diferem dos apresentados por Da-Cruz *et al.* (2005), por Morgado *et al.* (2008) e por Faria *et al.* (2009), e essas diferenças podem ser devido a: i) por serem pacientes de áreas endêmicas diferentes; ii) diferenças entre as metodologias utilizadas nesse estudo e os estudos de Morgado *et al.* (2008) e Faria *et al.* (2009); iii) ao baixo índice de correlação observado por Da-Cruz *et al.* (2005). Entre os pacientes da Bahia, foi verificado um menor percentual de células TCD8⁺ do que células TCD4⁺. É possível que mecanismos apoptóticos estejam ocorrendo nos pacientes de lesões recentes uma vez que pacientes em fase ativa da doença expressam maior percentuais de células apoptóticas (Bertho *et al.*, 2000), e que em lesões recentes há uma menor expressão de células TCD8⁺ Granzima A⁺ (Faria *et al.*, 2009). Em conjunto esses dados podem explicar a dificuldade de cura destes pacientes da BA, uma vez que as células TCD8⁺ são as células necessárias para a eliminação parasitária.

A avaliação citofluorimétrica realizada para análise da molécula CD25 mostrou uma grande heterogeneidade no percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ ativadas, tanto nos pacientes BA quanto nos pacientes RJ. Entretanto a análise, caso a caso, respeitando o agrupamento segundo área endêmica, mostrou que os pacientes de BA têm um percentual de células TCD4⁺CD25⁺ maior que o percentual de células TCD4⁺CD69⁺. As células TCD4⁺CD25⁺ presentes no infiltrado inflamatório estão em sua maioria expressando na membrana moléculas que as associam com as células T reguladoras (Treg), além ter sido demonstrado por outros autores que estas produzem IL-10 e exercem função reguladora (Campanelli *et al.*, 2006). Adicionalmente, lesões recentes de pacientes infectados por *L. guyanensis* têm um predomínio de resposta do tipo Th2, além de uma maior expressão gênica de *FoxP3* (Bourreau *et al.*, 2003; Bourreau *et al.*, 2009). Assim, considerando o fato de serem lesões também recentes, é possível supor que a população de células TCD4⁺CD25⁺ presentes nas lesões dos pacientes BA, sejam na sua maioria células Treg. Entretanto, essa presença pode ser transitória, já que em no grupo de pacientes RJ, e com maior tempo de evolução das lesões, foi observado maior percentual de células TCD4⁺CD69⁺ do que TCD4⁺CD25⁺. É possível que com a cronicidade das lesões, mais células TCD4⁺CD69⁺ migrem para o sítio da infecção, já que a maioria das células CD69⁺ desta fase expressa na membrana a molécula de migração para a pele, CLA (Diaz *et al.*, 2002).

Não foi observado nenhum padrão associado às células TCD8⁺ ativadas nos grupos de pacientes estudados, mesmo avaliando caso a caso. A grande dispersão no

percentual de células ativadas sugere que apenas a avaliação das células TCD8+ ativadas não seja uma boa estratégia imunológica a fim de investigar células com potencial patogênico, uma vez que células TCD8 com diversas funcionalidades podem expressar em suas membranas moléculas de ativação celular.

É bastante possível que as diferenças imunológicas aqui encontradas entre os pacientes BA e RJ possam ser devido a diferenças de áreas endêmicas. Apesar de se tratar da infecção pela mesma espécie de *Leishmania*, as diferenças entre o status imunológico do paciente (Silveira *et al.*, 1998; Murray *et al.*, 2005), assim como variações genéticas do parasito são fatores que influenciam diretamente na patogenia da leishmaniose. É interessante que esses dados dos pacientes RJ sejam comparados com pacientes BA com mesmo tempo de evolução para que todos esses pontos discutidos acima sejam confirmados. Por outro lado, caso seja obtida a confirmação de que lesões recentes e tardias têm padrões diferentes de ativação, será uma contribuição relevante para o melhor entendimento da imunopatogênese das lesões de leishmaniose, assim como auxiliar no estabelecimento de novas estratégias terapêuticas.

A influência da proporção entre TCD4⁺/TCD8⁺ observada no infiltrado inflamatório das lesões de leishmaniose cutânea na ativação e na função efetora dos linfócitos

A estratificação dos pacientes segundo a razão TCD4/TCD8 pode ser uma abordagem interessante na tentativa de identificar padrões imunes na leishmaniose, uma vez que não há correlação entre os achados histopatológicos e os dados clínicos (Magalhães *et al.*, 1986b; Gutierrez *et al.*, 1991). Por outro lado, estudos no sangue mostram que a razão TCD4⁺:TCD8⁺ varia com o tempo de cura dos pacientes, onde um maior percentual de células TCD8⁺ é observado longo tempo pós-tratamento (Da-Cruz *et al.*, 1994; Da-Cruz *et al.*, 2002). A estratificação feita com os pacientes deste estudo mostra que, além das diferenças entre a razão TCD4/TCD8, parecem existir diferenças no tempo de evolução entre os grupos.

A estratificação dos pacientes revelou que existem diferenças também em relação ao percentual de células TCD3⁺, ativação linfocitária e na citotoxicidade. Um maior percentual de células TCD3⁺, de células ativadas TCD4⁺CD25⁺ e TCD8⁺CD25⁺, e de células TCD8 com a expressão de molécula de citotoxicidade foi observado no

grupo I (%TCD4>%TCD8) e no grupo II (%TCD4<%TCD8), sugerindo que esses pacientes possuem uma resposta imune hiperreativa. Os dados sugerem que os pacientes com a presença de percentual similar de TCD4+ e TCD8+ no infiltrado inflamatório possuem uma resposta imune balanceada com menor percentual de células ativadas e de células citotóxicas. E uma vez que ocorre uma desproporção no percentual de qualquer uma das subpopulações de células T, esse balanço imune é rompido, com o aumento do percentual de células ativadas e citotóxicas. Um maior percentual de células ativadas e citotóxicas é encontrada em lesões crônicas de leishmaniose (Diaz *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2009), assim como um maior percentual de ativação é observado em lesões mucosas (Da-Cruz *et al.*, 2005). É importante ressaltar que, é possível que haja diferença entre as funções das populações de células TCD4⁺ e TCD8⁺ ativadas presentes nestes grupos e que essa diferença deve ser importante para o equilíbrio imune das lesões de leishmaniose.

Quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES são detectadas nas lesões de leishmaniose causadas pela *Leishmania (V.) braziliensis*

Neste estudo foi observada a presença das quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES em lesões de leishmaniose cutânea causada pela *L. braziliensis* e a presença dessas quimiocinas podem influenciar na composição do infiltrado inflamatório. A presença de quimiocinas no infiltrado inflamatório foi mostrada anteriormente em lesões de leishmaniose causadas pela *L. mexicana* (Ritter *et al.*, 1996). A análise histológica destas quimiocinas no infiltrado inflamatório mostrou que o CCL2/MCP-1 e o CCL3/MIP-1 α estão presentes em padrão similar ao mostrado em lesões de *L. mexicana*. Por outro lado, diferentemente que os achados de Ritter *et al.* (1996), a expressão de RANTES foi observada nas lesões de *L. braziliensis*.

A intensidade de expressão de CCL3/MIP-1 α foi positivamente correlacionada com a expressão de CCL5/RANTES. O processo imunopatológico da leishmaniose envolve processos de síntese e degradação da matriz extracelular (Esterre *et al.*, 1991), provavelmente numa tentativa resolução da infecção. Sabe-se que durante um processo de cicatrização ocorre o aumento da expressão de CCL2/MIP-1 α e CCL3/RANTES (Dipietro *et al.*, 1998; Frank *et al.*, 2000). É possível que essas citocinas atuem de forma sinérgica durante o processo inflamatório uma vez que influenciam na cicatrização e na atração de células do tipo Th1 para o local de infecção.

O percentual de células TCD4⁺ foi positivamente correlacionado com a quimiocina CCL3/MIP-1 α , sugerindo que essas células foram atraídas pela presença desta quimiocina. Em baixas concentrações, a quimiocina CCL3/MIP-1 α é capaz de atrair células TCD4⁺ de memória enquanto que em altas concentrações atrai tanto células TCD4⁺ quanto células TCD8⁺ (Schall *et al.*, 1993). Entretanto, é possível que esta quimiocina atraia células TCD4⁺ com diferentes funções efetoras, uma vez que o aumento da expressão desta quimiocina foi associado com a forma disseminada da leishmaniose, além desta quimiocina não ser capaz de ativar monócitos e consequentemente eliminação do parasito (Ritter *et al.*, 1996; Ritter & Korner, 2002).

V – Conclusões

✓ Os antígenos de *Leishmania* foram capazes de aumentar o percentual de células TCD4⁺ e TCD8⁺ expressando a molécula CLA, mas não o percentual de células expressando a molécula CD62L em pacientes de leishmaniose, indicando que os antígenos de *Leishmania* modulam positivamente a migração de linfócitos para as lesões, e não para o linfonodo.

✓ Os baixos percentuais de células TCD4⁺ e TCD8⁺ expressando a molécula CLA presente no sangue periférico de pacientes de leishmaniose, mas não de indivíduos sadios associado com um alto percentual de células TCD4 e TCD8 expressando a moléculas CLA nas lesões, sugerem que essas células migraram para o sítio de infecção.

✓ A presença de células TCD4⁺ e TCD8⁺ de memória efetora expressando diferentes moléculas de ativação além de moléculas de citotoxicidade nas lesões de leishmaniose sugerem que essas células estão desempenhando suas funções efectoras;

✓ A correlação positiva entre o percentual de células TCD3⁺ com a área da lesão e a tendência de uma maior frequência de células específicas com a área da lesão indicam que as células T presente no infiltrado influenciam a patogênese da leishmaniose;

✓ Os resultados mostram que células TCD4⁺CD69⁺, TCD3⁺CD244⁺ e TCD8⁺CD244⁺ influenciam na patogênese das lesões de leishmaniose por se correlacionarem positivamente com o tempo de evolução e a área da lesão, respectivamente.

✓ As células TCD4⁺ expressam diferentes moléculas de ativação quando comparado as lesões de pacientes BA (lesões recentes) e RJ (lesões tardias). É possível que essas diferenças encontradas em relação às células TCD4⁺ ativadas sejam devido a diferentes funções desempenhadas por estas destas células.

✓ As quimiocinas CCL2/MCP-1, CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES estão presentes nas lesões cutâneas de leishmaniose.

VI. Referências Bibliográficas

Andrade, BB, de Oliveira, CI, Brodskyn, CI, Barral, A & Barral-Netto, M. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. *Scand J Immunol.* 2007; 66(2-3): 122-7.

Antonelli, LR, Dutra, WO, Almeida, RP, Bacellar, O, Carvalho, EM & Gollob, KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005; 101(2): 226-30.

Antonelli, LR, Dutra, WO, Oliveira, RR, Torres, KC, Guimarães, LH, Bacellar, O, et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2006; 74(11): 6317-23.

Antunez, C, Torres, MJ, Mayorga, C, Corzo, JL, Jurado, A, Santamaria-Babi, LF, et al. Cytokine production, activation marker, and skin homing receptor in children with atopic dermatitis and bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2006; 17(3): 166-74.

Appay, V & Rowland-Jones, SL. RANTES: a versatile and controversial chemokine. *Trends Immunol.* 2001; 22(2): 83-7.

Badovinac, VP & Harty, JT. Memory lanes. *Nat Immunol.* 2003; 4(3): 212-3.

Baggiolini, M & Loetscher, P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunol Today.* 2000; 21(9): 418-20.

Baker, BS, Garioch, JJ, Hardman, C, Powles, A & Fry, L. Induction of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression by group A streptococcal antigens in psoriasis. *Arch Dermatol Res.* 1997; 289(12): 671-6.

Barral, A, Jesus, AR, Almeida, RP, Carvalho, EM, Barral-Netto, M, Costa, JM, et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1987; 9(4): 487-97.

Bertho, AL, Santiago, MA, Da-Cruz, AM & Coutinho, SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 2000; 33(3): 317-25.

Bittencourt, AL & Barral, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86(1): 51-6.

Bos, JD, Zonneveld, I, Das, PK, Krieg, SR, van der Loos, CM & Kapsenberg, ML. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J Invest Dermatol.* 1987; 88(5): 569-73.

Bos, JD, Hagenars, C, Das, PK, Krieg, SR, Voorn, WJ & Kapsenberg, ML. Predominance of "memory" T cells (CD4+, CDw29+) over "naive" T cells (CD4+, CD45R+) in both normal and diseased human skin. *Arch Dermatol Res.* 1989; 281(1): 24-30.

Bos, JD, de Boer, OJ, Tibosch, E, Das, PK & Pals, ST. Skin-homing T lymphocytes: detection of cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA) by HECA-452 in normal human skin. *Arch Dermatol Res.* 1993; 285(4): 179-83.

Bos, JD & Kapsenberg, ML. The skin immune system: progress in cutaneous biology. *Immunol Today*. 1993; 14(2): 75-8.

Bos, JD. Skin immune system. In: Bos, Jd (Ed.). *Skin Immune System (SIS): cutaneous immunology and clinical immunodermatology*. Amsterdam: CRC Press, v.1, 2005.

Bottrel, RL, Dutra, WO, Martins, FA, Gontijo, B, Carvalho, E, Barral-Netto, M, et al. 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. *Infect Immun*. 2001; 69(5): 3232-9.

Bourreau, E, Gardon, J, Pradinaud, R, Pascalis, H, Prévot-Linguet, G, Karimnia, A, et al. Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect Immun*. 2003; 71(4): 2244-6.

Bourreau, E, Ronet, C, Darcissac, E, Lise, MC, Sainte Marie, D, Clity, E, et al. Intralesional regulatory T-cell suppressive function during human acute and chronic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*. *Infect Immun*. 2009a; 77(4): 1465-74.

Bourreau, E, Ronet, C, Darsissac, E, Lise, MC, Marie, DS, Clity, E, et al. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis*. 2009b; 199(4): 576-9.

Brodskyn, CI, Barral, A, Boaventura, V, Carvalho, E & Barral-Netto, M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 1997; 159(9): 4467-73.

Butcher, EC & Picker, LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science*. 1996; 272(5258): 60-6.

Cáceres-Dittmar, G, Tapia, FJ, Sánchez, MA, Yamamura, M, Uyemura, K, Modlin, RL, et al. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. *Clin Exp Immunol*. 1993; 91(3): 500-5.

Campanelli, AP, Roselino, AM, Cavassani, KA, Pereira, MSF, Mortara, RA, Brodskyn, CI, et al. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *J Infect Dis*. 2006; 193(9): 1313-22.

Campbell, JJ & Butcher, EC. Chemokines in tissue-specific and microenvironment-specific lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*. 2000; 12(3): 336-41.

Carr, MW, Roth, SJ, Luther, E, Rose, SS & Springer, TA. Monocyte chemoattractant protein 1 acts as a T-lymphocyte chemoattractant. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994; 91(9): 3652-6.

Carvalho, EM, Johnson, WD, Barreto, E, Marsden, PD, Costa, JL, Reed, S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*. 1985; 135(6): 4144-8.

Carvalho, LP, Passos, S, Bacellar, O, Lessa, M, Almeida, RP, Magalhaes, A, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*. 2007; 29(5): 251-8.

Castés, M, Agnelli, A, Verde, O & Rondon, AJ. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Immunol Immunopathol.* 1983; 27(2): 176-86.

Castés, M, Agnelli, A & Rondon, AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1984; 57(2): 279-86.

Castés, M, Cabrera, M, Trujillo, D & Convit, J. T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. *J Clin Microbiol.* 1988; 26(6): 1207-13.

Chu, AC & Morris, JF. The Keratinocytes. In: Bos, Jd (Ed.). *Skin Immune System (SIS): cutaneous immunology and clinical immunodermatology.* Amsterdam: CRC Press, v.1, 2005.

Colobran, R, Pujol-Borrell, R, Armengol, MP & Juan, M. The chemokine network. I. How the genomic organization of chemokines contains clues for deciphering their functional complexity. *Clin Exp Immunol.* 2007; 148(2): 208-17.

Conceição-Silva, F, Dórea, RCC, Pirmez, C, Schubach, AO, Cysne, L & Coutinho, SG. Frequency of Leishmania-reactive T cells in lesions of American mucocutaneous leishmaniasis (AMCL) patients. Its relevance in the process of healing or aggravation of the disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83 Suppl 1: 403-6.

Conceição-Silva, F, Dórea, RCC, Pirmez, C, Schubach, A & Coutinho, SG. Quantitative study of Leishmania braziliensis reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1990; 79(2): 221-6.

Coutinho, SG, Pirmez, C, Mendonça, SCF, Conceição-Silva, F & Dórea, RCC. Pathogenesis and immunopathology of leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1987; 82(Suppl1): 214-28.

Coutinho, SG, Da-Cruz, AM, Bertho, AL, Santiago, MA & De-Luca, P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res.* 1998; 31(1): 139-42.

Cunningham, AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by Leishmania. *Exp Mol Pathol.* 2002; 72(2): 132-41.

Cupolillo, E, Brahim, LR, Toaldo, CB, de Oliveira-Neto, MP, de Brito, ME, Falqueto, A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of Leishmania (Viannia) braziliensis from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2003; 41(7): 3126-32.

Da-Cruz, AM, Conceição-Silva, F, Bertho, AL & Coutinho, SG. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62(6): 2614-8.

Da-Cruz, AM. 1999. *Medicina Tropical*, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Da-Cruz, AM, Bittar, R, Mattos, M, Oliveira-Neto, MP, Nogueira, R, Pinho-Ribeiro, V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002; 9(2): 251-6.

- Da-Cruz, AM, Bertho, AL, Oliveira-Neto, MP & Coutinho, SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol.* 2005; 153(3): 537-43.
- Da-Cruz, AM & Pirmez, C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura, J (Ed.). *Dinâmica das Doenças Infecciosas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.2, 2005.
- de Almeida, MC, Vilhena, V, Barral, A & Barral-Netto, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003; 98(7): 861-70.
- Diaz, NL, Zerpa, O, Ponce, LV, Convit, J, Rondon, AJ & Tapia, FJ. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Exp Dermatol.* 2002; 11(1): 34-41.
- DiPietro, LA, Burdick, M, Low, QE, Kunkel, SL & Strieter, RM. MIP-1alpha as a critical macrophage chemoattractant in murine wound repair. *J Clin Invest.* 1998; 101(8): 1693-8.
- Esterre, P, Dedet, JP, Guerret, S, Chevallier, M, Frenay, C & Grimaud, JA. Matrix remodelling and fibroblast phenotype in early lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Pathol Res Pract.* 1991; 187(8): 924-30.
- Esterre, P, Dedet, JP, Frenay, C, Chevallier, M & Grimaud, JA. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992; 421(3): 239-47.
- Faria, DR, Gollob, KJ, Barbosa, J, Jr., Schriefer, A, Machado, PR, Lessa, H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun.* 2005; 73(12): 7853-9.
- Faria, DR, Souza, PEA, Durães, FV, Carvalho, EM, Gollob, KJ, Machado, PR, et al. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009; 31(8): 432-9.
- Frank, S, Kampfer, H, Wetzler, C, Stallmeyer, B & Pfeilschifter, J. Large induction of the chemotactic cytokine RANTES during cutaneous wound repair: a regulatory role for nitric oxide in keratinocyte-derived RANTES expression. *Biochem J.* 2000; 347 Pt 1: 265-73.
- Fukuoka, M, Ogino, Y, Sato, H, Ohta, T, Komoriya, K, Nishioka, K, et al. RANTES expression in psoriatic skin, and regulation of RANTES and IL-8 production in cultured epidermal keratinocytes by active vitamin D3 (tacalcitol). *Br J Dermatol.* 1998; 138(1): 63-70.
- Gollob, KJ, Antonelli, LR, Faria, DR, Keesen, TS & Dutra, WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol.* 2008; 8(10): 1338-43.
- Grevelink, SA & Lerner, EA. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol.* 1996; 34(2 Pt 1): 257-72.
- Guimarães, LH, Machado, PR, Lessa, HA, Lessa, M, D'Oliveira Jr, A & Carvalho, EM. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia.* 2005; 75(1): 66-74.
- Gutierrez, Y, Salinas, GH, Palma, G, Valderrama, LB, Santrich, CV & Saravia, NG. Correlation between histopathology, immune response, clinical presentation, and evolution in *Leishmania braziliensis* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 1991; 45(3): 281-9.

Isaza, DM, Restrepo, M, Restrepo, R, Caceres-Dittmar, G & Tapia, FJ. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1996; 55(4): 365-9.

Ji, J, Sun, J & Soong, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect Immun.* 2003; 71(8): 4278-88.

Kupper, TS & Fuhlbrigge, RC. Immune surveillance in the skin: mechanisms and clinical consequences. *Nat Rev Immunol.* 2004; 4(3): 211-22.

Lanzavecchia, A & Sallusto, F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr Opin Immunol.* 2005; 17(3): 326-32.

Leopoldo, PT, Machado, PR, Almeida, RP, Schriefer, A, Giudice, A, de Jesus, AR, et al. Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC Infect Dis.* 2006; 6: 75.

Li, M & Urmacher, CD. Normal Skin. In: Mills, Se (Ed.). *Histology for pathologist: Lippincott Williams & Wilkins*, v.1, 2007. p.1.

Lima, HC, Vasconcelos, AW, David, JR & Lerner, EA. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50(6): 743-7.

Loetscher, P, Seitz, M, Clark-Lewis, I, Baggiolini, M & Moser, B. Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes. *FASEB J.* 1994; 8(13): 1055-60.

Luster, AD. Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med.* 1998; 338(7): 436-45.

Luther, SA & Cyster, JG. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat Immunol.* 2001; 2(2): 102-7.

Machado, P, Kanitakis, J, Almeida, R, Chalon, A, Araujo, C & Carvalho, EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002; 12(5): 449-51.

Magalhães, AV, Moraes, MA, Raick, AN, Llanos-Cuentas, A, Costa, JM, Cuba, CC, et al. Histopathology of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Cellular reactions in tissues. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986a; 28(5): 300-11.

Magalhães, AV, Moraes, MA, Raick, AN, Llanos-Cuentas, A, Costa, JM, Cuba, CC, et al. Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986b; 28(4): 253-62.

Martinez-Arends, A, Tapia, FJ, Caceres-Dittmar, G, Mosca, W, Valecillos, L & Convit, J. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. *Acta Trop.* 1991; 49(4): 271-80.

Marzochi, MC & Marzochi, KB. Tegumentary and visceral leishmaniasis in Brazil: emerging anthroponosis and possibilities for their control. *Cad Saude Publica.* 1994; 10 Suppl 2: 359-75.

Matte, C & Olivier, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. *J Infect Dis.* 2002; 185(5): 673-81.

Maurer, M & von Stebut, E. Macrophage inflammatory protein-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(10): 1882-6.

Maurer, M, Dondji, B & von Stebut, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol.* 2009; 198(3): 137-46.

Melby, PC, Andrade-Narvaez, FJ, Darnell, BJ, Valencia-Pacheco, G, Tryon, VV & Palomo-Cetina, A. Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 1994; 62(3): 837-42.

Mendonça, SC, Coutinho, SG, Amendoeira, RR, Marzochi, MCA & Pirmez, C. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin Exp Immunol.* 1986; 64(2): 269-76.

Mihm, MC, Kibi, A-G & Wolff, K. Basic pathology reaction of the skin. In: Wolff, K, Goldschmidt, La, et al (Ed.). *Fitzpatrick's dermatology in general medicine: Mc Graw-Hill Medical*, v.1, 2008.

Ministério da Saúde, SVS. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana: 180 p. 2007.

Ministério da Saúde, SVS. Boletim Eletrônico Epidemiológico. Situação Epidemiológica das Zoonoses de Interesse à Saúde Pública
Brasília: Núcleo de comunicação da secretaria de vigilância em saúde. 1: 17 p. 2009.

Modlin, RL, Tapia, FJ, Bloom, BR, Gallinoto, ME, Castes, M, Rondon, AJ, et al. In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 1985; 60(2): 241-8.

Morgado, FN, Schubach, A, Rosalino, CM, Quintella, LP, Santos, G, Salgueiro, M, et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br J Dermatol.* 2008; 158(1): 50-8.

Moser, B & Loetscher, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001; 2(2): 123-8.

Moser, B, Wolf, M, Walz, A & Loetscher, P. Chemokines: multiple levels of leukocyte migration control. *Trends Immunol.* 2004; 25(2): 75-84.

Murray, HW, Berman, JD, Davies, CR & Saravia, NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet.* 2005; 366(9496): 1561-77.

Nilsen, R & Mshana, RN. In situ characterization of the cutaneous immune response in Ethiopian cutaneous leishmaniasis. *Scand J Immunol.* 1987; 26(5): 503-12.

O.M.S. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological record.* 2002; 77: 8.

O.M.S. Leishmaniasis - Magnetude of the problem. 2009 2009.

Oliveira-Neto, MP. Leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro - Estudo de 648 casos observados no Hospital Evandro Chagas. (doutorado). 1998. Biologia Parasitária, IOC, Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Rio de Janeiro.

Oliveira-Neto, MP, Mattos, MS, Perez, MA, Da-Cruz, AM, Fernandes, O, Moreira, J, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol*. 2000; 39(7): 506-14.

Picker, LJ. Control of lymphocyte homing. *Curr Opin Immunol*. 1994; 6(3): 394-406.

Pirmez, C, Cooper, C, Paes-Oliveira, M, Schubach, A, Torigian, VK & Modlin, RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol*. 1990a; 145(9): 3100-4.

Pirmez, C, Oliveira-Neto, MP, Grimaldi Junior, G & Savino, W. Immunopathology of American cutaneous leishmaniasis. Modulation of MHC class II gene products by keratinocytes before and after glucantime therapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1990b; 85(2): 203-9.

Pirmez, C, Yamamura, M, Uyemura, K, Paes-Oliveira, M, Conceição-Silva, F & Modlin, RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. 1993; 91(4): 1390-5.

Pirmez, C, da Silva Trajano, V, Paes-Oliveira Neto, M, da-Cruz, AM, Goncalves-da-Costa, SC, Catanho, M, et al. Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J Clin Microbiol*. 1999; 37(6): 1819-23.

Pont-Giralt, M, Gimenez-Arnau, AM, Pujol, RM & Santamaria-Babi, LF. Circulating CLA(+) T cells from acute and chronic psoriasis patients manifest a different activation state and correlation with disease severity and extension. *J Invest Dermatol*. 2006; 126(1): 227-8.

Porto-Ferreira, C. 2008. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Proudfoot, AE. Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*. 2002; 2(2): 106-15.

Reithinger, R, Dujardin, JC, Louzir, H, Pirmez, C, Alexander, B & Brooker, S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007; 7(9): 581-96.

Rey, L. O complexo *Leishmania braziliensis* e as Leishmanioses. In: Rey, L (Ed.). *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, v.1, 2001. p.216-24.

Ridley, DS. The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1979; 73(2): 150-60.

Ridley, DS. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980; 74(4): 515-21.

Ridley, DS, Marsden, PD, Cuba, CC & Barreto, AC. A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1980; 74(4): 508-14.

Ritter, U, Moll, H, Laskay, T, Brocker, E, Velazco, O, Becker, I, et al. Differential expression of chemokines in patients with localized and diffuse cutaneous American leishmaniasis. *J Infect Dis.* 1996; 173(3): 699-709.

Ritter, U & Moll, H. Monocyte chemoattractant protein-1 stimulates the killing of *Leishmania major* by human monocytes, acts synergistically with IFN- γ and is antagonized by IL-4. *Eur J Immunol.* 2000; 30(11): 3111-20.

Ritter, U & Korner, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2002; 24(6): 295-301.

Roberts, MTM. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull.* 2006; 75-76: 115-30.

Rossi, D & Zlotnik, A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol.* 2000; 18: 217-42.

Sallusto, F, Geginat, J & Lanzavecchia, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22: 745-63.

Salmon, JK, Armstrong, CA & Ansel, JC. The skin as an immune organ. *West J Med.* 1994; 160(2): 146-52.

Santamaria-Babí, LF. CLA⁺ T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol.* 2004; 14(1): 13-8.

Santamaria Babí, LF, Moser, R, Perez Soler, MT, Picker, LJ, Blaser, K & Hauser, C. Migration of skin-homing T cells across cytokine-activated human endothelial cell layers involves interaction of the cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA), the very late antigen-4 (VLA-4), and the lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1). *J Immunol.* 1995; 154(4): 1543-50.

Santiago, HC, Oliveira, CF, Santiago, L, Ferraz, FO, de Souza, DG, de-Freitas, LA, et al. Involvement of the chemokine RANTES (CCL5) in resistance to experimental infection with *Leishmania major*. *Infect Immun.* 2004; 72(8): 4918-23.

Schall, TJ, Bacon, K, Camp, RD, Kaspari, JW & Goeddel, DV. Human macrophage inflammatory protein alpha (MIP-1 alpha) and MIP-1 beta chemokines attract distinct populations of lymphocytes. *J Exp Med.* 1993; 177(6): 1821-6.

Schön, MP, Zollner, TM & Boehncke, WH. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. *J Invest Dermatol.* 2003; 121(5): 951-62.

Schriefer, A, Guimarães, LH, Machado, PR, Lessa, M, Lessa, HA, Lago, E, et al. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2009; 15(6): 871-6.

Schrum, S, Probst, P, Fleischer, B & Zipfel, PF. Synthesis of the CC-chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, and RANTES is associated with a type 1 immune response. *J Immunol.* 1996; 157(8): 3598-604.

Scott, P, Artis, D, Uzonna, J & Zaph, C. The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development. *Immunol Rev.* 2004; 201: 318-38.

- Shaw, J. The leishmaniases--survival and expansion in a changing world. A mini-review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102(5): 541-7.
- Sieling, PA, Legaspi, A, Ochoa, MT, Rea, TH & Modlin, RL. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. *Immunology.* 2007; 120(4): 518-25.
- Sigmundsdottir, H, Gudjonsson, JE, Jonsdottir, I, Ludviksson, BR & Valdimarsson, H. The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol.* 2001; 126(2): 365-9.
- Silveira, FT, Blackwell, JM, Ishikawa, EA, Braga, R, Shaw, JJ, Quinnell, RJ, et al. T cell responses to crude and defined leishmanial antigens in patients from the lower Amazon region of Brazil infected with different species of *Leishmania* of the subgenera *Leishmania* and *Viannia*. *Parasite Immunol.* 1998; 20(1): 19-26.
- Souza-Lemos, C, de-Campos, SN, Teva, A, Côrte-Real, S, Fonseca, EC, Porrozzi, R, et al. Dynamics of immune granuloma formation in a *Leishmania braziliensis*-induced self-limiting cutaneous infection in the primate *Macaca mulatta*. *J Pathol.* 2008; 216(3): 375-86.
- Speiser, DE, Colonna, M, Ayyoub, M, Cella, M, Pittet, MJ, Batard, P, et al. The activatory receptor 2B4 is expressed in vivo by human CD8+ effector alpha beta T cells. *J Immunol.* 2001; 167(11): 6165-70.
- Spellberg, B. The cutaneous citadel: a holistic view of skin and immunity. *Life Sci.* 2000; 67(5): 477-502.
- Teixeira, MJ, Fernandes, JD, Teixeira, CR, Andrade, BB, Pompeu, ML, Santana da Silva, J, et al. Distinct *Leishmania braziliensis* isolates induce different paces of chemokine expression patterns. *Infect Immun.* 2005; 73(2): 1191-5.
- Teraki, Y, Miyake, A, Takebayashi, R & Shiohara, T. Homing receptor and chemokine receptor on intraepidermal T cells in psoriasis vulgaris. *Clin Exp Dermatol.* 2004; 29(6): 658-63.
- Teunissen, MBM. Langerhans cells and others skin dendritic cells In: Bos, Jd (Ed.). *Skin immune system: cutaneous immunology and clinical immunodermatology.* Amsterdam: CRC Press, v.1, 2005.
- Tobin, DJ. Biochemistry of human skin--our brain on the outside. *Chem Soc Rev.* 2006; 35(1): 52-67.
- Turetz, ML, Machado, PR, Ko, AI, Alves, F, Bittencourt, A, Almeida, RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002; 186(12): 1829-34.
- Ullman, KS, Northrop, JP, Verweij, CL & Crabtree, GR. Transmission of signals from the T lymphocyte antigen receptor to the genes responsible for cell proliferation and immune function: the missing link. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8: 421-52.
- Valiante, NM & Trinchieri, G. Identification of a novel signal transduction surface molecule on human cytotoxic lymphocytes. *J Exp Med.* 1993; 178(4): 1397-406.
- von Andrian, UH & Mackay, CR. T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med.* 2000; 343(14): 1020-34.

Von Stebut, E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *Eur J Dermatol.* 2007; 17(2): 115-22.

Weber, C, Weber, KS, Klier, C, Gu, S, Wank, R, Horuk, R, et al. Specialized roles of the chemokine receptors CCR1 and CCR5 in the recruitment of monocytes and T(H)1-like/CD45RO(+) T cells. *Blood.* 2001; 97(4): 1144-6.

Zaph, C, Uzonna, J, Beverley, SM & Scott, P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med.* 2004; 10(10): 1104-10.

Zlotnik, A, Yoshie, O & Nomiya, H. The chemokine and chemokine receptor superfamilies and their molecular evolution. *Genome Biol.* 2006; 7(12): 243.