

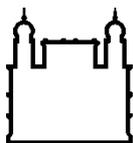
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* Biologia Parasitária

**ESTUDO PROSPECTIVO DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM MANAUS
(AM): FATORES IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO CURSO
TERAPÊUTICO COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE**

JÉSSICA RIBEIRO DE LIMA

Rio de Janeiro
Abril de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

Jéssica Ribeiro de Lima

Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre

Orientador: Dr^a. Alda Maria da Cruz

RIO DE JANEIRO

Abril de 2017

Lima, Jéssica Ribeiro de.

Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente. / Jéssica Ribeiro de Lima. - Rio de Janeiro, 2017.

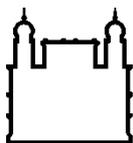
146 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientadora: Alda Maria Da Cruz.

Bibliografia: f. 113-119

1. Leishmaniose tegumentar Americana. 2. terapêutica leishmaniose. 3. Imunologia. 4. Assistência pacientes de Manaus (AM). 5. Acompanhamento terapeutico. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Biologia Parasitária

AUTOR: JÉSSICA RIBEIRO DE LIMA

ESTUDO PROSPECTIVO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM MANAUS (AM): FATORES IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO CURSO TERAPÊUTICO COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE

ORIENTADOR: Dr^a. Alda Maria da Cruz

Aprovada em: 11/04/2017

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Vinicius Cotta de Almeida – Presidente (IOC/FIOCRUZ)

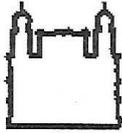
Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho (CPQGM/FIOCRUZ)

Prof.^a Dr^a. Andrea Henriques Pons (IOC/FIOCRUZ)

Prof. Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra (FMT-HVD)

Rio de Janeiro, 11 de abril de 2017.



Ministério da Saúde

Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz

Ata da defesa de dissertação de mestrado em Biologia Parasitária de **Jessica Ribeiro de Lima**, sob orientação da Dr^a. Alda Maria da Cruz. Ao décimo primeiro dia do mês de abril de dois mil e dezessete, realizou-se às quatorze horas, na Sala 4 - Pavilhão Arthur Neiva, o exame da dissertação de mestrado intitulada: **“Estudo prospectivo de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana em Manaus (AM): fatores imunológicos envolvidos no curso terapêutico com antimonial pentavalente”** no programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Ciências - área de concentração: Imunologia e Patogenia, na linha de pesquisa: Imunologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias. A banca examinadora foi constituída pelos Professores: Dr. Vinícius Cotta de Almeida - IOC/FIOCRUZ (Presidente), Dr. Lucas Pedreira de Carvalho - CPqGM/FIOCRUZ- BA, Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos - IOC/FIOCRUZ e como suplentes: Dr^a. Andrea Henriques Pons – IOC/FIOCRUZ e Dr. Jorge Augusto de Oliveira Guerra – FMT-HVD/AM. Após arguir a candidata e considerando que a mesma demonstrou capacidade no trato do tema escolhido e sistematização da apresentação dos dados, a banca examinadora pronunciou-se pela APROVAÇÃO da defesa da dissertação de mestrado. De acordo com o regulamento do Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, a outorga do título de Mestra em Ciências está condicionada à emissão de documento comprobatório de conclusão do curso. Uma vez encerrado o exame, o Coordenador do Programa, Dr. Rafael Maciel de Freitas, assinou a presente ata tomando ciência da decisão dos membros da banca examinadora. Rio de Janeiro, 11 de abril de 2017.

Dr. Vinícius Cotta de Almeida (Presidente da Banca):

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho (Membro da Banca):

Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos (Membro da Banca):

Dr. Rafael Maciel de Freitas (Coordenador do Programa):

Av. Brasil, 4365 Manguinhos Rio de Janeiro RJ Brasil CEP: 21040-360
Contatos: (21) 2562-1201 / 2562-1299 E-mail: atendimento@ioc.fiocruz.br Site: www.fiocruz.br/iocensino

Para minha avó Miriam (em memória)
que sempre acreditou em mim.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao universo, por me trazer um emprego que eu amo logo quando tudo desmoronava ao meu redor. Por fazer com que pessoas maravilhosas como Cláudia Uchoa estivessem na minha vida, e me lembrassem (sempre) de nunca desistir. Pessoas como a família que construí na UFF e no LIC, e que não me deixam esquecer que eu estou exatamente onde eu deveria estar. E estando no caminho que eu deveria estar, devo agradecer àqueles que me ajudaram a finalizar esse trajeto.

Gostaria de agradecer imensamente à minha orientadora Alda Maria da Cruz, por ser um exemplo de pessoa justa, bondosa e simples. Uma das mais brilhante que eu conheci na FIOCRUZ. Eu não conseguiria expressar em palavras o quanto sou grata à Alda, por todo seu conhecimento, paciência, ajuda e confiança. Obrigada por confiar em mim.

Para minha família, pelo suporte logístico e emocional. Vocês foram a base para que eu conseguisse finalizar cada etapa de tudo o que eu me propus a fazer na vida. Agradeço à minha mãe Suely por escutar todas as minhas lamentações, meus discursos de ódio que nada tinham a ver com ela, por olhar meu choro até que ele passasse e zelasse meu sono, desde que eu nasci até hoje. Minha irmã Amanda que se propôs e me ajudar a confeccionar as infinitas tabelas (e depois corrigi-las), nos poucos horários que ela tinha livre, você é maravilhosa. Eu não conseguiria manter a sanidade se não soubesse que ao menos um dia da semana nos encontraríamos no ramal Gramacho para comer pele e falar das nossas vidas acadêmicas. À minha tia Neli, meu primo Igor e meus sobrinhos lindos (JK, Biel e Gio). Também não posso esquecer-me daqueles que não estão mais fisicamente para ver esse momento, mas que foram o cerne de todo o meu caráter e construção pessoal (meu pai Paulo, avó Miriam e Tia Márcia). Para minha família do coração, que sempre esteve ao meu lado: Tia Jane, Tio Eduardo, Janinha e minha *person* Natália. Aos melhores amigos que eu poderia desejar ter na vida: Ana Clara, Alex, Rafael, Natália, Fernanda e minha eterna *roommate* Jacqueline Patrocínio. Só vocês sabem o que passamos nesses dois anos. Agradeço em especial à Ana Clara Esteves pela ajuda no abstract. Um agradecimento especial aos melhores presentes que a FIOCRUZ poderia ter me dado, amigos para uma vida inteira. Obrigada pela

ajuda técnica ao longo do estudo, mas principalmente pelo apoio ao longo de toda a caminhada: Thaize, Victor Neves, Vitor, Alana, Julie e Mariana.

Gostaria de agradecer aos meus amigos da UFF e do HUGG que muito me ajudaram nesse processo. Principalmente Dirlei e Juliana, que sempre estiveram dispostas a fazer meu horário no trabalho quando eu precisava estar na FIOCRUZ para algo inadiável. Agradeço também às pessoas que passaram na minha vida na FIOCRUZ, e que irão marcar para sempre o jeito que eu vejo e faço ciência: Dra. Rosa Pinho, Letícia, Welligton e Periela.

Definitivamente esse mestrado não seria o mesmo sem a minha turma, gostaria de agradecer a cada um de vocês, por toda a troca de conhecimento, momentos bons e Parasitologia II que tivemos rs. Um agradecimento especial à Agatha que me ajudou nos melhores e piores momentos.

Esse projeto só tornou-se realidade, graças aos incessantes esforços de uma equipe única, coesa e participativa a cada etapa do estudo. Gostaria de agradecer imensamente à equipe da FMT-DHV: Dr. Fábio Francesconi e Dra. Giselle Santos por coordenarem os atendimentos aos pacientes, e por estar tão presente em todo o processo de recrutamento, retorno, envio, logística, etc. Cada amostra que chegou ao Rio de Janeiro só foi possível pelo esforço de vocês. Nesse âmbito, um agradecimento especial à Amanda Araújo, por ser nosso “braço direito” em Manaus, desde a coleta, armazenamento e envio. Muito obrigada por toda sua contribuição e por todas as vezes que “salvou” nossas amostras das intercorrências da Pontual. A cada profissional e paciente da FMT-DHV envolvido direta ou indiretamente no projeto, meu muito obrigado.

Definitivamente eu não seria capaz de desenvolver o projeto, se não fosse o enorme esforço do meu orientador Adriano Gomes Silva. Obrigada por toda a paciência que teve comigo, pela grande quantidade de coisas que aprendi com você, e por acreditar que eu conseguiria levar esse projeto. Pode ter certeza, que a grande razão disso veio das nossas discussões sobre leishmaniose e responsabilidade que confiou à mim, apesar de pouco me conhecer. Agradeço à Joanna Reis por toda ajuda nos ELISAS, citometria e principalmente na etapa final de revisão e correção do texto. Também gostaria de agradecer à Rosa, por sempre fazer do laboratório um ambiente onde poderíamos trabalhar, por ajudar sempre na realização dos experimentos e pela paciência quando eu não sabia onde ficava nada no laboratório.

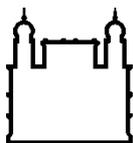
Um agradecimento ao Clébio pela ajuda na logística de envio de amostras AM-RJ, e também à Sabrina pela ajuda na dosagem de imunoglobulinas. Por último, agradecer a cada integrante do LipMed, desde os colegas de estudo até os demais pesquisadores do laboratório que sempre estavam a disposição com ótimas contribuições para o estudo. Vocês foram o apoio e ajuda nos experimentos até tarde da noite e no café do dia. Obrigada a todos. Um agradecimento especial à Maria Fantinatti pela ajuda com a impressão do texto, e todos que se uniram para ajudar na impressão e encadernação.

Gostaria de agradecer a Plataforma de citometria multiusuários do PDTIS, em especial à Mariana Gandinni. Também gostaria de agradecer à Plataforma de citometria – núcleo *cell sorting* do IOC, por permitir a aquisição dos meus experimentos na véspera do natal. Um agradecimento especial ao Dr. Álvaro Bertho, à Thaize Quiroga, Clarissa Cunha e Raquel Ferraz.

Por último, gostaria de agradecer ao revisor Dr. Vinicius Cotta, por toda compreensão, ajuda e contribuições; e a todos os membros da banca pela presença nesse dia tão especial.

"It's a brave new world from the last to the first"

Nothing is impossible. The word itself says
"I'm possible"



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

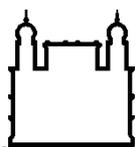
ESTUDO PROSPECTIVO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM MANAUS (AM): FATORES IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO CURSO TERAPÊUTICO COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

Jéssica Ribeiro de Lima

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é uma doença endêmica no Brasil, sendo a região norte a responsável pelo maior número de casos no país. Nesse contexto, destaca-se a grande quantidade de casos registrados em Manaus (AM) principalmente com a descrição de eventos de falha terapêutica ao antimonial pentavalente. Devido a isso, o referido estudo avaliou prospectivamente pacientes de LTA atendidos em centro de referência de Manaus (AM) ao longo de um ano, e traçou estratégias que avaliassem imunologicamente os doentes no curso do tratamento afim de melhor compreender a terapêutica e imunopatogênese da doença. Observamos que a quantidade de anticorpos anti-*Leishmania* produzidos é proporcional ao tempo de evolução da doença, assim como o tratamento não é capaz de modular o eixo humoral para os pacientes avaliados. Quanto às populações de células T avaliadas, as análises mostraram que os pacientes apresentam grande variabilidade na frequência dessas células, não permitindo inferir mais claramente o papel destas. No entanto, a discrepante diferença entre os percentuais de células T de memória efetora ativadas antes do início do tratamento entre os pacientes que obtiveram cura terapêutica e aquele que teve falha terapêutica, sugere um mecanismo de irresponsividade imunológica associada à falha, tal fato é corroborado pela grande quantidade de células T regulatórias produtora de citocinas supressoras visto no paciente que teve falha terapêutica. Em geral as células mononucleares de sangue periférico dos pacientes que obtiveram cura foram capazes de produzir citocinas efetoras no *clearance* parasitário, quando em contato com antígenos de *Leishmania* spp. em grande quantidade na doença ativa seguida de declínio e ligeiro aumento ao término do tratamento, mostrando a importância do tratamento para o controle e ativação da resposta imune. Esse perfil de produção de IFN- γ está restrito aos pacientes que curaram após o tratamento. Dessa forma, o estudo sugere que uma avaliação imunofenotípica possa servir como controle do prognóstico de LTA para estes pacientes.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

PROSPECTIVE STUDY OF PATIENTS WITH AMERICAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS IN MANAUS (AM): IMMUNOLOGICAL FACTORS INVOLVED IN THE THERAPEUTIC COURSE WITH ANTIMONIAL THERAPY

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN PARASITARY BIOLOGY

Jéssica Ribeiro de Lima

Leishmaniasis is an endemic disease in Brazil, which north region has the greatest number of cases reported. In this scenario the city of Manaus plays an important role in leishmaniasis transmission and proper therapeutics, since this city has the higher number of drug failure. Hence, this study was designed to prospectively assess and monitor cutaneous leishmaniasis patients in a reference center in Manaus (AM) during the period of one year, as they were under treatment to gain a better comprehension of how immunologic features affect the therapy. It was described that, after a certain phase of the disease, a difference between the levels of specific antibodies is no longer noticeable, and also the treatment is not capable of modulating the humoral axis. It was shown that different people have a unique profile of circulating memory T cell phenotype and this profile is also observed after antigen stimulation of these cells. However, it's clear that patients who could solve the infection after therapy had higher proportions of T cells activated during the disease's course, which is not true for failure therapy patients, which only had activated T cells after the therapy. It's possible that these patients' cells were less responsive to *Leishmania* antigens. The circulating regulatory T cells producing IL-10 is higher in failure therapy patients, confirming the theory above. When patients' mononuclear cells of peripheral blood (PBMC) were assigned for IFN- γ release assay, it revealed that cured and therapeutic failed patients differ in this cytokine production. The cured patients had higher levels of IFN- γ during active disease, and the treatment can reduce these cytokine levels. On the other hand, the failure patient only had an increase of IFN- γ levels after treatment. Therefore, patients without therapeutic failure have a better capacity of clearance of this parasitic disease.

ÍNDICE

RESUMO	X
ABSTRACT	XI
1 INTRODUÇÃO	21
1.1 As leishmanioses	21
1.2 Agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar Americana – Espécies mais prevalentes na região Norte do Brasil	23
1.3 A importância da <i>L. (Viannia) guyanensis</i> como agente etiológico da LTA na região Norte	25
1.4 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana.....	26
1.4.1 A leishmaniose tegumentar Americana no Brasil	27
1.4.2 A região Norte do Brasil no contexto nacional da leishmaniose tegumentar Americana.....	28
1.5 Diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar Americana	29
1.5.1 Diagnóstico laboratorial: no contexto da região Norte do Brasil.....	30
1.5.2 Tratamento	32
1.6 Imunologia da leishmaniose tegumentar Americana: o balanço imunológico na doença ativa e ao longo do tratamento.....	34
1.6.1 A importância dos linfócitos T e suas subpopulações celulares no curso da leishmaniose tegumentar	34
1.6.2 Células T regulatórias circulantes e a modulação da resposta imunológica	37
1.6.3 O papel de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.....	39
1.6.4 Níveis de imunoglobulinas e suas subclasses na leishmaniose tegumentar Americana.....	40
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo Geral.....	42
2.2 Objetivos Específicos	42
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Aspectos éticos	43

3.2	Casuística.....	43
3.3	Obtenção de isolados de <i>Leishmania</i> spp.	44
3.4	Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP).....	45
3.5	Preparo do antígeno total de <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	47
3.6	Cultivo e estimulação <i>in vitro</i> das células mononucleares de sangue periférico (CMSP).....	48
3.7.1	Marcação intracelular por citometria de fluxo	51
3.7.2	Estratégia geral de análise citofluorimétricas de células T por citometria de fluxo.....	52
3.8	Análise do perfil de citocinas plasmáticas e em sobrenadantes de cultivo.....	56
3.9	Quantificação dos níveis de imunoglobulina G anti- <i>Leishmania</i> spp. por ensaio enzimático (ELISA).....	57
3.10	Análise estatística	58
4	RESULTADOS	59
4.1	Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo	59
4.2	Quantificação de imunoglobulinas anti- <i>Leishmania</i> spp.....	65
4.2.1	Avaliação dos níveis de imunoglobulina G, isotipo IgG-1 e IgG-3 anti- <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> e <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	65
4.2.2	Avaliação dos níveis de imunoglobulina G, isotipo IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania (Viannia) guyanensis</i>	66
4.3	Avaliação dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias em plasma e sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico pós-estímulo antigênico	68
4.4	Características fenotípicas e funcionais de linfócitos T de pacientes de leishmaniose cutânea na doença ativa, durante e após o tratamento anti- <i>Leishmania</i>	72
4.4.1	Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ , em pacientes com leishmaniose cutânea, na doença ativa e ao longo do tratamento anti- <i>Leishmania</i>	73

4.4.2	Frequência de células T (CD3 ⁺) ativadas, e dos fenótipos T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ em função dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR nos pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento.	75
4.4.3	Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ circulantes e após estímulo <i>in vitro</i> ; na doença ativa e ao longo do tratamento em paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.	81
4.4.4	Frequência de células T (CD3 ⁺) ativadas, e dos fenótipos T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ em função dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR no paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento.	83
4.4.5	Frequência de linfócitos T de memória efetora em pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento anti- <i>Leishmania</i>	87
4.5	Frequência de células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻ em perfil de senescência celular (CD57⁺CD27⁻), nos pacientes com leishmaniose cutânea, durante doença ativa e ao longo do tratamento anti-<i>Leishmania</i>.	94
4.5.1	Frequência de células T (CD3 ⁺), T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ em perfil de senescência celular (CD57 ⁺ CD27 ⁻), no paciente com leishmaniose cutânea, que apresentou falha terapêutica; antes, durante a após o tratamento.	96
4.6	Percentual de células T regulatórias em pacientes com acompanhamento terapêutico completo.	98
5	DISCUSSÃO	100
5.1	Casuística e resultados obtidos através das amostras biológicas.	100
5.2	Resposta imune humoral mediada por IgG1 e IgG3 anti- <i>Leishmania</i>	101
5.3	Resposta imune efetora avaliada pelo IFN- γ plasmático e pela liberação de IFN- γ após estimulação <i>in vitro</i>	102
5.4	Perfis imunofenotípicos de células T.	105

5.5	Grau de ativação celular e senescência.....	106
5.6	Participação de outros tipos celulares e função efetora no acompanhamento terapêutico de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana (anexo).....	109
6	CONCLUSÕES	111
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
8	APÊNDICES E/OU ANEXOS	120
8.1	Parecer substanciado do Comitê de Ética em pesquisa.....	120
8.2	Frequência de células NK e NKT produtoras de IFN- γ , TGF- β 1 ou perforina em pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento – resultados preliminares	121
8.3	Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e CD3 ⁺ CD4 ⁻ produtoras de IFN- γ , TGF- β 1 ou perforina em paciente com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento – resultados preliminares.	122
8.4	Frequência de linfócitos T naive; de memória (central e efetora) e TEMRA em pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento anti-Leishmania.	124
8.5	Frequência de células T ativadas (CD38+HLA-DR-, CD38+HLA-DR+ e CD38- HLA-DR+) nos perfis celulares de memória (memória central, memória efetora, Tnaive e TEMRA+) de pacientes com leishmaniose cutânea durante doença ativa e ao longo do tratamento.....	132
8.5.1	Frequência de linfócitos T naive; de memória (central e efetora) e TEMRA em paciente com leishmaniose cutânea e que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento anti-Leishmania.	140
8.6	Frequência de células T ativadas (CD38+HLA-DR-, CD38+HLA-DR+ e CD38- HLA-DR+) nos perfis celulares de memória (memória central, memória efetora, T <i>naive</i> e TEMRA) de paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; durante doença ativa e ao longo do tratamento.....	143

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa mundial mostrando a incidência de LTA em 2013. Fonte: OMS.	27
Figura 2- Distribuição de casos de LTA no Brasil por região em 2015. Fonte: SINAN-MS.....	29
Figura 3- Estratégia de análise da viabilidade celular utilizando o kit Live/Dead®.....	53
Figura 4 - Estratégia geral de análise dos fenótipos celulares, de memória, ativação e senescência.....	54
Figura 5 - Estratégia de análise da frequência de Tregs.....	56
Figura 6: Análise da associação entre da quantificação de imunoglobulinas em placas de ELISA sensibilizadas com antígenos de <i>Leishmania (Viannia)</i> <i>guyanensis</i> (Lguy) e anti- <i>L. braziliensis</i> (Lbra).....	65
Figura 7: Quantificação de imunoglobulinas (IgG1 e IgG3) a <i>anti- Leishmania</i> <i>(Viannia) guyanensis</i> de pacientes de leishmaniose cutânea avaliados antes, durante e depois do tratamento <i>anti-Leishmania</i>	67
Figura 8 - Produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea antes do tratamento	69
Figura 9 - Produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea antes (AT), durante (MT) e após o fim do tratamento (FT).....	71
Figura 10: Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ circulantes e após cultivo <i>in vitro</i> em pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento.....	74
Figura 11: Frequência de HLA-DR em células T (CD3 ⁺), T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ dos pacientes com leishmaniose cutânea após estimulação <i>in vitro</i> ; em doença ativa e ao longo do tratamento.	77
Figura 12: Frequência de CD69 em células T (CD3 ⁺), T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ dos pacientes com leishmaniose cutânea após estimulação <i>in vitro</i> ; em doença ativa e ao longo do tratamento.	79
Figura 13 - Frequência de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ circulantes e após cultivo <i>in vitro</i> ; antes, durante e após tratamento de paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha ao antimonial pentavalente.	82

Figura 14: Frequência da expressão do receptor HLA-DR circulante (<i>ex vivo</i>) e <i>in vitro</i> após estímulo antigênico em células T e seus fenótipos T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ no paciente que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento.	84
Figura 15 Frequência da expressão do receptor CD69 circulantes (<i>ex vivo</i>) e <i>in vitro</i> após estímulo antigênico em células T e seus fenótipos T CD4 ⁺ e T CD4 ⁻ no paciente que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento.....	86
Figura 16: Frequência de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ de memória efetora nos indivíduos sadios de área endêmica após cultivo com antígenos parasitários específicos.....	88
Figura 17: Frequência <i>in vitro</i> de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁺ de memória efetora em pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento anti- <i>Leishmania</i>	90
Figura 18: Frequência <i>in vitro</i> de linfócitos T CD3 ⁺ CD4 ⁻ de memória efetora em pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento anti- <i>Leishmania</i>	92
Figura 19: Frequência de células senescentes em linfócitos T CD3 ⁺ , T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ circulantes (<i>ex vivo</i>), e frente a estímulos antigênicos em pacientes com leishmaniose cutânea; antes, durante e após o tratamento.....	95
Figura 20: Frequência de células senescentes em linfócitos T CD3 ⁺ , T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ circulantes (<i>ex vivo</i>), e frente a estímulos antigênicos em paciente de leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; antes, durante e após o tratamento.	97
Figura 21 - Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ reguladores (Treg) produtores de IL-10 circulantes no sangue de pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento.	99
Figura 22 - Frequência de células NK (CD3 ⁻ CD4 ⁻ CD56 ⁺) e NKT (CD3 ⁺ CD4 ⁻ CD56 ⁺) produtoras de IFN- γ , TGF- β 1 e perforina circulantes no sangue de um paciente com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento	122
Figura 23 – Frequência do fenótipo de células T CD3 ⁺ CD4 ⁺ e T CD3 ⁺ CD4 ⁻ produtoras de IFN- γ , TGF- β 1 e perforina circulantes em sangue de um paciente (014/16) com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento.	123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas e demográficas dos pacientes de leishmaniose cutânea incluídos no estudo.	61
Tabela 2: Grau de recuperação e viabilidade de células mononucleares de sangue periférico obtidas de sangue coletado em tubo CPT®.....	63
Tabela 3: Frequência dos linfócitos T de memória circulantes e após estímulo antigênico em indivíduos sadios de área endêmica.	125
Tabela 4: Frequência das células T de memória circulantes <i>ex vivo</i> , e após estímulo antigênico (<i>in vitro</i>), antes do início do tratamento para os pacientes com leishmaniose cutânea.....	126
Tabela 5: Frequência das células T de memória circulantes <i>ex vivo</i> , e após estímulo antigênico (<i>in vitro</i>), durante o tratamento anti- Leishmania para os pacientes com leishmaniose cutânea.	128
Tabela 6: Frequência das células T de memória circulantes <i>ex vivo</i> , e após estímulo antigênico (<i>in vitro</i>), no fim do tratamento anti- Leishmania para os pacientes com leishmaniose cutânea.	130
Tabela 7: Percentual dos perfis funcionais de células T <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> , e seus perfis de ativação celular antes do início do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo.....	132
Tabela 8: Percentual dos perfis de memória de células T <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> , e seus perfis de ativação celular no meio do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo.....	136
Tabela 9: Percentual dos perfis de memória de células T <i>ex vivo</i> e <i>in vitro</i> , e seus perfis de ativação celular no final do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo.....	138
Tabela 10: Frequência das células T de memória circulantes <i>ex vivo</i> , e após estímulo antigênico (<i>in vitro</i>); antes, durante e após o tratamento para paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.	141
Tabela 11: Avaliação do aumento de frequência nas células T de memória após estímulo antigênico; em paciente de leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; em doença ativa e ao longo do tratamento.	142
Tabela 12: Frequência de células T circulantes (<i>ex vivo</i>) e após estímulo antigênico <i>in vitro</i> ; na doença ativa e ao longo do tratamento, de acordo com o	

perfil de ativação celular definido por HLA-DR e CD38; para o paciente de leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.	144
Tabela 13: Frequência de aumento de determinado perfil de ativação de célula T após estímulo <i>in vitro</i> ; antes, durante e após tratamento de paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.	145

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
IL-10	Interleucina-10
IL-6	Interleucina-6
IFN- γ	Interferon <i>gama</i>
Rpm	Rotação por minuto
Igs	Imunoglobulinas
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
CD62L	ligante de CD62
CLA	Antígeno leucocitário humano

1 INTRODUÇÃO

1.1 As leishmanioses

As leishmanioses são causadas por protozoários do gênero *Leishmania* spp., família Tripanossomatidae, ordem Kinetoplastida. O protozoário *Leishmania* spp. foi descrito pela primeira vez por Ronald Ross em 1903 que, juntamente aos achados microscópicos de William Leishman, que fez a observação de estruturas ovais em células de baço e sangue proveniente de um paciente da Índia, sugeriu a descrição de um novo agente parasitário que foi chamado na época de *Leishmania donovani*.

Desde o primeiro relato do gênero, muitas espécies têm sido descritas, sendo o gênero *Leishmania* spp. um dos maiores quanto à variedade de espécies que apresenta. De forma geral, o protozoário *Leishmania* spp. é o agente etiológico das leishmanioses, que englobam as formas visceral e tegumentar.

As leishmanioses são antropozoonoses transmitidas pelo flebotomíneo, seu principal vetor. A transmissão para o homem envolve complexos ciclos silvestres, secundários ou peridomésticos, já que algumas espécies desse gênero são mais facilmente adaptadas ao ambiente modificado pelo homem ou são capazes de infectar uma larga variedade de mamíferos, dentre esses animais domésticos que agem como reservatórios da doença.

O protozoário *Leishmania* spp. apresenta ciclo de desenvolvimento heteroxeno, com a presença de um hospedeiro invertebrado e outro vertebrado. Os insetos dípteros, conhecidos como flebotomíneo, são os vetores das leishmanioses e suas principais características são o tamanho pequeno (2-3 mm), a coloração no tom palha e corpo recoberto por grande quantidade de pelos. No Brasil são encontradas diferentes espécies do gênero *Lutzomyia* spp., *Nyssomyia* spp. e *Migonemyia* spp. associadas à transmissão de diversas espécies de *Leishmania* spp. As fêmeas de flebotomíneo alimentam-se de sangue e, durante o repasto sanguíneo, acabam ingerindo as formas amastigotas que são infectantes para o vetor. Dessa forma explica-se por que a manutenção do ciclo do protozoário *Leishmania* spp. necessita não só de vetores, mas também fontes de infecção para o mesmo. Após a ingestão dos amastigotas, estes irão sofrer transformações fenotípicas e morfológicas ao longo do intestino do vetor transformando-se em promastigotas. As formas promastigotas são móveis, com flagelo livre e após o

processo de metaciclo-gênese migram para a cavidade bucal e glândulas salivares do vetor já como promastigotas metacíclicas. Em um próximo repasto sanguíneo, a fêmea irá inocular tais formas no hospedeiro vertebrado, juntamente com sua saliva. As promastigotas metacíclicas vão para o interior de macrófagos e células de Langerhans, e no interior destas células do sistema fagocítico-mononuclear se diferenciarão em formas amastigotas, capazes de multiplicação por divisão binária simples no interior do vacúolo parasitóforo, formado pela célula infectada para conter e eliminar o parasito. Após sucessivos ciclos de divisão, as leishmânias rompem a célula parasitada, sendo liberadas para o meio extracelular, onde serão fagocitadas por outras células do sistema imune, mantendo a infecção e desenvolvimento da doença, assim como podem ser ingeridas por outro flebotomíneo, infectando-o e perpetuando o ciclo (Peçanha-Brazil & Brazil, 2014).

A leishmaniose visceral ou calazar é causada por *L. (L.) infantum* e apresenta tropismo pelas células do sistema fagocítico-mononuclear de fígado, baço, medula óssea e linfonodos. É caracterizada como uma doença sistêmica de ocorrência mundial e é a forma mais grave das leishmanioses descrita, levando a quadros crônicos de hepato-esplenomegalia e anemia, que por vezes culmina em óbito, principalmente em crianças e indivíduos imunossuprimidos.

A forma tegumentar da leishmaniose pode ser causada por diversas espécies de *Leishmania* spp. e, assim, variadas manifestações clínicas podem ser observadas no homem. As espécies dermatrópicas, multiplicam-se intensamente em vacúolos parasitários de macrófagos da derme e células de Langerhans, podendo ainda causar lesões em epitélio pavimentoso não queratinizado (mucosas), o que é conhecido como manifestações mucocutâneas da leishmaniose tegumentar.

A leishmaniose tegumentar Americana (LTA) ou do Novo Mundo tem como agentes etiológicos espécies do subgênero *Viannia* e *Leishmania* e uma de suas classificações proposta segue por base características clínicas da doença. Dessa forma, pode-se falar em leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM).

A LC é a forma mais frequente, e é caracterizada pela formação de uma pápula eritematosa, geralmente no local da picada do vetor. Esta pápula pode evoluir para uma lesão ulcerada única, que é tipicamente indolor, arredondada, de tamanho variável e com bordas bem delimitadas, elevadas e eritematosas com fundo granuloso de intenso infiltrado celular e necrose central. Também são descritas formas não ulcerosas (verrucosas). As principais espécies no Brasil são:

L. (Viannia) braziliensis, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

A LM é considerada uma forma secundária a uma infecção primária e a principal espécie associada é a *L. (V.) braziliensis*. Mais recentemente, a *L. (V.) guyanensis* vem sendo implicada como agente etiológico desta forma clínica na região amazônica (Guerra et al. 2011). A LM se apresenta com lesões ulceradas, eritematosas, podendo ser úlcero-vegetantes, acometendo principalmente a mucosa oronasofaríngea, com comprometimento do septo cartilaginoso e demais áreas associadas.

Outras formas clínicas da LTA incluem a leishmaniose mucocutânea, com lesões mucosas concomitantes às cutâneas, a leishmaniose cutâneo-difusa e a leishmaniose disseminada (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

1.2 Agentes etiológicos da leishmaniose tegumentar Americana – Espécies mais prevalentes na região Norte do Brasil

Nas Américas, são atualmente reconhecidas 11 espécies dermatrópicas de *Leishmania* spp. causadoras de doença humana e oito espécies descritas somente em animais. Os complexos fenotípicos de *Leishmania* spp. foram agrupados em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*, de acordo com a localização das formas promastigotas ao longo do trato digestivo do inseto vetor, onde as espécies do subgênero *Leishmania* aderem ao epitélio do intestino anterior do flebotomíneo, e aquelas do subgênero *Viannia* ficam aderidas no epitélio do intestino posterior do vetor no curso de seu desenvolvimento no hospedeiro invertebrado (Rey, Luís 2008).

No Brasil já foram identificadas sete espécies, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (Ministério da Saúde, 2013).

A região Norte do Brasil concentra fatores importantes que explicam a alta incidência de LTA nesta localidade (Guerra et al. 2015) como: a constante pluvialidade, densidade de vetores competentes e existência de animais reservatórios, e principalmente devido à proximidade do homem ao ecótopo florestal de circulação natural do parasito. Logo, a região Norte é estratégica em estudos de

LTA principalmente aqueles que busquem correlacionar fatores do hospedeiro ao curso clínico da doença. As taxas de incidência elevadas de LTA associada com a variedade de espécies encontradas na região Amazônica são fatores importantes de serem conhecidos para guiar medidas de controle de endemias, assim como no melhor emprego terapêutico para cada caso, que pode variar de acordo com a espécie parasitária em questão, como abordado na seção 1.5.2 – Tratamento.

Em 2006, Da-Silva e colaboradores estudaram 50 indivíduos de um município do Acre, e utilizando a técnica de PCR-RFLP, demonstraram uma grande variedade de espécies dentre os trinta isolados de *Leishmania* spp. analisados, dentre estes 16 *L. (V.) braziliensis*; 12 *L. (V.) lainsoni*; um *L. (V.) guyanensis* e um como possível *L. (V.) naiffi* ou *L. (V.) lainsoni* (Da-Silva et al. 2006). O estudo levanta hipóteses que explicariam a quantidade inesperada de isolados *L. (V.) lainsoni* encontrada, como por exemplo, a proximidade do município de estudo ao Peru e Bolívia, países endêmicos para LTA causada por tal espécie. A diferença no quantitativo das espécies observadas entre os estudos disponíveis pode ser explicada desde o tamanho da casuística, até os métodos de caracterização da espécie parasitária utilizados.

A descrição de maior frequência de espécies de *Leishmania* spp. na região Amazônica também tem sido relatada ultimamente. Um exemplo é a presença, antes tida como rara, de *L. (Viannia) naiffi* em 8 dentre os trinta isolados obtidos de pacientes da região de Manaus entre 2011 e 2013 (Fagundes-Silva et al. 2015). Tal fato ratifica a importância de manutenção de estudos epidemiológicos na região norte do Brasil.

Vale salientar que nesta área há uma intensa co-circulação de diversas espécies parasitárias de forma que infecções mistas são por vezes observadas. A importância da identificação dessas infecções mistas está diretamente associada à técnica diagnóstica aplicada, como exemplo podemos citar o estudo de Coelho et al. 2011, que utilizou três técnicas distintas para identificação de 209 amostras de pacientes atendidos em Manaus. As técnicas utilizadas foram a clássica identificação por meio de cultivo com posterior eletroforese por isoenzimas, imunofluorescência indireta com anticorpos monoclonais e de biologia molecular (PCR). Nesse estudo, houve a positividade para *L. (V.) guyanensis* em 73,2% das amostras, e foi identificada infecção mista de *L. (V.) guyanensis/ L. (V.) braziliensis* em 4.8% das amostras já previamente positivas para *L. (V.) guyanensis*.

É importante salientar que epidemiologicamente, a espécie de *Leishmania* spp. mais presente como agente da LTA em Manaus é a *L. (Viannia) guyanensis* (Espir et al. 2016, Romero et al. 2001), por isso o próximo tópico irá abordar aspectos epidemiológicos e clínicos da LTA causada por tal espécie.

1.3 A importância da *L. (Viannia) guyanensis* como agente etiológico da LTA na região Norte

A LC causada por *L. (Viannia) guyanensis* é conhecida como *pian bois* na Guiana Francesa, e “*boschyaws*” no Suriname (Rey 2002), e em geral apresenta múltiplas lesões em regiões variadas do corpo. Supõe-se que tal manifestação seja devido a várias picadas simultâneas do vetor, já que esta espécie está mais envolvida na transmissão associada ao ciclo silvestre, onde o homem acaba sendo o hospedeiro acidental ao entrar em contato com ecótopo natural de circulação do parasito (rev. Coutinho-Azaredo & Mendonça, 2014). Essa estreita interação entre o homem e o ambiente florestal é muito frequente na região Norte, devido ao fato dessa região atrair grande quantitativo de pessoas para trabalhar em atividades agrícolas ou que envolvam a extração de matéria prima da mata. De fato, Espir e colaboradores avaliaram trinta e oito pacientes com LTA da região Norte do Brasil entre 2010 e 2011, encontrando positividade para *L. (Viannia) guyanensis* em 77,5% dos isolados. Apenas dois destes pacientes não tinham ocupação laboriosa diretamente associada à mata (Espir et al. 2016), ratificando o perfil epidemiológico supracitado.

Outros estudos também têm demonstrado a maior incidência de *L. (V.) guyanensis* utilizando técnicas de biologia molecular como a detecção positiva do parasito diretamente do fragmento de lesão retirado pela biópsia, como mostrou Benicio et al. (2015) que trabalhou com 172 casos de LTA atendidos em FMT-HVD entre 2008 e 2010. Nesse estudo a técnica de PCR-RFLP para o *locus* gênico HSP-70 permitiu a diferenciação entre *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis*, com positividade de 94% para a primeira espécie citada.

Estudos realizados com uma casuística de quarenta e seis pacientes atendidos em Manaus (AM) entre 1992 e 2006, reforçaram o que fora brevemente descrito por Rey, (2002) que é a capacidade de *L. (V.) guyanensis* causar manifestação mucosa. Neste trabalho, Guerra e colaboradores mostraram que 35% dos pacientes apresentavam lesões predominantemente na mucosa nasal, mas

também em orofaringe e laringe (Guerra et al. 2011). Uma das hipóteses que explicam a ocorrência de lesões mucosas em LTA causadas por *L. (V.) guyanensis*, levantada pelo estudo, seria o abandono do tratamento de LC ou a irregularidade do mesmo. No entanto, questões que envolvam o *status* imunológico do paciente também foram discutidas como causadoras dessa associação ainda pouco relatada (Coutinho-Azereado & Mendonça, 2014).

1.4 Epidemiologia da leishmaniose tegumentar Americana

A leishmaniose é considerada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) uma doença tropical negligenciada (DTN). As DTN são propostas de acordo com aspectos inerentes à emergência da doença, medidas de controle e disponibilidade de tratamento. De acordo com o programa de doenças tropicais negligenciadas da OMS, entre 2009 e 2013 foram relatados mais de um milhão de casos de leishmaniose cutânea (LC) em todo o mundo.

Um estudo também da OMS, que avaliou quatro anos (2007-2010), estima de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de LC por ano em todo o mundo. O Brasil apresenta certo destaque nesse cenário, pois está entre os dez países com maiores taxas de LC. Juntos, estes dez países são responsáveis por aproximadamente 70-75% dos casos de LC descritos (Alvar et al. 2012).

Recentemente, foi disponibilizado pelo programa de doenças tropicais negligenciadas da OMS um *report* epidemiológico semanal que engloba dados do ano de 2013 e 2014. Nesse levantamento foi observado que em 2014 houve 153.027 casos de LC (novos e recidivas), apenas em países endêmicos para LC.

Os dados citados mostram a grande importância epidemiológica da leishmaniose cutânea no cenário global, ratificando estudos sobre essa doença.

A Figura 1, do centro de controle de doenças tropicais negligenciadas da OMS mostra as taxas de incidência da LC mundial de acordo com os países endêmicos ou não para tal doença em 2013.

Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2013

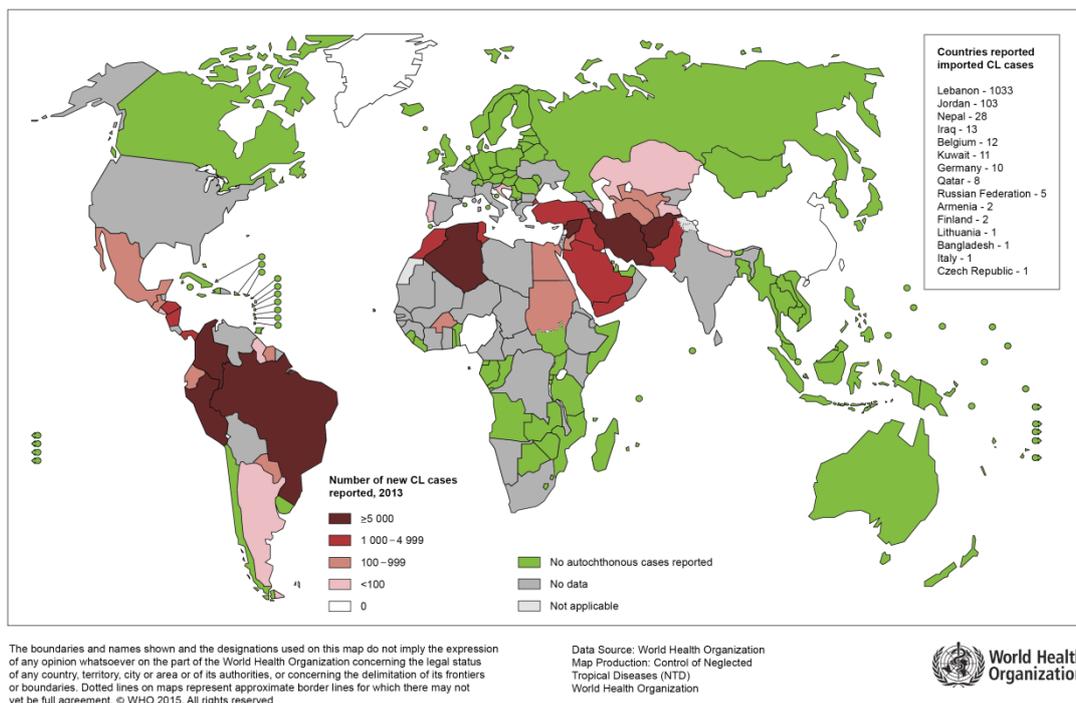


Figura 1: Mapa mundial mostrando a incidência de LTA em 2013. Fonte: OMS

1.4.1 A leishmaniose tegumentar Americana no Brasil

O Brasil é considerado um dos principais países endêmicos para LC (Alvar et al. 2012) e foi recentemente apontado como o único país que é altamente endêmico tanto para leishmaniose tegumentar quanto para a forma visceral. Esse dado refirma o país como um dos mais importantes para fundamentar medidas de controle das leishmanioses, principalmente aquelas voltadas para novas metodologias diagnósticas, desenvolvimento de fármacos e vacinas, controle ecológico de vetores etc. O levantamento da OMS de LC entre 2013-2014 mostrou que, neste último ano, o Brasil apresentou taxa de incidência da LC de 1,46 para 10,000 habitantes de área endêmica, e o assustador índice de que 70% da população brasileira estaria em risco de infecção por parasitos do gênero *Leishmania* spp., levando ao quadro cutâneo da doença.

Tais informações, apesar de altamente preocupantes, já haviam sido observadas, por exemplo, em estudo de Lindoso e colaboradores que descreve a LTA como uma das principais doenças negligenciadas do Brasil, já que se apresenta em todas as regiões do país e tem sua expansão territorial associada principalmente a mudanças ambientais relacionadas à urbanização descontrolada e migração

populacional (Lindoso & Lindoso, 2009). Martins-Melo e colaboradores (2016) mostraram através do levantamento de 324 certidões de óbito (uma de cada estado por ano) entre 2000 e 2011, que as leishmanioses ocupam o terceiro lugar dentre as doenças tropicais negligenciadas que mais matam no Brasil, com uma taxa de mortalidade de 4,5%, atribuída, sobretudo à LV. Esse estudo também foi capaz de mostrar informações epidemiológicas importantes sobre a leishmaniose como, por exemplo, que mais de 60% dos óbitos por essa doença eram de indivíduos do sexo masculino com média de idade de 30,7 anos (Martins-Melo et al. 2016).

De acordo com o Sistema de Informação e Notificação em Agravos de Saúde (SINAN) do Ministério da Saúde, em 2015 foram registrados 20.187 casos de LC em território nacional com apenas nove óbitos confirmados no mesmo período.

1.4.2 A região Norte do Brasil no contexto nacional da leishmaniose tegumentar Americana

A região Norte do país compreende grande parte da região Amazônica em território nacional. Esta localidade apresenta fatores ambientais favoráveis ao desenvolvimento e manutenção de um ciclo silvestre e peridomiciliar de transmissão da LTA: periodicidade de chuvas, presença do vetor, abundância de animais silvestres reservatórios, assim como aqueles sinantrópicos/domesticados, a presença cada vez mais intensa do homem no ambiente de floresta, principalmente devido às atividades laborais associadas à agricultura e extração de matéria prima, além de típicos assentamentos de trabalhadores sazonais e militares em patrulha de fronteira (Guerra et al. 2015). De fato, Guerra e colaboradores demonstraram que a região de Manaus concentrava 54,2% dos casos de LTA de todo o Amazonas, mas que provavelmente esta alta prevalência de LTA em Manaus seja devido à migração dos indivíduos infectados para a capital em busca de diagnóstico e tratamento. Figueira e colaboradores (2014) mostraram em estudo com 90 pacientes com LTA, que 95% deles eram originários do município de Rio Preto da Eva, por onde passa a rodovia AM-010 que liga Manaus ao município de Itacoatiara, ou seja, uma região de grande fluxo de trabalhadores e que apresenta alguns assentamentos de moradia próxima à rodovia, esses casos em sua maioria buscam atendimento na Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado em Manaus, que notifica os casos de LTA. Esse mesmo estudo demonstrou a infecção de crianças por *L. (V.) guyanensis* no Assentamento Iporá próximo à rodovia, ratificando a interação do homem com o

ambiente de mata já que foi relatado que as crianças auxiliavam o pai na caça e agricultura (Figueira et al. 2014).

De acordo com o SINAN dos 20.187 casos de LTA no Brasil em 2015, 9.272 (45,9%) estavam presentes na região Norte. A Figura 2 exemplifica graficamente a distribuição da LTA em 2015 no Brasil por regiões. No estado do Amazonas foram detectados 1.713 casos, sendo 1.660 da forma cutânea localizada no mesmo período supracitado.

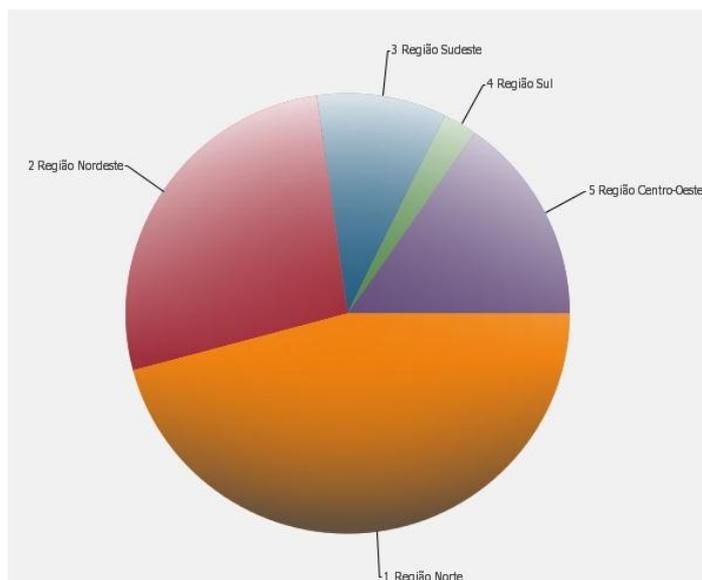


Figura 2- Distribuição de casos de LTA no Brasil por região em 2015. Fonte: SINAN-MS

1.5 Diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar Americana

Apesar da grande variedade de agentes etiológicos já descritos para a LTA, o diagnóstico em áreas endêmicas é primariamente clínico, sendo utilizadas outras técnicas como suporte ao diagnóstico clínico, já que nem todas as regiões contêm infraestrutura para dispor de demais metodologias. Dessa forma, o diagnóstico clínico da LTA através da observação da lesão é de extrema importância, pois este irá direcionar as demais avaliações laboratoriais para a confirmação da doença. Vale salientar que a LTA necessita de diagnóstico diferencial de uma série de enfermidades tais como: paracoccidiodomicose, carcinoma epidermóide, carcinoma basocelular, linfomas, rinofima, rinosporidiose, entomoftoromicose, hanseníase, sífilis terciária, tuberculose cutânea, perfuração septal traumática ou por uso de drogas, rinite alérgica, sinusite, sarcoidose e granulomatose de Wegner (Ministério da Saúde, 2013).

1.5.1 Diagnóstico laboratorial: no contexto da região Norte do Brasil

O Ministério da Saúde recomenda que o “padrão-ouro” para o diagnóstico das leishmanioses é o encontro do parasita em material de lesão de um caso suspeito. As principais técnicas para visualização direta de *Leishmania* spp. são: escarificação da borda da lesão, aspiração de fundo granuloso com agulha fina e *imprinting*, seguidos de confecção de lâmina e coloração por Giemsa ou panótico, que propiciam a visualização das estruturas ovais de coloração azulada com cinetoplasto (De-Vries et al. 2015). De fato, o exame parasitológico é o mais empregado principalmente em áreas endêmicas e particularmente na região Amazônica apresenta positividade elevada. Figueira e colaboradores observaram em 90 pacientes com LTA, dentre estes 81 (90%) tiveram exame direto positivo (Figueira et al. 2014).

O isolamento e cultivo *in vitro*, ou cultura para *Leishmania* spp. é um método difícil de ser realizado em áreas endêmicas, onde geralmente não há suporte laboratorial para seu desenvolvimento. O cultivo em meio NNN – Neal, Novy e Nicolle (ágar sangue modificado) entre 24°C e 26°C, permitem a visualização deste parasito em meios líquidos apropriados, e que permite também produzir uma massa parasitária necessária para a identificação da espécie pelo padrão de zimodemas apresentado. Os vários recursos necessários para o cultivo desse parasito, juntamente com a alta taxa de contaminação do cultivo com crescimento bacteriano e fúngico, fazem com que a sensibilidade desse exame seja reduzida em alguns estudos abordados (Ministério da Saúde, 2013).

Alguns exames diagnósticos que avaliam o potencial imunológico de resposta do hospedeiro ao parasito têm sido aplicados em estudos epidemiológicos em regiões afastadas e áreas endêmicas, e apesar de certas limitações, são responsáveis por grande parte do que existe de descrito principalmente quando se busca caracterizar as leishmanioses dentro de seu espectro clínico de manifestação (Souza et al. 2013). É o caso da intradermoreação de Montenegro que avalia a resposta de hipersensibilidade tardia, uma resposta imune celular, do paciente frente ao antígeno leishmanina. O exame geralmente é negativo em infecções recentes, mas sua grande importância em área endêmica é a detecção de infecções subclínicas, com a positivação do teste, mas sem a presença da lesão (Paiva-Cavalcanti et al. 2015). Foi visto por Espir e colaboradores que, dos 38 pacientes com LTA recrutados para estudo em Rio Preto da Eva, a reação de Montenegro mostrou-se positiva em 60% dos casos; no entanto, onze pacientes não retornaram

após 48 horas para a realização da leitura do teste, o que age como um interferente diminuindo a sensibilidade do exame (Espir et al. 2016).

Exames que avaliam a resposta humoral do hospedeiro também são importantes ferramentas diagnósticas da LTA. É o caso da imunofluorescência indireta e o ensaio colorimétrico associado à enzima (ELISA), onde a detecção de imunoglobulinas anti-*Leishmania* spp. é avaliada, assim como os títulos destas. Uma das limitações para a utilização da sorologia no diagnóstico da LTA é que a infecção por *L. braziliensis* induz uma baixa produção de anticorpos, principalmente nas fases mais tardias (acima de 3 meses). As estratégias de utilização de antígenos de *Leishmania* spp. que possam ser melhor reconhecidos e a detecção de subclasses têm aumentado a performance da sorologia (Gomes-Silva et al. 2008), inclusive com o potencial de ser utilizada para avaliar o prognóstico da doença (Fagundes-Silva et al. 2013). Entretanto, a resposta humoral na infecção por *L. guyanensis* é ainda mais baixa que na por *L. braziliensis* (Romero et al. 2001, Matta et al. 2009)

Os ensaios imunológicos citados são amplamente utilizados e são alvo da indústria no desenvolvimento de novos antígenos e confecção de plataformas cada vez mais sensíveis, específicas e aplicáveis ao campo. No entanto, esta última tem sido a principal limitação do exame em áreas endêmicas, assim como as reações cruzadas de anticorpos anti-*Leishmania* spp. com anticorpos de outros tripanossomatídeos e até fungos (Paiva-Cavalcanti et al. 2015). É importante citar estudos como o de Costa e colaboradores (2016), que avaliaram amostras de soro de 130 indivíduos divididos nos grupos: residentes de área endêmica; não residentes de área endêmica; pacientes de Doença de Chagas; pacientes com leishmaniose tegumentar localizada e mucosa, além daqueles com leishmaniose visceral. Eles foram capazes de avaliar por estudos moleculares, peptídeos do parasito que apresentavam grande especificidade antigênica no nível de complexo de espécies, propondo seis novos peptídeos a serem usados em plataformas de diagnóstico por ELISA (Costa et al. 2016).

Várias ferramentas de diagnóstico molecular têm sido propostas e validadas para LTA. No entanto, a dificuldade de implementação dessa tecnologia nas áreas endêmicas fazem com que esse tipo de diagnóstico fique restrito às pesquisas acadêmicas, não sendo implementada de fato como metodologia de diagnóstico disponível (Espir et al. 2016).

1.5.2 Tratamento

O tratamento da LTA é padronizado para todas as formas clínicas. A principal droga de escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}): estibogluconato de sódio e o antimoniato de N-metilglucamina, sendo este último o único comercializado no Brasil. Este é produzido e distribuído pela rede de saúde pública do Ministério da Saúde desde 2007, sob o nome comercial de Glucantime® (Sanofi-Aventis). O tempo de duração do tratamento é de no mínimo vinte dias (Ministério da Saúde, 2013).

O tratamento da LTA tem como objetivo a cicatrização das lesões cutâneas assim como a prevenção de acometimento de mucosas. No entanto como a LTA apresenta um espectro clínico amplo, por vezes é necessário adequar o esquema terapêutico à realidade do paciente, levando-se em consideração além da forma clínica, aspectos epidemiológicos como idade, presença de doenças de base e questões de ordem socioeconômica. Como a formulação da droga é de administração parenteral, faz-se necessário itens para administração da mesma e acompanhamento profissional ao longo de todo o tratamento (Schulbach & Conceição-Silva, 2014). Define-se que o paciente apresenta falha terapêutica quando o mesmo é submetido a dois esquemas terapêuticos regulares sem apresentar remissão clínica (Ministério da Saúde, 2013).

A terapia com antimonial pentavalente para tratamento da leishmaniose no Brasil é padronizada em 15-20 mg Sb^{5+} /kg/dia (Ministério da Saúde, 2013).

O mecanismo de ação do antimonial pentavalente (Sb^{5+}) continua sendo foco de diversos estudos, no entanto, são propostas duas principais vias de ação dessa droga. É sabido que o Sb^{5+} é administrado como pró-fármaco, ou seja, precisa sofrer processos metabólicos *in vivo* que permitam a sua redução a Sb^{3+} , que é a forma leishmanicida do fármaco. Alguns complexos proteicos da célula parasitada pela *Leishmania* spp. apresentam componentes capazes de promover essa redução. É o caso dos grupamentos tiol presentes na membrana de lisossomos, e de fato já fora verificado que a redução da droga ocorre de forma mais favorável num ambiente de pH reduzido e de maior temperatura; isso poderia explicar porque a droga tem ação apenas sobre as formas amastigotas (intracelulares); o próprio parasito apresenta grupamentos proteicos em sua membrana que também permitem a redução de Sb^{5+} (Frézard et al. 2009). A forma Sb^{3+} por sua vez irá interagir com enzimas: aquelas envolvidas na redução do estado oxidativo da célula, aumentando o potencial de

“estresse” celular acarretando em morte da célula por apoptose; ou a outras responsáveis pela via glicolítica do parasito tendo ação direta sobre o mesmo.

O antimonial pentavalente pode apresentar efeitos nefrotóxicos e hepatóxicos, além de ser considerado um possível agente teratogênico, logo, não é administrado às mulheres grávidas. Esses e outros efeitos adversos mais raramente descritos fazem com que o tratamento para LTA tenha uma terapêutica alternativa bem extensa quando comparada a outras doenças. Nesse aspecto, as principais drogas de segunda escolha são: isotionato de pentamidina e anfotericina B (Neves et al. 2011).

Na região norte do Brasil, diversos grupos têm avaliado a eficácia do tratamento da LTA com antimoniais, encontrando índices por vezes similares ou inferiores aqueles com drogas alternativas (Neves et al. 2011). Gadelha e colaboradores avaliaram vinte pacientes com LTA em Manaus entre 2010 e 2011; destes, 55% obtiveram cura após a administração de três doses de isotionato de pentamidina (4mg/kg/dia) com um intervalo de dois dias entre cada administração (Gadelha et al. 2015). Esse índice fora inferior ao encontrado por Roussel e colaboradores (2006) em estudo piloto na Guiana Francesa, onde 78,8% dos 137 pacientes com LTA recrutados curaram após o tratamento (Roussel et al. 2006). Esses estudos são comparáveis, na medida em que ambos tinham casuística composta por pacientes com LTA causada por *L. (V.) guyanensis*; no entanto, além da diferença numérica da casuística nos dois estudos, o estudo da Guiana Francesa empregou a dose única de 7mg/kg/dia.

A eficácia variada encontrada em diversos estudos utilizando terapêutica alternativa para o tratamento de LTA pode ser justificada pelo fato de algumas espécies de *Leishmania* spp. apresentarem maiores índices de persistência no homem e assim, manutenção da lesão e conseqüente falha terapêutica já na utilização da droga preferencial de escolha (antimonial pentavalente). Romero e colaboradores avaliaram tal fato de maneira clara e concisa ao recrutarem 101 pacientes com LTA e os dividir em dois grupos de acordo com o agente etiológico isolado de suas lesões: *L. (V.) guyanensis* ou *L. (V.) braziliensis*; foi observado nesse caso que 30,6% dos pacientes com LTA causada por *L. (V.) guyanensis* sofreram falha terapêutica (Romero et al. 2001). Existem estudos, principalmente desenvolvidos pelo grupo de Bourreau e colaboradores na Guiana Francesa (2016), onde o agente de LTA mais frequente é *L. (V.) guyanensis*, que buscam correlacionar alguns aspectos parasitários dessa espécie com uma menor

responsividade à terapêutica. É o caso da associação entre a presença de um vírus de RNA que infecta *Leishmania* spp. (LRV1); o estudo descreve que 27% dos pacientes com LTA causada por *L. (V.) guyanensis* que tiveram falha terapêutica e foram submetidos a esquemas alternativos, foram infectados por uma *Leishmania* spp. que apresentava o vírus LRV1 (Bourreau et al. 2016). Estudos desenvolvidos no Brasil também verificaram a baixa detecção do LRV1 em isolados de *L. (V.) braziliensis* de Minas Gerais, utilizando neste um isolado de *L. (V.) guyanensis* como controle positivo para a reação de polimerase em cadeia (PCR) que apresentava o LRV1 (Macedo et al. 2016). Devido à marcante presença dessa espécie parasitária na região de Manaus (Guerra et al. 2015), estudos que correlacionem a etiologia parasitária com a terapêutica abordada, assim como aqueles que proponham novas abordagens para o tratamento da LTA, são de extrema importância.

1.6 Imunologia da leishmaniose tegumentar Americana: o balanço imunológico na doença ativa e ao longo do tratamento

1.6.1 A importância dos linfócitos T e suas subpopulações celulares no curso da leishmaniose tegumentar

Os linfócitos T são células associadas à resposta de memória no ser humano e também, em seu estado efetor, apresentam funções relacionadas à interação direta com outras células do sistema imune, assim como ação citotóxica contra determinados microrganismos. *In vivo*, as células T CD4⁺ e CD8⁺ diferenciam-se em perfis efetores associados a suas moléculas de superfície celular, muitas delas responsáveis pela localização de um linfócito T no organismo, assim como pela capacidade responsiva daquela célula a certo estímulo (Khamesipour et al. 2012). Sendo assim, as células T são classicamente divididas em: T de memória efetora (TME), T de memória central (TMC), T *naive* (T*naive*) e, apenas para as células T CD8⁺, também o perfil de memória efetora CD45RA⁺ (TEMRA).

Os principais definidores desses perfis de memória são moléculas de adesão, como LFA-1 e CD62L (principalmente em murinos), ou receptores de quimiocinas (CCR7), que também induzirão a migração de uma célula fazendo-a seguir o gradiente de quimiocina ao interagir com seu receptor. Dessa forma, as células T *naive* que não interagiram com o antígeno podem “percorrer” órgãos linfoides secundários realizando sucessivas interações com células apresentadoras de

antígeno, até que reconheçam, determinado epítopo apresentado e iniciem uma resposta imune. Estudos já demonstraram a alta expressão de CCR7 nas células T periféricas, assim como a co-expressão desse receptor a outros associados à adesão de uma célula em um sítio específico. Neste sentido, a presença de CCR7 e CLA em quase 100% dos linfócitos T *naive* da pele, corrobora o fato de que células que expressam o CCR7 podem migrar para tecidos específicos, em situações inflamatórias particulares, assim como permanecer na circulação (Campbell et al. 2001). Por isso, tal receptor é um dos mais importantes e mais comumente usados para a classificação de células T em seus perfis de memória efetores.

As células T *naive* necessitam de um potente estímulo para sua ativação, necessitando inclusive da interação de moléculas co-estimulatórias; no entanto, após sua ativação, adquire função importante na geração dos demais perfis de memória celular e produção de IL-2, citocina importante para a ontogenia e proliferação de linfócitos (Farber 2000). As células T *naive* também se diferenciam dos outros perfis celulares, pois apresentam alta capacidade proliferativa *in vitro* mesmo sem uma função efetora imediata. É provável que essa proliferação seja necessária para manter a geração dos demais perfis efetores de memória (Khamesipour et al. 2012).

As células T *naive* diferenciam-se em TME ou TMC e, posteriormente, TME de acordo com o microambiente que induz a diferenciação. Vale salientar que em geral a ativação de uma célula T *naive* irá ocorrer em um órgão linfoide secundário próximo ao processo inflamatório em questão. Assim, as células T tenderão a migrar para o tecido de onde o epítopo correlato reconhecido tem origem. Esse fato é importante para delimitar que, de acordo com o processo inflamatório ao qual o organismo está submetido, o mesmo pode ser sistêmico ou localizado em determinado parênquima. Essas células TME tenderão a ser encontradas acumuladas em um determinado sítio, criando-se reservatórios dessas células, e assim, após o início de um processo imune com a ativação e proliferação de células TME, é provável que estas não sejam mais encontradas na periferia (Clark et al. 2010).

Os linfócitos de memória são as principais células com função efetora, como produção de citocinas de polaridade Th1/Th2/Th17, efeitos citotóxicos e indução da apoptose. No entanto, as células de memória também podem adquirir um perfil de hiporresponsividade semelhante à anergia. Isso já foi descrito em células T CD8⁺ presentes em microambiente inflamatório potente, e também em T CD4⁺ que foram

ativadas por mitógenos quando comparadas àquelas ativadas por APC. Ou seja, é provável que a ativação por um antígeno não correlato não seja tão eficaz na ativação completa de uma célula de memória, por mais que a mesma apresente fenotipicamente seus marcadores efetores. É possível também que esta não desenvolva todas as funções de células efetoras citadas acima, ou que as faça em menor intensidade (Farber 2000).

Dentre as células de memória estão as TMC que expressam o receptor CCR7, logo migram entre órgãos linfoides secundários e determinados tecidos, mas diferem fortemente das células T *naive* por gerarem rapidamente células T efetoras, servindo como fonte de geração dessas células (Campbell et al. 2001). As células TME não expressam mais marcadores como CCR7 e CD45RA. Por último, foram descritas as células TEMRA, com o fenótipo T CD8⁺, que expressam o CD45RA, mas não expressam CCR7.

Como a LTA é uma doença localizada e pode ser causada por mais de um agente etiológico, existe um perfil particular de resposta imune comumente associado à cada espécie parasitária como foi descrito por Matta et al. (2009). Em 2013, um grupo do Instituto Pasteur no Irã avaliou a importância das células T de memória em indivíduos que tiveram LC por *L. major* ou *L. tropica* e curaram após o tratamento. O grupo buscou avaliar se as células T circulantes seriam as responsáveis pela memória imunológica quando as células fossem re-estimuladas com antígeno parasitário (Valian et al. 2013). Foi observado que *ex vivo* a população de maior frequência foi a de células T *naive*, seguida de TME e TMC, condizente com o observado por Khamesipour et al. (2012). Interessantemente, após estimulação antigênica, as populações TMC e T *naive* sofreram um decréscimo em suas frequências seguida do aumento significativo na população de células TME, baseado nos mesmos marcadores fenotípicos descritos acima (CCR7 e CD45RA). O grupo supõe que as diferenças de frequência observadas em TMC e TME após estímulo ocorra em decorrência da internalização do receptor CCR7 após estimulação antigênica, ou devido a diferenças no protocolo de processamento da amostra para imunofenotipagem (Berhanu et al. 2003). A regulação para baixo descrita para CCR7 aumenta percentualmente a população de TME (CCR7⁻ CD45RA⁻) e essa observação pode explicar o porquê de essa população ter mostrado uma baixa proliferação celular, mesmo apresentando um grande aumento em sua frequência. O estudo também foi pioneiro em mostrar a importância de TMC e TME na memória imunológica, devido à intensa proliferação celular que sofrem as

células TMC com produção de IL-2, processo essencial para a rápida geração de células TME e manutenção da resposta imune (Valian et al. 2013; Campbell et al. 2001; Farber 2000); ou seja, essas populações celulares mostram-se como as mais importantes após a cura clínica de LC. O estudo ratifica ainda que eventos já descritos como a importância de TME na produção de citocinas efetoras (IFN- γ) e capacidade proliferativa limitada também ocorrem no contexto da leishmaniose tegumentar.

Dados do nosso grupo também foram importantes para ratificar que, por vezes, avaliações realizadas em células T circulantes subestimam importantes inferências imunológicas, já que as células efetoras tenderão a migrar para o sítio de lesão, desenvolvendo lá suas ações efetoras (Mendes-Aguiar et al. 2016). Esse estudo avaliou CMSP e células obtidas de lesões de pacientes com LTA por *L. (V.) braziliensis* e demonstrou que as CMSP seguiram as mesmas frequências observadas por Valian et al. (2013), mostrando uma semelhança de resposta imune para antígenos de *Leishmania* spp. diferentes (do Velho e Novo Mundo, respectivamente). Esse estudo (Mendes-Aguiar et al. 2016) demonstra que, entre sangue periférico e na lesão, há uma diferença significativa nas populações de células T observadas e seus perfis de memória. As células TME CD4⁺ que são a segunda população em frequência no sangue periférico, estão majoritariamente presentes na lesão, e também é nesse sítio que as células TME expressam seus receptores de ativação celular (CD69 em lesões mais tardias, e CD25 em lesões mais recentes) e consequente ação efetora. Esta dualidade na frequência de TME CD4⁺ também ocorre em TME CD8⁺. A maior frequência observada para TMC em sangue periférico, tanto no fenótipo T CD4⁺ e T CD8⁺, é explicada pela sua capacidade de recirculação entre órgão linfoides, preservada pelo receptor CCR7 e pela sua função na geração e manutenção da população TME. Por fim, os resultados acima expressos confirmam que na LTA, a compartimentalização de células imunes efetoras em seus sítios alvo de lesão, deve ser considerada para corretas avaliações sobre a resposta imune (Clark R et al. 2010, Mendes-Aguiar C et al. 2016;).

1.6.2 Células T regulatórias circulantes e a modulação da resposta imunológica

As células T regulatórias (Tregs) são uma pequena porcentagem das células T circulantes que adquirem, durante o processo de ontogenia ou após sua formação

e migração para tecidos específicos, a capacidade de regular a resposta imune inata e adaptativa por mecanismos de supressão da proliferação de células T, por bloqueio de sinais co-estimuladores de ativação. Esse processo ocorre via secreção de citocinas com efeito supressor (IL-10 e TGF- β 1), através da indução de apoptose ou ainda pelo “consumo” de IL-2, citocina indutora de proliferação celular. O entendimento do seu papel nos mecanismos imunológicos é relativamente recente, mas sua participação em mecanismos imunopatogênicos já tem sido descrito em vários modelos de doenças, incluindo os associados a patógenos.

Já foi descrito que as células Tregs compõem 5-10% das células residentes na pele íntegra e já foi demonstrado que estas proliferam ativamente em condições de inflamação, podendo servir controlando o processo inflamatório na pele. No entanto, as Tregs da pele só são capazes de suprimir a ativação de células T que foram fracamente ativadas via TCR, logo o controle da inflamação é de certa forma limitado (Clark et al. 2010).

Na LTA já foi avaliada a presença dessa população celular tanto em células circulantes no sangue, quanto dentre as CMSP estimuladas com antígeno parasitário. O grupo da Guiana Francesa observou, na cultura das CMSP, a presença das Tregs de acordo com seu fenótipo clássico (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺). Além de verificar que tais células eram capazes de produzir TGF- β 1 frente a *L. (V.) guyanensis* viva, ou seja, poderiam apresentar potencial imunossupressor (Kariminia et al. 2005), o mesmo grupo também demonstrou que as Tregs migram para o sítio de lesão e lá têm capacidade supressora da resposta imune, mostrado pela técnica de supressão celular e confirmado pela inibição na produção de citocinas do perfil Th1 (Bourreau et al. 2009). Este estudo também foi pioneiro ao mostrar que a quantidade de Tregs na lesão diminuía progressivamente no decorrer do tempo de evolução da mesma, o que poderia explicar uma forte regulação negativa que as Tregs exercem sob as células do sistema imune nas fases iniciais da infecção, o que acabaria por acarretar uma irresponsividade do sistema imune ao antígeno de *L. (V.) guyanensis*, corroborando outros estudos neste sentido (Matta et al. 2009). Essa menor capacidade do hospedeiro responder de maneira adequada aos antígenos do parasito, podem explicar a persistência do parasito nas lesões mesmo após meses do desenvolvimento destas, e o evento da falha terapêutica bastante descrita para tal espécie.

A diferença no balanço imunossupressor em LTA de acordo com a espécie parasitária em questão também foi abordada por Rodrigues e colaboradores (2014),

que mostraram que na lesão causada por *L. (V.) braziliensis* havia uma quantidade muito menor da expressão de FOXP3 (o fator transcripcional determinante para o fenótipo Treg) e de IL-10, quando comparado a lesões causadas por outros parasitos do subgênero *Viannia*; e que a maior expressão de FOXP3 nesse último grupo de lesão estaria associada a uma resposta crônica e parasitismo persistente (Rodrigues et al. 2014).

1.6.3 O papel de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias

As citocinas são importantes fatores que irão direcionar o tipo de imunidade que será “ativada” quando o hospedeiro entra em contato com o parasito. É o conjunto de citocinas liberadas no tecido que direciona ao desenvolvimento imunidade celular, que por sua vez é avaliada pela intradermorreação de Montenegro. As células da derme que estão associadas à formação da pápula e consequente reação inflamatória ao antígeno parasitário são ativadas por fatores liberados pelo tecido e células imunes residentes, que sinalizam positivamente para o influxo de demais células da resposta imune e “orquestramento” de uma reação imunológica via mediadores (citocinas ou quimiocinas) com ação local e central.

De acordo com o perfil de células T expandidas frente a uma infecção, haverá a liberação de um padrão de citocinas. Nesse âmbito as citocinas do perfil Th1 são aquelas com importante função na leishmaniose, pois é a ativação desse tipo de resposta que permite eliminação do parasito via indução de enzimas lisossomais e produção de radicais livres (ROS e NO) pelas células fagocíticas, fundamentalmente pelo macrófago. As citocinas mais importantes do perfil Th1 são: IFN- γ , IL-12 e TNF α (Carneiro et al. 2016). No entanto, a participação de citocinas associadas ao perfil anti-inflamatório também tem sido muito descrita na LTA, principalmente devido ao importante papel de IL-10 na diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias, agindo principalmente sobre TNF e IFN- γ (Bacellar et al. 2002, Gomes-Silva et al. 2007). A LTA tem um curso clínico onde o balanço entre estes dois perfis de citocinas é extremamente importante para a determinação de uma forma clínica auto resolutiva, localizada ou disseminada (Oliveira et al. 2014).

As citocinas também têm sido o foco de estudo para uma melhor compreensão da imunopatogênese da LTA, como por exemplo, podemos citar o trabalho de Espir e colaboradores (2014), que avaliou sete citocinas no soro de 33 pacientes com a intenção de verificar níveis destas que poderiam estar associadas ao sucesso terapêutico. O trabalho exemplifica bem que o perfil de citocinas

encontrado também depende da espécie parasitária, já que os indivíduos infectados por *L. (V.) guyanensis* apresentaram níveis mais elevados das citocinas IL-2 e IFN- γ , quando comparado àqueles infectados por outras espécies parasitárias (Espir et al. 2014). Há de se considerar ainda que estudos que avaliam a produção de citocinas em soro e plasma de indivíduos por vezes não alcançam uma forte correlação com a clínica, pois a LTA em geral, não é uma doença de manifestação sistêmica.

Baseado nisso, a avaliação imunológica de citocinas tem sido preferencialmente avaliada *in vitro*, isolando-se as células do paciente e estimulando-as com antígeno parasitário, permitindo “mimetizar”, ainda que de forma limitada, o microambiente imunológico e avaliar a partir do sobrenadante da cultura destas células, a liberação de ou não de citocinas. Matta e colaboradores (2009) também observaram maior produção de IL-10 pelas CMSP de indivíduos sadios de área endêmica, do que por pacientes de LTA por *L. (V.) guyanensis* (Matta et al., 2009).

1.6.4 Níveis de imunoglobulinas e suas subclasses na leishmaniose tegumentar Americana

A avaliação do braço humoral da resposta imune é um importante critério levantado pela OMS como nova perspectiva para o diagnóstico da LTA, já que técnicas sorológicas estão entre as mais aplicadas atualmente e estão disponíveis para uma série de enfermidades. Já se sabe que a quantidade de imunoglobulinas (Igs) produzida tende estar associada à carga parasitária, ao tempo de duração da infecção e à espécie parasitária em questão (Gutierrez et al. 1991) Os títulos de anticorpos reativos a *Leishmania* são significativamente mais baixos na infecção por *L. (V.) guyanensis* de pacientes do Amazonas, quando comparados a pacientes com LC por *L. (V.) braziliensis* oriundos da Bahia (Romero et al. 2001), sugerindo que a espécie infectante é determinante na indução da resposta de células B.

Os níveis de anticorpos em pacientes com LTA antes e após o tratamento também é um aspecto importante para se avaliar, já que a redução nos níveis de Ig anti-*Leishmania* circulantes pode ser utilizada como critério auxiliar para determinar a cura clínica. Foi observado que pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* apresentam uma redução em 73% de IgG1 e 78% de IgG3 reativas a antígenos do parasito, enquanto os títulos de Ig total diminuíram apenas 37% neste período, indicando que a avaliação das subclasses de Ig tenham um papel mais relevante para controle de cura do que os níveis de Igs total. A avaliação dos isotipos também

permitiria o acompanhamento, do ponto de vista humoral, mesmo após um longo período de acompanhamento (Fagundes-Silva et al. 2013).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Determinar fatores associados à resposta imune efetora em pacientes de leishmaniose tegumentar Americana de Manaus (AM) durante o tratamento com antimonial pentavalente.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o perfil epidemiológico e clínico dos pacientes com LTA atendidos na FMT/HVD durante o ano de 2016 participantes do estudo, além do estabelecimento de um “fluxo” logístico de envio de material biológico Manaus (AM) – Rio de Janeiro (RJ).
- Avaliar o perfil de resposta imune através da dosagem de citocinas do perfil celular Th1 e de perfil regulatório no plasma e sobrenadantes de cultivo celular pós-estimulação antigênicas, para avaliar quais são induzidas durante a doença ativa e após a cura.
- Determinar o fenótipo de células T que são preferencialmente expandidas durante a doença ativa e após cura clínica.
- Avaliar se os níveis de imunoglobulinas anti-*Leishmania* e seus isotipos sofrem modulação durante a evolução da infecção e se este parâmetro pode auxiliar na avaliação prognóstica.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Aspectos éticos

Os participantes deste estudo foram pacientes diagnosticados com leishmaniose cutânea, acompanhados no ambulatório do Departamento de Dermatologia da Fundação de Medicina Tropical Dr. Heitor Vieira Dourado/Amazonas. Aqueles que concordaram em participar deste projeto assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), redigido de acordo com as normas da Resolução 196/96, atualizada pela Resolução no. 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde, Ministério da Saúde. Os casos onde não houve retorno do paciente para acompanhamento foram caracterizados como “abandono clínico”. As amostras biológicas, como células e plasma, foram utilizadas apenas para as investigações referidas no presente projeto, e todo material biológico fora apropriadamente armazenado em um biorrepositório da FMT/HVD, atendendo todas as normas que rege este procedimento (Resolução 441/2011, CNS, MS). Os estudos laboratoriais foram parcialmente realizados no Laboratório de Imunologia da Gerência de Leishmanioses da FMT/HVD e no Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas (LIPMed) do IOC/FIOCRUZ.

O grupo controle deste estudo foi composto por indivíduos de área endêmica para LC, que nunca tiveram histórico ou suspeita de leishmaniose. O grupo controle fora selecionado buscando-se seguir critérios de pareamento entre gênero e idade com os pacientes de LC incluídos no estudo. Para os indivíduos deste grupo, seguiram-se os mesmos critérios de participação e confidencialidade citados anteriormente para os pacientes participantes da pesquisa, excetuando-se o diagnóstico positivo para LC e acompanhamento clínico. O requerido projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FMT/HVD (21273572).

3.2 Casuística

Este trabalho é um estudo prospectivo, que visou acompanhar entre janeiro e dezembro de 2016, 7 pacientes com diagnóstico clínico e laboratorial de LC, nas seguintes fases: antes, durante e após o tratamento primário preconizado pelo Ministério da Saúde.

Os indivíduos participantes tiveram seu sangue periférico colhido antes do início do tratamento, o que fora classificado no estudo como “primeira visita”. A segunda colheita de sangue periférico ocorreu no retorno do paciente à FMT/HVD na metade do tempo de tratamento preconizado, ou seja, aproximadamente quinze dias após o início do tratamento, o que fora caracterizado no estudo como “segunda visita”. A terceira e última visita, ocorreu ao final do tratamento no 30° dia. Já a quarta visita ocorreu um mês após o término do tratamento (aproximadamente 60° dia). Nesta última visita, o médico classificou o caso como sucesso ou falha terapêutica, de acordo com os critérios descritos posteriormente.

O critério de inclusão para o estudo foram ter diagnóstico clínico e laboratorial de LC, de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (Ministério da Saúde, 2015) e ter entre oito e sessenta anos de idade.

Foram excluídos do projeto: pacientes com sorologia positiva para o vírus da Imunodeficiência adquirida (HIV), mulheres grávidas assim como aqueles indivíduos em que as células mononucleares de sangue periférico (PBMC) não alcançaram os critérios de qualidade como: obtenção inferior a um milhão de PBMC por mililitro (mL) de sangue, e viabilidade celular inferior a 70%.

Os pacientes foram acompanhados durante a doença ativa e após o término do tratamento (30 dias), bem como nos casos de intercorrência (recidivas). Apenas indivíduos que retornaram ao ambulatório do Departamento de dermatologia da FMT/HVD após o início do tratamento coletaram amostra biológica, o que permitiu o seu acompanhamento nos períodos citados anteriormente. O caso clínico individual de cada paciente foi classificado como “falha terapêutica”, quando o mesmo não demonstrou sinal de regressão ou cicatrização das lesões cutâneas após o período de trinta dias do término do tratamento primário. Para os demais casos acompanhados clinicamente até o período supracitado, fora considerado “sucesso terapêutico”.

Uma ficha clínico-epidemiológica já empregada no serviço de saúde foi utilizada para coletar as informações referentes à história clínico-epidemiológica dos pacientes.

3.3 Obtenção de isolados de *Leishmania* spp.

Os fragmentos obtidos da lesão cutânea foram enviados armazenados em solução salina estéril com antibiótico, e mantido sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) para o

Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas (LIPMed/IOC) para isolamento do parasito. As amostras foram processadas por corte, seguido de maceração e semeadas em tubos plásticos de 10mL contendo meio de cultivo bifásico NNN. O monitoramento do crescimento de parasitas foi realizado ao longo de 30 dias, onde uma gota da fase líquida do cultivo era examinada entre lâmina e lamínula. O exame era considerado positivo quando eram visualizadas formas promastigotas.

Os isolados de *Leishmania* spp. obtidos dos pacientes diagnosticados como LC foram caracterizados quanto à espécie pelo Laboratório de Leishmaniose do IOC e depositados na Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC - FIOCRUZ).

Devido problemas financeiros, o serviço de caracterização parasitária fornecido pelo CLIOC-FIOCRUZ foi interrompido durante a fase de inclusão das amostras para este estudo. Por isso, apenas um paciente teve a caracterização da espécie parasitária realizada: o paciente 005/16, que apresentou falha terapêutica ao tratamento preconizado, teve LTA causada por *Leishmania Viannia guyanensis*.

3.4 Obtenção das células mononucleares de sangue periférico (CMSP)

Para os indivíduos controle, as CMSP foram obtidas do sangue periférico por intermédio do gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Nessa técnica, o sangue total foi centrifugado a 1800 rpm por dez minutos a temperatura ambiente para a retirada do plasma, que foi aliquoteado em microtubos e armazenado em freezer -70°C. O restante do sangue foi diluído na mesma proporção com meio de cultivo RPMI (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) + 1mM de HEPES (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) + L-glutamina (GIBCO, Carlsbad, CA, EUA) e antibiótico – penicilina/estreptomicina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), e após a diluição o sangue é lentamente despejado sobre o Ficoll-Hypaque® sem que haja mistura dos dois, em uma proporção de uma parte de Ficoll-Hypaque® para cinco de sangue. O próximo passo é a centrifugação do mesmo a 2900 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente. Após esse tempo, são formadas quatro áreas distintas no tubo que correspondem a componentes celulares diferentes que migraram para determinado local de acordo com sua densidade celular; como o Ficoll-Hypaque® tem uma densidade intermediária as CMSP este consegue separá-las em uma área ou “anel”. Esse “anel” é coletado e submetido a duas lavagens sucessivas em meio de cultivo RPMI a 1800 rpm por 10 minutos.

Após isso, as CMSP são contadas em câmara de Neubauer em uma diluição prévia de 1: 10 em azul de Trypan (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA) e foram posteriormente ajustadas na concentração de 5×10^6 cels/mL e congeladas em meio de congelamento que contém 90% de soro fetal bovino (Cultilab Ltda., Campinas, SP, BRA) e 10% de DMSO (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). Os criotubos contendo as CMSP passaram então por processo de congelamento lento, em Mr. Frosty® a -70°C por 24h e depois serão transferidas para nitrogênio líquido.

Para os pacientes incluídos no estudo o princípio de separação celular via gradiente químico fora seguido, no entanto, aplicando o protocolo descrito pelo fabricante do tubo para coleta, o qual era especializado para separação de CMSP (tubo CPT® – *Cell Preparation Tube* - BD Biosciences, San Diego, CA, EUA).

As amostras de sangue periférico dos pacientes foram obtidas por punção venosa (dois tubos de oito mL cada) e acondicionadas em tubo comercial CPT® (BD Biosciences, San Diego, CA, USA) que continha o anticoagulante citrato de sódio. Os tubos CPT® foram centrifugados a 2900 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente, para separação das CMSP, de acordo com o protocolo comercial disponibilizado pela empresa BD Biosciences. Para a obtenção de CMSP pelo tubo CPT®, o princípio de separação pelo gradiente químico foi seguido, no entanto, após a centrifugação a “zona” de CMSP é delimitada por um gel que migra durante o processo. Os passos seguintes, que incluem contagem e congelamento das CMSP são os mesmos já descrito anteriormente.

Já a coleta de sangue periférico dos indivíduos que compunham o grupo controle, fora realizada também via punção venosa (dois tubos de 10 mL cada), e o sangue foi armazenado em tubos comerciais para coleta de sangue a vácuo que continham o anticoagulante heparina sódica (BD Biosciences, San Diego, CA, USA). Para a obtenção e congelamento do sangue periférico colhido em tubo com heparina, foi aplicada a técnica de Ficoll-Hypaque® (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA), já citada anteriormente. As etapas de contagem e congelamento foram as mesmas usadas para a obtenção de CMSP por tubo CPT®.

Para os pacientes de LTA do estudo, os tubos foram enviados da FMT/HVD em Manaus, para o LipMed/IOC no Rio de Janeiro sob refrigeração (± 4 °C) e armazenamento em caixa adequada para transporte de amostra biológica logo após a centrifugação do mesmo e separação das CSMP. A coleta, envio, recuperação celular e viabilidade foram avaliadas antes do início da inclusão de pacientes para o estudo, e serviu como validação interna do envio de tais amostras em tubo CPT®.

Os parâmetros citados anteriormente foram validados pela equipe do LipMed/IOC após o bem sucedido recebimento de sangue periférico em tubo CPT® vindo de Manaus para o Rio de Janeiro, após 24 e 72 horas da coleta sanguínea. A validação do envio de amostras em tubo CPT® ocorreu em dezembro de 2015, e contou com a participação do colaborador do projeto, Dr. Adriano Gomes pesquisador da FIOCRUZ e responsável pelo treinamento da equipe da FMT/HVD para a correta colheita sanguínea, preparação da amostra e envio para o Rio de Janeiro.

O tempo entre a colheita do sangue e o processamento e congelamento das CMSP variou de acordo com logística de transporte aéreo entre Manaus e o Rio de Janeiro. O tempo mínimo entre a colheita do sangue em Manaus, e processamento no Rio de Janeiro foi de 24 horas, e o tempo máximo (para as amostras incluídas no estudo) foi de 72h.

3.5 Preparo do antígeno total de *Leishmania (Viannia) guyanensis*

Fora descongelado um criotubo com 1×10^7 promastigotas de *Leishmania (Viannia) guyanensis* caracterizada por eletroforese de enzimas pelo Serviço de isolamento, cultivo, tipagem e doação de *Leishmania* da Coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz (CLIOC/FIOCRUZ), sob o registro de número 3474, caracterizada em julho de 2013. Tal amostra fora proveniente de isolado humano, de paciente oriundo da FMT/HVD e não tinha a presença de *Leishmania Virus* (LRV), de acordo com a análise por reação de polimerase em cadeia (PCR) utilizando-se *primers* para identificação de tal agente viral padronizado *in house* pelo Laboratório Interdisciplinar em Pesquisas Médicas (LipMed/IOC).

O descongelamento das promastigotas foi seguido de cultivo das mesmas em estufa incubadora a 25°C, mantidas em dez mL de meio completo (89 % de meio Schneider, 10% de soro fetal bovino e 1% de urina) por quatro dias. Após esse período, a garrafa foi dividida em duas com o mesmo volume descrito para a garrafa de cultivo inicial a fim de favorecer o crescimento parasitário, até que fosse alcançada a fase estacionária do crescimento do parasito, no quinto dia de incubação. Ao final do período de crescimento parasitário foi feita a contagem das promastigotas em câmara de Neubauer, utilizando o corante Azul de Trypan para aferição da viabilidade das formas parasitárias, na diluição de um para mil. A contagem final de *Leishmania* spp. utilizada para a produção do antígeno total de

Leishmania (Viannia) guyanensis foi de $6,22 \times 10^8$ parasitas por mL de meio completo.

Para a produção antigênica, os tubos contendo 5 mL cada, da suspensão parasitária na concentração citada anteriormente foram submetidos a vinte e um ciclos sucessivos de congelamento em nitrogênio líquido, seguido por criofatura em *vórtex*. Esse procedimento visa particularizar ao máximo, proteínas extra e intracitoplasmáticas do parasito, afim de que o “antígeno total” contenha epítomos determinantes de várias regiões do parasito.

A dosagem de proteínas da solução particulada do antígeno após o procedimento citado acima, fora realizada mediante kit comercial *Pierce® BCA Protein Assay* (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, EUA), e o resultado aferido por leitura da absorbância no comprimento de onda de 570 nm. O total de proteína obtido foi de 2,065 mg/mL.

Para a utilização do antígeno total como estímulo antigênico para o cultivo, a concentração necessária usada para cada poço, contendo de $3-5 \times 10^5$ células, deve ser de 1 µg/mL. Por isso, foram preparadas alíquotas estéreis do antígeno na concentração estoque de 1mg/ mL e desta alíquota estoque foi utilizado 10µL por poço, cujo volume final é de 100µL. Os microtubos contendo a solução antigênica estoque foram armazenados em freezer -20°C até a sua utilização.

3.6 Cultivo e estimulação *in vitro* das células mononucleares de sangue periférico (CMSP)

A avaliação citofluorométrica para análise dos parâmetros citados na seção 3.7, foram realizadas após o descongelamento das CMSP, de duas abordagens diferentes: análise “*ex vivo*” logo após o descongelamento e breve exposição à temperatura de cultivo; e “*in vitro*”, quando as células são submetidas a estímulos antigênicos específicos e mantidas em cultura por cinco dias até que a análise citofluorométrica seja de fato realizada ao final do período citado.

A análise *ex vivo* foi realizada logo após o descongelamento das CMSP. Para permitir que as células retornassem ao seu estado homeostático com relação ao nível de receptores de membrana citoplasmática, após o descongelamento, as CMSP foram mantidas em meio de cultivo (RPMI + 10% de soro fetal bovino), em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por um período que variou de seis a doze horas

entre o descongelamento e a marcação com anticorpos fluorescentes para realização da técnica de citometria de fluxo.

Já para a análise *in vitro*, as CMSP descongeladas foram contadas e ajustadas à concentração de 3×10^6 por mL células. Para o cultivo foi utilizada placa de cultura de 96 poços (Costar; Corning Incorporated, NY, EUA), com fundo em “U” estéril. As células (100 μ L por poço) foram distribuídas em triplicata e divididas em quatro grupos: 1) BG (*background*), ou sem estímulo antigênico, nesses poços havia apenas a suspensão celular e o meio de cultivo em um volume final de 200 μ L 2) Ag. Lg (antígeno de *L. guyanensis*), poços onde as células sofreriam estimulação com antígeno do parasito na proporção já citada na seção 3.5; 3) Ag. Lb (antígeno de *L. braziliensis*) e Ag. Tg (antígeno de *Toxoplasma gondii*). As alíquotas do antígeno produzido mantiveram a mesma concentração já citada para a preparação do antígeno total de *L(V) guyanensis*, e o volume utilizado fora o mesmo para todos os estímulos (seção 3.5)

As placas foram mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por cinco dias. A suspensão celular dos quatro grupos foram recolhidas dos poços, acondicionadas em microtubos e centrifugada a 1800 rpm por dez minutos. O sobrenadante foi congelado a -70°C em microtubos para a posterior dosagem de citocinas. O *pellet* contendo as células foi ressuspendido em *vórtex* e colocado em solução de PBS com 10% de soro fetal bovino para análise fenotípica por citometria de fluxo.

3.7 Identificação das subpopulações linfocitárias a partir de células mononucleares de sangue periférico (CMSP) por citometria de fluxo

As CMSP *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno total de *Leishmania guyanensis* e outros parasitos do gênero *Leishmania* spp., foram avaliadas quanto às subpopulações celulares presentes em células mononucleares da linhagem linfocítica (memória efetora, T *naïve*, memória central, e TEMRA para as células CD3⁺CD8⁺). A análise foi feita com o uso de anticorpos monoclonais acoplados a fluorocromos específicos, onde a aquisição de dados ocorreu em citômetro de fluxo, num total de cem mil eventos analisados no “*gate*” de células viáveis, e o resultado foi expresso em percentagem.

Para tal, foi selecionada uma região preferencial de análise (“*gate*”), na região gráfica bidimensional (“*dot-plot*”) que corresponde, de acordo com a literatura, à região com predomínio de linfócitos, usando como parâmetro índices de tamanho

(FSC-A) *versus* granulocidade (SSC-A). Essa análise foi realizada após a exclusão daquelas células que possivelmente, foram adquiridas e expostas ao laser juntas, caracterizando assim, um evento, no entanto com mais de uma célula (“*doublers*”). A exclusão de “*doublers*” foi a primeira estratégia de análise para todos os experimentos de citometria realizados e usou como parâmetro índices de tamanho (FSC-A *versus* FSC-H). A exclusão de “*doublers*” é necessária para que a região de “*gate*” de linfócitos seja corretamente selecionada, permitindo as demais avaliações posteriores.

O próximo passo da estratégia é definir o grau de viabilidade celular, para que seja evitada análise em populações celulares mortas ou em processo de morte celular, o que poderia acarretar marcação inespecífica de anticorpos monoclonais fluorescentes. Para isso foi realizado um ensaio de marcação superficial e intracitoplasmático de grupamentos aminas para avaliação da viabilidade celular por citometria de fluxo de alta resolução, utilizando-se um corante específico para tal feito obtido através da utilização do kit comercial *Live/Dead® Fixable Dead Cell Stain* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), onde células com parcial ou total comprometimento da integridade de membrana celular têm maior marcação dos seus grupamentos aminas, presente tanto na superfície da membrana citoplasmática, quanto nas membranas das vesículas e organelas intracitoplasmáticas, sendo assim, células mortas ou em processo de morte celular apresentam maior marcação de seus grupamentos aminas e maior intensidade média de fluorescência para o corante avaliado, localizando-se no gráfico unidimensional (histograma) na extremidade direita, enquanto as células viáveis com pouca marcação de grupamentos aminas (apenas na membrana citoplasmática) localizam-se na extremidade esquerda do histograma. Para a validação do ensaio, fora utilizado um tubo como controle induzido de morte celular, onde foi adicionado diretamente às células 10 µL de álcool a 70%. O controle induzido de morte celular permite avaliar a funcionalidade do ensaio, assim como, delimitar a região no histograma referente às células mortas, e aquelas referentes às células vivas.

Para quantificação e análise das células ditas de memória central (TMC), foram consideradas aquelas com as seguintes características citofluorométricas: CCR7⁺CD45RA⁻; para as células de memória efetora (TME): CCR7⁻CD45RA⁻; já aquelas T *naïve*: CCR7⁺CD45RA⁺. A análise dessas subpopulações ocorre na região que inclui células positivamente marcadas com CD3 e CD4 (CD3⁺CD4⁺) ou apenas marcadas para CD3 (que o estudo inclui como população CD3⁺CD4⁻ ou CD8⁺),

sendo que as células CD8⁺ ainda apresentam uma quarta subpopulação celular conhecida como células TEMRA (células T de memória efetora - RA) com perfil citofluorimétrico CCR7⁻CD45RA⁺. A análise das quatro subpopulações citadas anteriormente foi feita em função dos marcadores CCR7 e CD45RA e suas distribuições na superfície das células que compõe cada subpopulação.

Considerando-se cada subpopulação citada anteriormente foi feita a avaliação da ativação celular de acordo com os seguintes fenótipos: CD38⁺HLA-DR⁻; CD38⁺HLA-DR⁺ e CD38⁻HLA-DR⁺. Para o estudo do fenótipo associado à senescência do linfócito foi avaliado de acordo com o perfil citofluorimétrico CD57⁺CD27⁻ apenas nas células T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD4⁻. A estratégia geral de análise citofluorimétrica encontra-se na Figura 4.

Foi ainda realizada, a avaliação e quantificação da presença de células T regulatórias, que expressam um perfil citofluorimétrico (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺) nas amostras analisadas (Figura). Pra isso foi utilizado o kit comercial *Human Treg Flow*® (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA).

A última análise realizada de maneira parcial, ou seja, com um número representativo dos pacientes foi a aferição da frequência da população de células NK e NKT além de seu perfil de ativação. Tal avaliação foi feita apenas *ex vivo*, após o descongelamento das CMSP e breve cultivo destas em meio RPMI+ 10% de SFB em estufa a 37°C com 5% de CO₂, de um dia para outro (“*resting*”). O fenótipo de células NK foi definido como: CD3⁻CD4⁻CD56⁺ e seu perfil de ativação foi correlacionado à capacidade destas células em produzir as citocinas TGF-β1, IFN-γ ou grânulos de perforina, estas últimas avaliadas por marcação intracelular. O fenótipo das NKT foi definido como: CD3⁺CD4⁻CD56⁺, o perfil de ativação seguiu o mesmo descrito para as células NK. A estratégia de análise destas duas populações celulares segue o protocolo geral do estudo descrito no primeiro e segundo parágrafos desta seção.

3.7.1 Marcação intracelular por citometria de fluxo

A produção de TGF-β1, IFN-γ e grânulos de perforina por marcação intracelular também foi analisada na população de linfócitos T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) e CD4⁻ (CD3⁺CD4⁻). As marcações intracelulares foram realizadas utilizando os tampões *Perm buffer* e *Fix/perm buffer* (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA).

Para tal análise apenas foi considerada uma abordagem *ex vivo* onde as CMSP passaram por breve período em cultivo após o descongelamento (“*resting*”).

Para a marcação citofluorimétrica foram utilizadas entre $0.5-1.0 \times 10^6$ CMSP/ml. Após o período de “*resting*” as células passaram por centrifugações sucessivas em tampão comercial e foi feita a marcação extracelular para a definição do fenótipo de células T (anti-CD3 PE; anti-CD4 PE-Cy5 - BioLegend Inc., San Diego, CA, USA); após o período de incubação de trinta minutos sob refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), as CMSP foram encubadas com tampão permeabilizador de membrana (*perm buffer* - BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), e foi então adicionado os anticorpos monoclonais: anti-TGF β 1; anti-IFN- γ e anti-perforina. Seguiu-se então o período de incubação relativo à marcação intracelular de tais moléculas, seguido de lavagens sucessivas em tampão comercial e processo de fixação adequado.

Para as marcações intracelulares, foram consideradas aquisições mínimas de 100.000 eventos no *gate* de análise de linfócitos T, durante a aquisição em citômetro de fluxo de alta resolução.

3.7.2 Estratégia geral de análise citofluorimétrica de células T por citometria de fluxo

Após a obtenção celular, e período de “*resting*” para as marcações *ex vivo* ou do cultivo celular e estímulo antigênico específico (5º dia de incubação a 37°C , com 5% de CO_2) para as marcações *in vitro*, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos para detecção de 1) moléculas da superfície: CD3, CD4, CD8, CD56, CD25, CCR7, CD69, HLA-DR, CD45RA, CD57, CD27 e CD38 (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA); 2) moléculas intracelulares: FOXP3 (BioLegend Inc., San Diego, CA, USA), IL-10, TGF- β 1, IFN- γ , perforina (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA). Além disso, utilizamos o corante fluorescente *Live/Dead® dye* fluorocromos (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

As células foram adquiridas nos citômetros: Facs ARIA IIu (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA) da plataforma de citometria do Programa de desenvolvimento de tecnologias da FIOCRUZ- PDTIS; e CytoFLEX (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, EUA) da Plataforma de citometria multiusuário do IOC/FIOCRUZ, Núcleo de purificação celular – *Cell Sorting* ; e os dados foram analisados utilizando o programa Kaluza® *Analysis 1.5a* (Beckman Coulter inc., Brea, CA EUA).

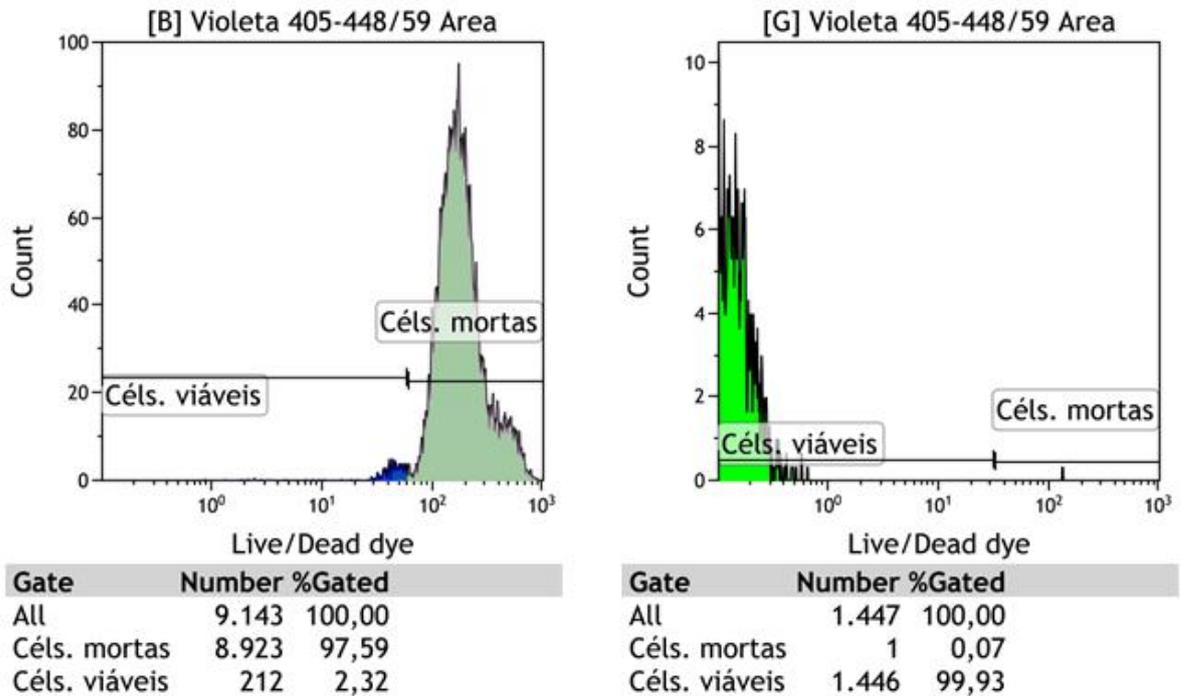
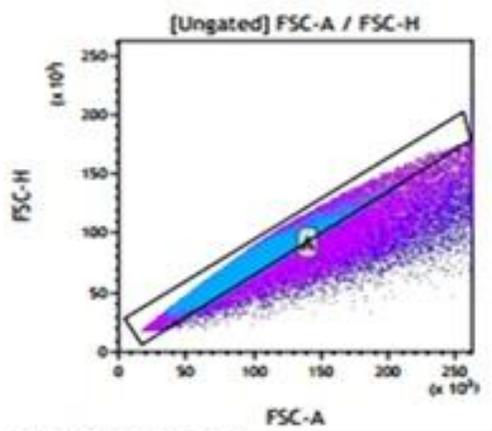
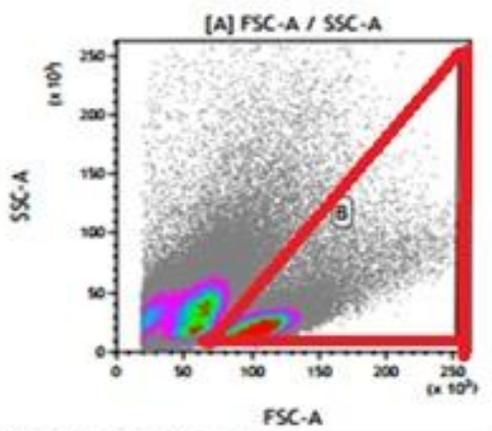


Figura 3- Estratégia de análise da viabilidade celular utilizando o kit Live/Dead®. A figura da esquerda mostra o controle de morte induzido (álcool a 70%) que demonstra a funcionalidade do ensaio. A imagem a direita mostra a viabilidade das PBMC após descongelamento.



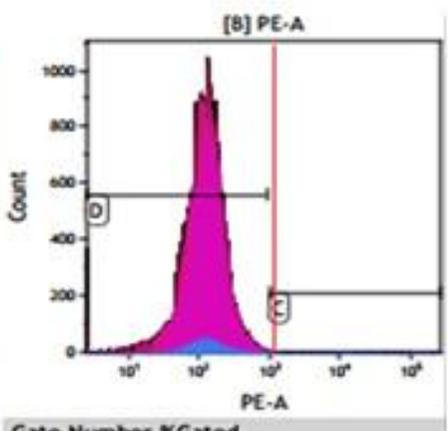
Gate Number	%Gated
All	321.699 100,00
A	294.745 91,62

A



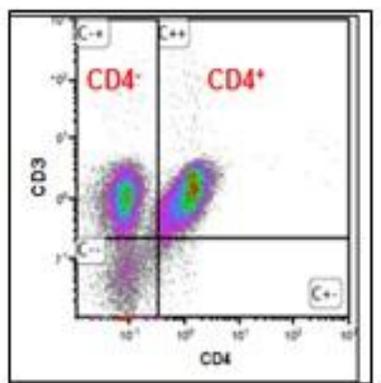
Gate Number	%Gated
All	294.745 100,00
B	108.189 36,71

B

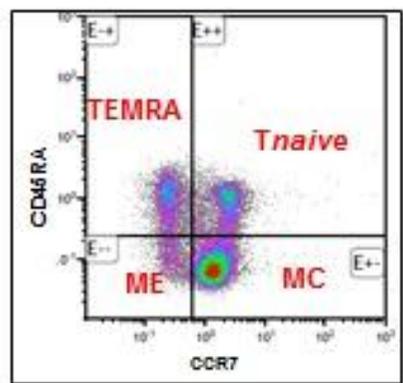


Gate Number	%Gated
All	108.189 100,00
C	1.111 1,03
D	107.011 98,91

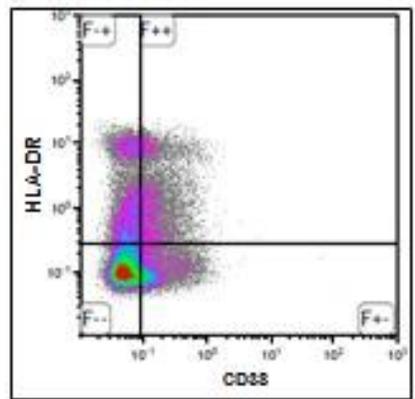
C



D



E



F

Figura 4 - Estratégia geral de análise dos fenótipos celulares, de memória, ativação e senescência. A figura A mostra a exclusão de “*duplets*” em um “*dot-plot*” de tamanho *versus* tamanho. A figura B delimita a região de concentração dos linfócitos de acordo com os parâmetros de tamanho (FSC-A) *versus* granulosidade (SSC-A), este gráfico está em função do *gate* da figura A, ou seja, apenas os “*singlets*” são considerados. A figura C mostra o ensaio de avaliação de viabilidade das células, através da não incorporação do corante comercial (*live/dead-PE*), e determina que as análises subsequentes serão feitas em função apenas das células viáveis. A figura D mostra dot plot que para definição das células que expressam o receptor CD3 (APC-H7) e CD4 (PE) em sua membrana. A figura E mostra os fenótipos de memória de acordo com a expressão dos receptores CCR7 PE (eixo horizontal) e CD45RA Alexa 700 (eixo vertical). No fenótipo de células T CD4⁺ pode-se verificar a frequência de células de memória efetora (CCR7⁻CD45RA⁻) células de memória central (CCR7⁺CD45RA⁻) e T *naive* (CCR7⁺CD45RA⁺). Para o fenótipo das células CD8 positivas existem todas as células de memória citadas além da subpopulação chamada células T de memória efetora – RA (CCR7⁻ CD45RA⁺). A figura F mostra o grau de ativação de cada fenótipo de células T de memória mostrado na figura E, em função da expressão dos marcadores de ativação CD38 (eixo horizontal) e HLA-DR (eixo vertical).

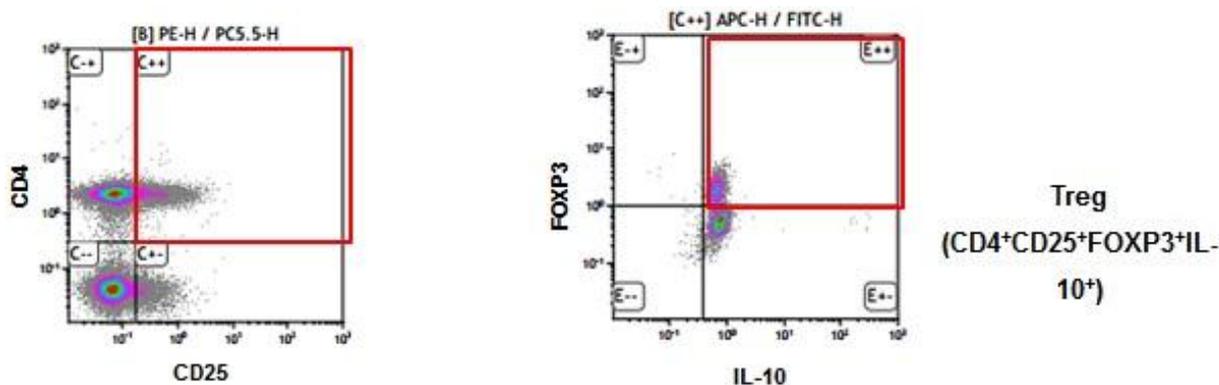


Figura 5 - Estratégia de análise da frequência de Tregs. A imagem da esquerda, mostra que a definição da população de Tregs foi feita dentro do fenótipo de células T CD4⁺ e avaliou a expressão concomitante desse receptor além daquele que caracteriza um perfil de ativação (CD25⁺), logo, apenas os linfócitos T CD4⁺, em perfil de ativação foram avaliados (região “duplo positiva” selecionada). A figura da direita mostra que para a população celular selecionada anteriormente, foi avaliada a presença do fator transcripcional característico dessa população celular (FOXP3⁺) e produção concomitante de IL-10 em seu interior, caracterizando o fenótipo de células T regulatórias avaliado nesse estudo.

3.8 Análise do perfil de citocinas plasmáticas e em sobrenadantes de cultivo

Anteriormente à separação das CMSP, foi obtida alíquotas de plasma, as quais foram armazenadas em freezer -70°C até a sua utilização. Quanto às CMSP que passaram pelo estímulo com antígeno total de *L. guyanensis* e outros estímulos já citados, antes de ser realizada a imunofenotipagem para a técnica de citometria de fluxo (5° dia), os sobrenadantes de cada poço do cultivo foram recolhidos, alíquotados e armazenados em freezer -70°C até sua utilização. Os níveis das citocinas IL-10 e IFN- γ foram avaliados.

A dosagem das citocinas foi realizada por ensaio imunoenzimático (ELISA) de acordo com o protocolo do *kit* comercial (DuoSet R&D®). Seguindo o protocolo, o anticorpo primário anti-IFN- γ e anti-IL-10 foi diluído em tampão PBS e adsorvido

cada um a superfície de uma placa de 96 poços de fundo chato (Costar; Corning Incorporated, NY, EUA). Após 16 horas de incubação em câmara úmida e refrigeração ($\pm 4^{\circ}\text{C}$), foi realizada a lavagem de cada poço com 300 μL de tampão de lavagem (PBS+ 0,05% de Tween20) por três vezes. A próxima etapa foi o bloqueio de regiões da superfície da placa que não contivessem o anticorpo primário, onde poderia ocorrer a ligação inespecífica de demais componentes de detecção das citocinas. O bloqueio foi realizado adicionando 300 μL de PBS+ 1% BSA em cada poço da placa com posterior incubação da mesma em câmara úmida a temperatura ambiente por no mínimo uma hora. Após esse período as lavagens sucessivas já citadas foram realizadas e foram adicionados 100 μL de plasma sem diluição prévia ou sobrenadante de cultura das CMSP na diluição de 1:2 em diluente adequado. As amostras ficaram em incubação por duas horas e foi então adicionado os anticorpos secundários ou biotinizados anti-IFN- γ e anti-IL-10 em sua respectiva placa. Para a revelação colorimétrica da reação foi adicionada a enzima estreptavidina (DuoSet R&D®) seguida pelo cromógeno solúvel TMB - 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, EUA). A leitura foi realizada em espectrômetro no comprimento de onda de 450nm com filtro de correção de 570nm, e as absorbâncias expressas em densidade óptica (D.O). A utilização do *software* Soft MaxPro® (Molecular devices LLC, Chicago, IL, EUA) permitiu a normalização dos valores de D.O e a conversão destes para níveis de concentração de IL-10 e IFN- γ em pg/mL.

3.9 Quantificação dos níveis de imunoglobulina G anti-*Leishmania* spp. por ensaio enzimático (ELISA)

Os anticorpos IgG anti-*Leishmania* presentes no plasma dos pacientes foram quantificados pelo método imuno-enzimático indireto de ELISA, utilizando antígenos solúveis de *L. braziliensis* ou *L. guyanensis* adsorvidos em uma placa de 96 poços de fundo chato (Costar; Corning Incorporated, NY, EUA) por no mínimo doze horas (*overnight*). No dia seguinte, após a lavagem da placa com *wash buffer* (PBS Tween20 a 0,05%), foram adicionadas as amostras de plasma e após a incubação de duas horas, também o conjugado anti-IgG de humano marcado com peroxidase (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, EUA), e cromógeno solúvel OPD-ortofenildiamina (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). A leitura foi realizada em

espectrômetro no comprimento de onda de 450nm. Os resultados foram expressos como índice ELISA ou densidade óptica (DO).

3.10 **Análise estatística**

A significância em comparações simples entre dois grupos foi avaliada pelo teste *t*. Já as comparações de múltiplos grupos foram feitas por análise de variância (ANOVA) e análises de correlação avaliadas pelo teste Pearson. Tratando-se de uma amostragem com distribuição fora da normalidade, os dados foram analisados pelos testes Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e ANOVA para comparação entre medianas e o teste de Spearman para análise de correlação (GraphPad Software Inc., San Diego CA, EUA). Foram consideradas estatisticamente significativas as diferenças que apresentarem valores de $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

A seção resultados será dividida em quatro blocos. O primeiro bloco irá abordar as informações gerais dos indivíduos que compõe a casuística do estudo, tais como dados epidemiológicos, clínicos, quantidade e viabilidade de CMSP; o segundo bloco trará os resultados de quantificação de anticorpos IgG1 anti-*Leishmania* e IgG3 anti-*Leishmania*; o terceiro bloco incluirá resultados da quantificação de citocinas em plasma e sobrenadante de cultura das CMSP; e o quarto e último bloco tratará dos resultados de caracterização fenotípica de linfócitos T do sangue periférico. A casuística segue a seguinte subdivisão: pacientes com acompanhamento completo (antes, durante e após o tratamento) e do paciente com falha terapêutica.

4.1 Características clínicas, demográficas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo

De janeiro a dezembro de 2016, foram recrutados dezessete pacientes com LC atendidos no ambulatório de dermatologia da FMT-HVD (AM). Destes, sete pacientes retornaram no meio e após o fim do tratamento, completando todo o acompanhamento terapêutico que o estudo propôs. Entretanto, quatro pacientes foram excluídos do estudo por: não terem sido obtidas quantidade suficiente de CMSP (pacientes 006/16 e 004/16), a amostra ter sido considerada inadequada para o processamento (paciente 012/16), e porque a idade do paciente era superior ao limite etário descrito para o estudo (paciente 001/16). A tabela 1 apresenta os dados demográficos, epidemiológicos e clínicos dos 14 pacientes que compuseram o estudo. O item “tempo de doença” equivale ao período que o paciente notou o início da lesão até o seu atendimento médico; esse tempo foi relatado pelo próprio paciente durante a consulta. Todas as informações foram obtidas pela equipe médica colaboradora do estudo.

O item “tamanho da lesão” equivale a uma média aritmética entre a área da menor e da maior lesão em centímetros quadrados, para aqueles pacientes que apresentaram mais de uma lesão; para os pacientes com apenas uma lesão, o valor assinalado é referente à área da sua lesão em centímetros quadrados, considerando

a lesão como uma forma geométrica elíptica, dessa forma o cálculo é feito pela fórmula: $A^2 = \pi \times R \times r$.

A média de idade dos pacientes foi de 28 anos, onde a faixa etária variou de dezenove a trinta e sete anos. Do total de pacientes recrutados apenas um era do sexo feminino, e pelo menos seis tinham atividade ocupacional associada diretamente à mata (militar; agente de endemias, empresário de turismo, agricultor, agropecuário e madeireiro).

Quanto aos aspectos clínicos da LC, todos os pacientes tiveram resultado parasitológico da lesão positivo (*imprint*). As lesões foram localizadas com maior frequência no membro inferior (n= 9), seguida pelo membro superior (n=3) e tronco (n=2). A maior parte dos pacientes apresentou apenas uma lesão (n=8), mas também foram observados pacientes com duas (n=2), três (n=2) e quatro lesões (n=1).

O tempo médio de doença foi de aproximadamente 69 dias. O acometimento de gânglios linfáticos associados (linfangite) foi descrito para quatro pacientes, todos apresentaram tempo de doença superior a 50 dias; dentre estes, três apresentavam mais de uma lesão. O tamanho médio das lesões (medida de área em cm²) foi de 3.03 cm² e o aspecto das lesões de todos os pacientes foi classificado como “ulcerosa”.

Do total de pacientes recrutados, apenas sete (41,1%) retornaram nos três tempos de acompanhamento proposto pelo estudo, logo, o desfecho clínico foi avaliado apenas nestes indivíduos. Dessa forma, seis pacientes tiveram sucesso terapêutico (85,7%), e apenas um paciente apresentou falha terapêutica (14,3%) de acordo com os critérios já descritos na seção 3.2 desse trabalho.

Tabela 1: Características clínicas e demográficas dos pacientes de leishmaniose cutânea incluídos no estudo.

Identificação do paciente	Gênero	Idade (anos)	Ocupação	Tempo de doença (dias)	Número de lesões	Área lesão (cm ²)	Localização	Aspecto	Linfangite	Exame direto (<i>imprint</i>)	Desfecho clínico
001/16	M	71	Agricultor	90	2	7.06	Tronco	Ulcerosa	Não	Positivo	ni
002/16	M	29	Fiscal de tráfego	53	2	ni	Tronco/orelha	Ulcerosa/tuberosa	Sim	Positivo	ni
003/16	M	15	Desempregado	43	1	ni	MI	Ulcerosa	Não	Positivo	ni
005/16	M	34	Taxista	30	1	2.35	MS	Ulcerosa	Não	Positivo	Falha terapêutica
007/16	M	34	Agropecuário	90	1	ni	MI	Ulcerosa	Não	Positivo	ni
008/16	M	21	Estudante	90	3	ni	MI	Ulcerosa	Sim	Positivo	Cura
009/16	M	19	Desempregado	60	1	4.71	MI	Ulcerosa	Sim	Positivo	ni
010/16	F	47	Costureira	45	1	4.71	MS	Ulcerosa	Não	Positivo	ni
011/16	M	30	Empresário turismo	120	4	ni	MS/MI	Ulcerosa	Sim	Positivo	ni
013/16	M	21	Militar	108	3	0.47	MI	Ulcerosa/papulosa	Não	Positivo	Cura
014/16	M	33	Madeireiro	60	1	1.96	MI	Ulcerosa	Não	Positivo	Cura
015/16	M	35	Agente de endemias	90	1	0.94	MI	Ulcerosa	Não	Positivo	Cura
016/16	M	37	Pedreiro	21	1	ni	MI	Ulcerosa	Não	Positivo	Cura
017/16	M										Cura

MI – membro inferior; MS – membro superior

Ni – não informado; M – masculino; F – feminino

A Tabela 2 apresenta os parâmetros quantitativos e qualitativos das células utilizadas para os experimentos, segundo o protocolo de obtenção padronizado para este estudo, utilizando os tubos CPT®. O tempo de processamento descrito na tabela, equivale ao período de tempo em horas desde a coleta do sangue periférico em Manaus (AM), até sua chegada ao LIPMed/RJ e posterior processamento. A percentagem de viabilidade celular descrita equivale à quantidade de células que não incorporaram o corante azul de Trypan durante o processo de diluição em relação ao total de CMSP quantificadas em câmara de Neubauer. A incorporação do corante e consequente coloração da célula de azul caracteriza que há uma perda de integridade de membrana citoplasmática, o que denota morte celular. As CMSP foram diluídas em uma parte da suspensão celular para nove partes de azul de Trypan (1:10).

Tabela 2: Grau de recuperação e viabilidade de células mononucleares de sangue periférico obtidas de sangue coletado em tubo CPT®.

Identificação	1ª visita			2ª visita (10-20 dias após início tratamento)			3ª visita (final de tratamento)		
	Processamento (horas)	Total PBMC (10 ⁷ cels/mL)*	Viabilidade (%)	Processamento (horas)	Total PBMC (10 ⁷ cels/mL)	Viabilidade (%)	Processamento (horas)	Total PBMC (10 ⁷ cels/mL)	Viabilidade (%)
001/16	24	1,92	92	48	1,85	75			
002/16	24	1,93	95						
003/16	24	2,77	97						
005/16	72	1,35	90	48	2,31	88	48	0,98	96
006/16	120	0,1	50						
007/16	48	1,57	90						
008/16	48	1,81	92	48	2,18	87	48	1,37	96
009/16	48	2,46	96						
010/16	48	1,41	96	48	1,36	96			
011/16	48	1,16	60						
013/16	48	2,21	88	48	1,75	94	48	1,83	98
014/16	48	1,83	97	48	1,33	99	48	2,10	98
015/16	48	1,75	98	48	2,77	98	48	1,71	98
016/16	48	1,93	98	48	1,57	98	48	2,13	98
017/6	48	1,73	99	48	2,15	98	48	2,11	97

* O rendimento observado para cada coleta foi obtido a partir de 16 mL de sangue periférico (2 tubos CPT - 8mL)

A média de obtenção de CMSP do estudo foi de $17,8 \times 10^6$ células/mL considerando todos os pacientes incluídos e todos os períodos avaliados; e a média de viabilidade foi de 95%, também dentro do citado para a obtenção de CMSP, ratificando que a logística de envio, transporte e processamento proposto pelo estudo foi adequada para se realizar experimentos com amostras oriundas de localidades distantes do Rio de Janeiro, como no caso da região Norte no Brasil.

4.2 Quantificação de imunoglobulinas anti-*Leishmania* spp.

4.2.1 Avaliação dos níveis de imunoglobulina G, isotipo IgG-1 e IgG-3 anti-*Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis*

A quantificação de imunoglobulinas foi realizada nas amostras de plasma previamente congeladas (-70°C) na data de processamento das mesmas. Foram realizadas análises do perfil de Igs das subclasses IgG-1 e IgG-3 para *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* por ensaio enzimático colorimétrico indireto (ELISA) padronizado *in house*.

Houve uma forte correlação positiva ($r=0,935$; $p < 0,001$) entre os níveis de Ig anti- *L. (V.) braziliensis* e anti- *L. (V.) guyanensis* nos dois isotipos analisados (IgG1 e IgG3), o que reforça que a dosagem de Ig específica para cada espécie independente de seu isotipo não é capaz de distinguir entre as duas infecções. Por isso, as dosagem de Ig posteriores foram realizadas apenas para IgG1 e IgG3 anti- *L. (V.) guyanensis*.

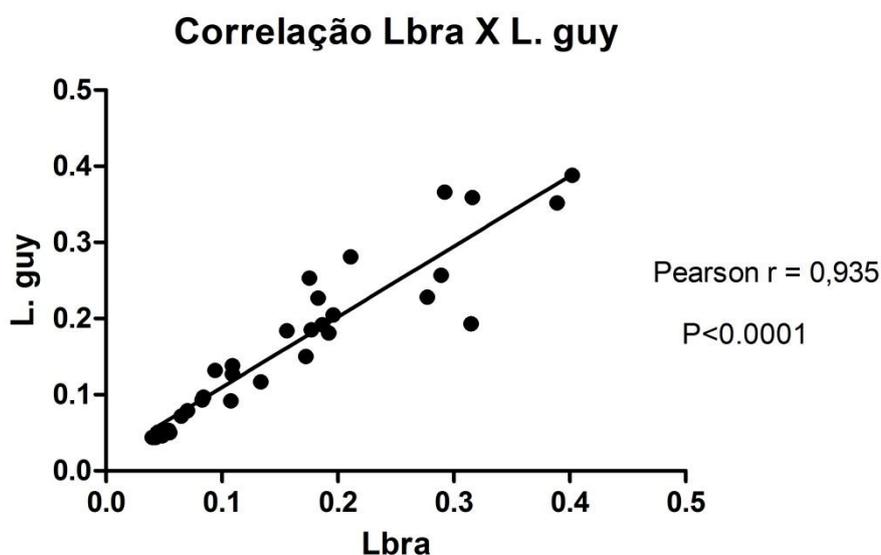


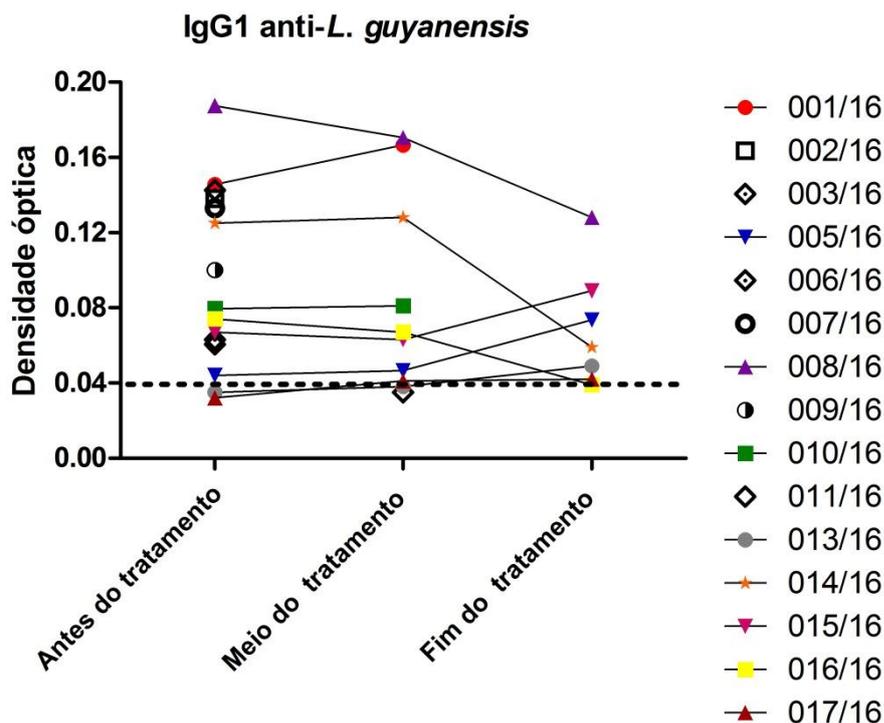
Figura 6: Análise da associação entre da quantificação de imunoglobulinas em placas de ELISA sensibilizadas com antígenos de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Lg) e anti- *L. braziliensis* (Lb). Cada ponto representa os valores de imunoglobulinas de um paciente.

4.2.2 Avaliação dos níveis de imunoglobulina G, isotipo IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania (Viannia) guyanensis*

Foi realizada a dosagem das imunoglobulinas dos isotipos IgG1 e IgG3 anti-*L. (V.) guyanensis*. Foi incluída na análise gráfica a média da densidade óptica (D.O) das Igs avaliadas no plasma dos indivíduos sadios (cinco) de área endêmica (controles), tal valor está representado pela linha tracejada (figura 7).

A maioria dos pacientes (onze de quinze) apresentou níveis quantificáveis de Ig1 e de IgG3 na fase de doenças ativa. É possível observar, no entanto, que dois pacientes, evoluíram com redução dos níveis de IgG1 no fim do tratamento, quando comparado ao período antes do tratamento (008/16, 014/16, 016/16) e que esse padrão se repete para IgG3.

A



B

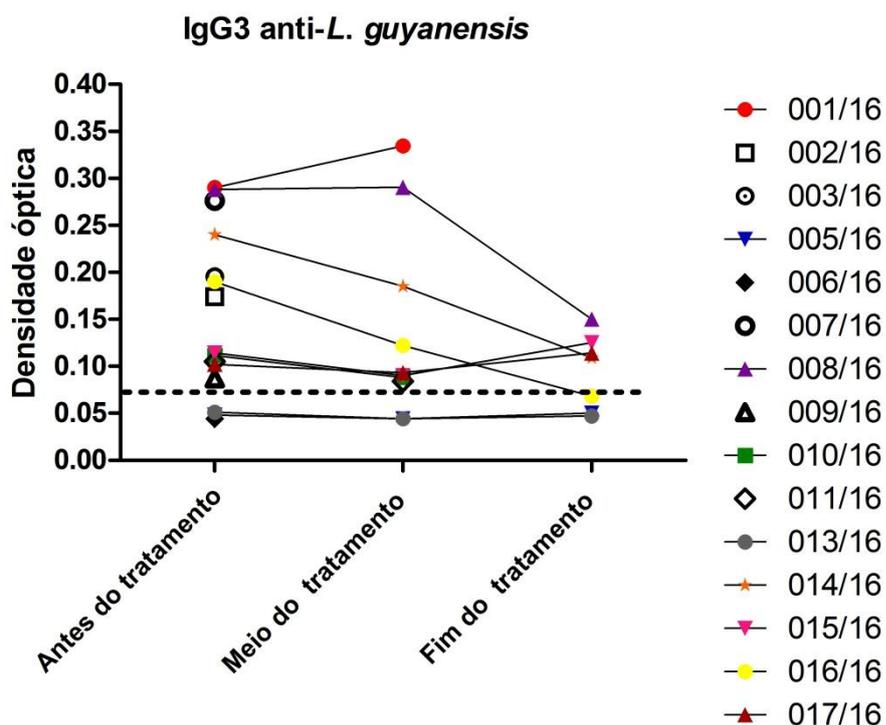


Figura 7: Quantificação de imunoglobulinas (IgG1 e IgG3) a *anti-Leishmania (Viannia) guyanensis* de pacientes de leishmaniose cutânea avaliados antes, durante e depois do tratamento anti-*Leishmania*. Cada símbolo representa um paciente (n=15) e a linha contínua agrupa cada paciente em diferentes períodos de avaliação.

4.3 Avaliação dos níveis de citocinas pró- e anti-inflamatórias em plasma e sobrenadantes de cultura de células mononucleares de sangue periférico pós-estímulo antigênico

4.3.1 Quantificação IL-10 e IFN- γ no plasma de pacientes de leishmaniose cutânea

O limite de detecção do ELISA para IFN- γ foi de 130,0 pg/mL – 2291,0 pg/mL; Já o limite de detecção para IL-10 foi de 39,0 pg/mL – 1763,0 pg/mL. As amostras de plasma foram usadas para análise em duplicata sem diluição prévia, no entanto, todas as amostras tiveram absorvância menor do que o limiar de detecção do *kit* e por isso, não foi possível obter resultado para nenhuma amostra plasmática de controle ou paciente, tanto para IL-10, quanto para IFN- γ .

4.3.2 Quantificação de interferon gama (IFN- γ) por células mononucleares estimuladas *in vitro* com antígenos de *Leishmania* spp.

As CMSP de todos os pacientes incluídos no estudo foram submetidas a cultivo *in vitro* na presença ou não (*background* - BG) de estimulação antigênica com antígeno de *L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis* ou *T. gondii*. A **Figura** mostra os valores de IFN- γ em pg/mL para os pacientes em doença ativa (n=14).

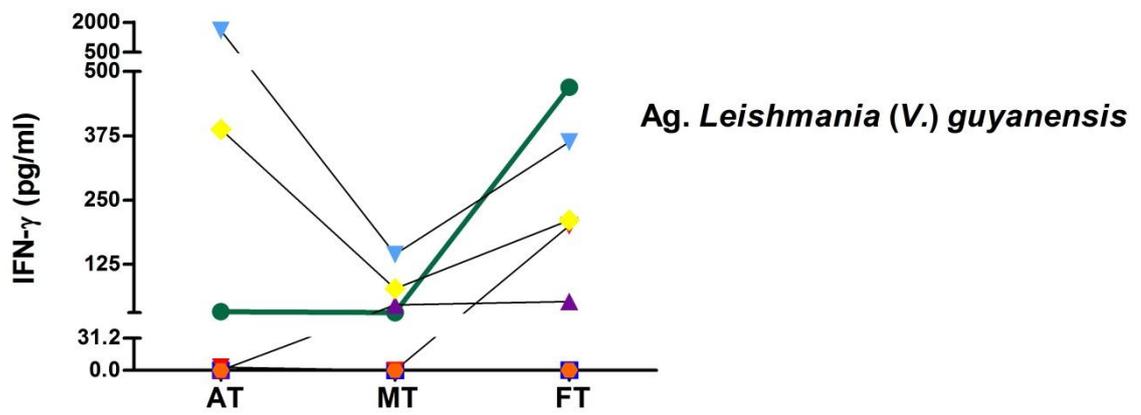
Dentre os 14 pacientes estudados, o estímulo de Lg induziu produção de IFN- γ em 8 casos, enquanto para Lb 5 casos foram secretores. Além disso, os níveis de IFN- γ foram mais elevados quando estimuladas por Lguy em comparação a Lbra. Dois pacientes produziram IFN- γ espontaneamente, ou seja, nas culturas controle, e 12 casos foram secretores frente à Tg.

É importante salientar que os pacientes produtores de IFN- γ para o estímulo de Lg não são os mesmos produtores para Lb. De fato, quatro pacientes (002/16, 005/16, 007/16 e 008/16) foram produtores em ambos os estímulos e por essa razão estão graficamente coloridos na figura 8.

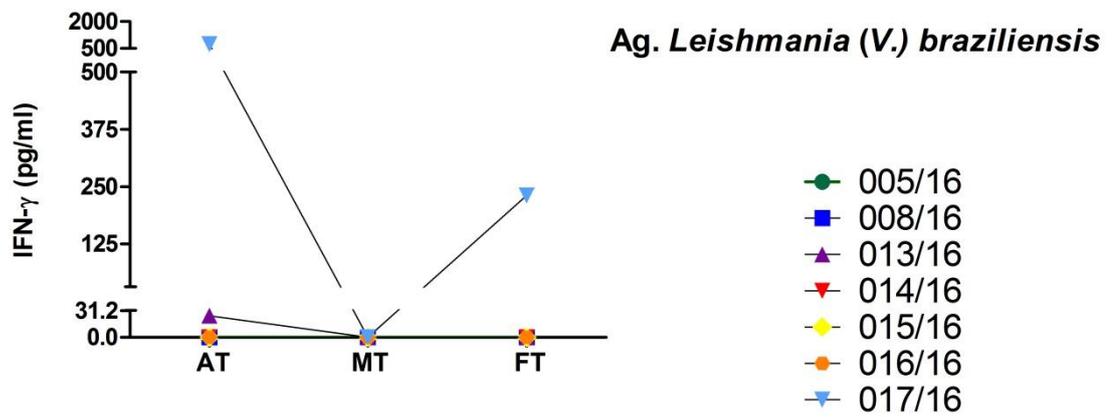
4.3.3 Quantificação de IFN- γ no sobrenadante de células mononucleares de sangue periférico dos pacientes de leishmaniose cutânea acompanhados na doença ativa, meio do tratamento e fim de tratamento.

A figura 9, mostra o resultado de IFN- γ para os 7 pacientes acompanhados longitudinalmente. Destes, três produziram IFN- γ em resposta a Lg antes do tratamento, dentre eles o caso que apresentou falha terapêutica (005/16), embora com níveis muito baixos. Os dois pacientes com níveis elevados de IFN- γ apresentaram redução da produção desta citocina especificamente no meio de tratamento, O mesmo se passou com o paciente com altos níveis de IFN- γ em resposta à L.b. Por outro lado, apenas um paciente não produziu IFN- γ frente ao estímulo com Tg, mas que recuperou ao longo do acompanhamento.

A



B



C

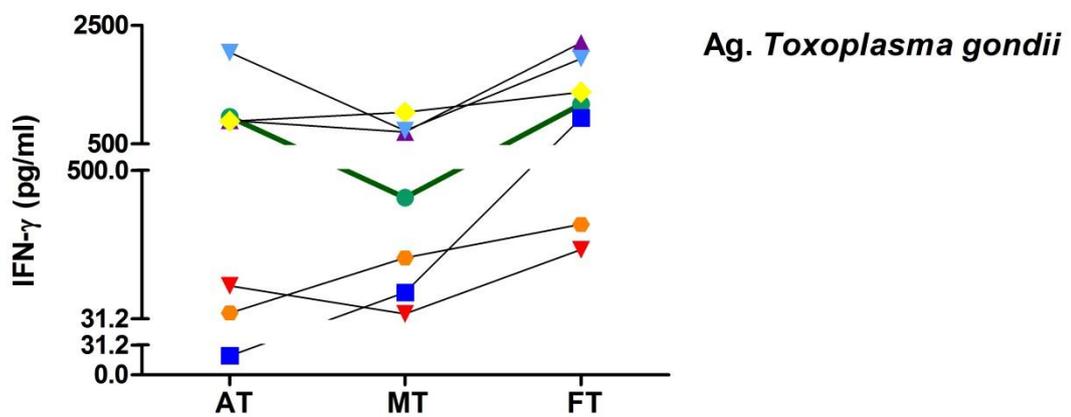


Figura 9 - Produção de IFN- γ por células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de pacientes com leishmaniose cutânea antes (AT), durante (MT) e após o fim do tratamento (FT). As CMSP foram cultivadas frente exposição a antígenos de *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Lg); *L.(V.) braziliensis* (Lb) e *Toxoplasma gondii* (Tg) e o sobrenadante foi coletado após o 5º dia em cultivo. Cada ponto representa um paciente (n=7). Cada ponto representa um paciente unido por uma linha. A linha verde representa o paciente que apresentou falha terapêutica ao antimonial pentavalente (005/16). A análise estatística foi realizada pelos métodos Mann-U-Whitney e t pareado.

4.4 Características fenotípicas e funcionais de linfócitos T de pacientes de leishmaniose cutânea na doença ativa, durante e após o tratamento anti-*Leishmania*.

Os resultados de imunofenotipagem das CMSP estão divididos em quatro seções principais. A primeira descreve o fenótipo celular das células T (percentual de T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻) e o grau de ativação desses fenótipos de acordo com os receptores HLA-DR e CD69. A segunda seção avalia o percentual das células T de memória efetora em T CD4⁺ e T CD4⁻ (TME). A terceira seção tem por intuito mostrar o perfil de expressão do fenótipo senescente em células T (T CD4⁺ e T CD4⁻), ao longo do acompanhamento do estudo. A quarta e última seção desse item mostra o percentual de células T regulatórias secretoras de IL-10 para os pacientes de leishmaniose cutânea ao longo do acompanhamento terapêutico.

No item **anexo**, encontram-se resultados preliminares sobre o percentual de células NK e NKT, e células T (T CD4⁺ e T CD4⁻) produtoras de citocinas, além de granzima; durante acompanhamento terapêutico de um paciente. No **anexo** também estão as tabelas com os percentuais de todas as células T de memória (TME, TMC, Tnaive e TEMRA) para os fenótipos avaliados, além de demonstrar o grau de ativação destas células de acordo com a expressão dos receptores CD38 e HLA-DR.

4.4.1 Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻, em pacientes com leishmaniose cutânea, na doença ativa e ao longo do tratamento anti-Leishmania.

Seis pacientes foram incluídos nesta análise, todos em questão obtiveram sucesso terapêutico. A figura 10 mostra os percentuais médios de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻, para as condições *ex vivo* e após cultivo *in vitro* mediante diferentes estímulos antigênicos. Os níveis circulantes de células T e seus fenótipos não são alterados antes, durante e após o tratamento. Quando se estimula as CMSP *in vitro*, nos devidos períodos de acompanhamento, também se observa que o estímulo antigênico não modula os percentuais destas células, já que é observado, aproximadamente, a mesma frequência para estas antes, durante e após o tratamento.

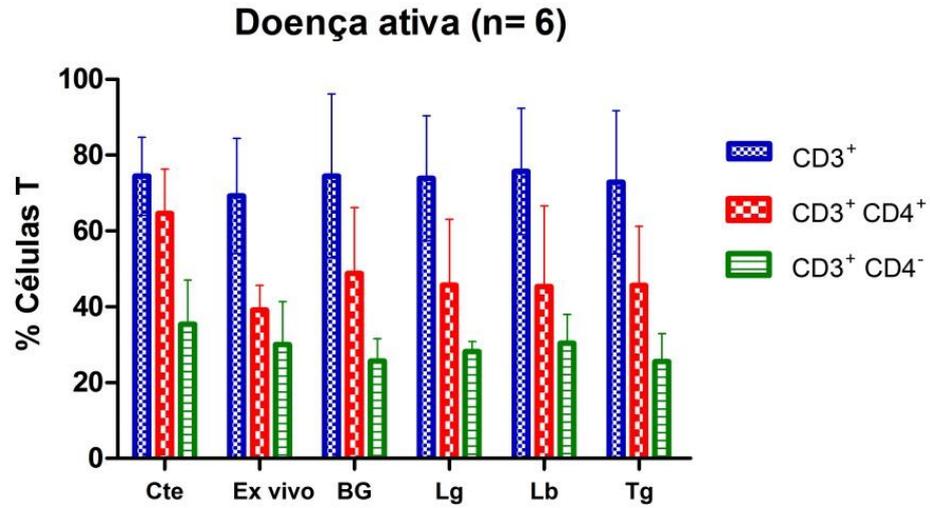
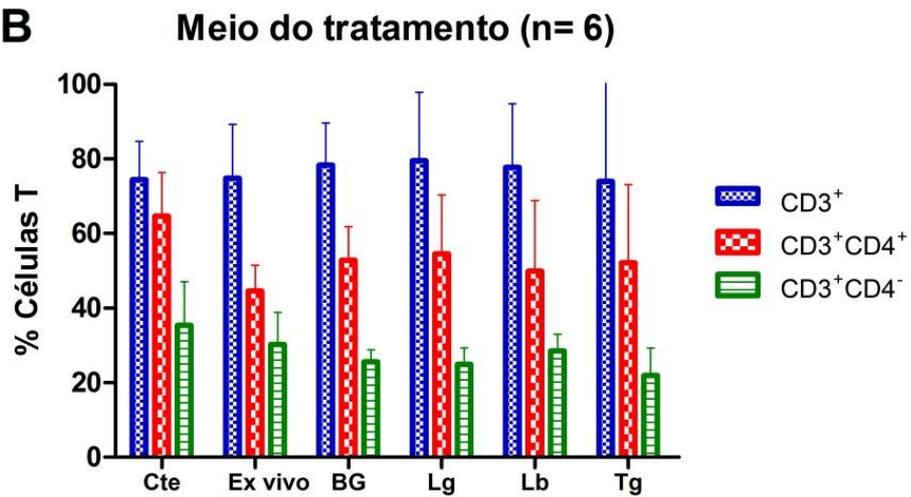
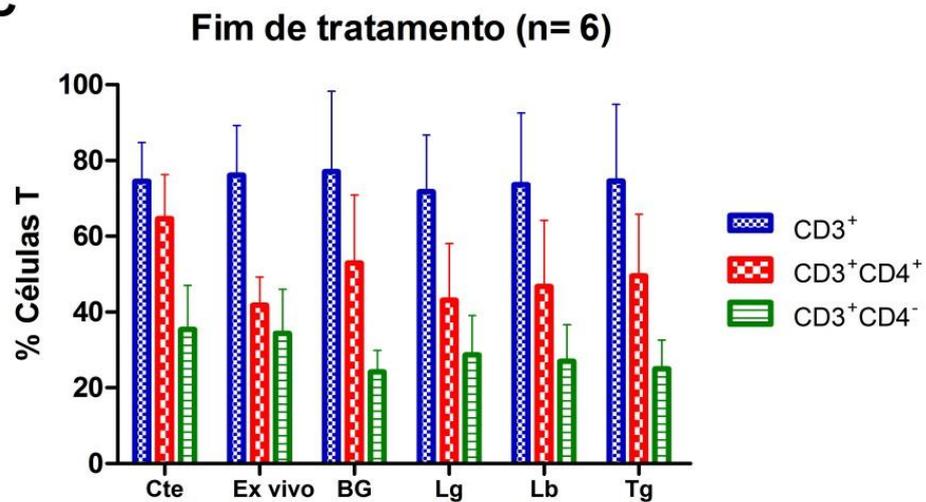
A**B****C**

Figura 10: Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ circulantes e após cultivo *in vitro* em pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo*, e *in vitro* após o 5^o dia de cultivo com antígenos de *L. braziliensis* (Lb); *L. (V.) guyanensis* (Lg); *T. gondii* (Tg) e na ausência de estímulo (BG). A imagem A mostra o percentual de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ antes do início do tratamento. A imagem B mostra essas células no meio do tratamento, e a imagem C ao final do tratamento. Os valores estão expressos em média acompanhados do desvio-padrão para cada grupo. O grupo controle é composto por cinco indivíduos de área endêmica sem histórico de LTA

4.4.2 Frequência de células T (CD3⁺) ativadas, e dos fenótipos T CD4⁺ e T CD4⁻ em função dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR nos pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento.

O grau de ativação das células T frente ao estímulo com antígenos de *Leishmania* foi avaliada pela expressão na membrana de HLA-DR e CD69, nas subpopulações fenotipicamente definidas como células T CD4⁺ e T CD4⁻.

A figura 11 mostra como a estimulação antigênica das CMSP após cinco dias com os antígenos parasitários já citados interferiu na expressão desse receptor em células: T; T CD4⁺ e TCD4⁻ (respectivamente, e da esquerda para a direita da imagem). A linha horizontal escura em cada gráfico equivale à mediana daquele grupo e seus respectivos interquartis (25% e 75%).

A avaliação foi feita nos três tempos de acompanhamento de cada paciente incluído no estudo (“antes do tratamento”; “meio do tratamento” e “fim do tratamento”, respectivamente e de cima para baixo).

A imagem mostra que de maneira geral, o antígeno não foi capaz de induzir nas CMSP a maior expressão desse receptor quando comparado às células que não foram submetidas ao estímulo (BG - background), já que não foi observada significância estatística entre nenhuma análise realizada ($p > 0,05$ – kruskall-wallis). No entanto, a dispersão individual de cada paciente pode mostrar que o estímulo de *Leishmania (V.) braziliensis* e *T. gondii* foi capaz de estimular as células a estar em um estado ativado com maior intensidade do que o antígeno de *Leishmania (V.) guyanensis*.

Já a avaliação do marcador CD69 de ativação precoce, mostrou-se diferente do que para HLA-DR. Onde foi nítido observar, em todos os fenótipos e tempos de acompanhamento avaliados, que o estímulo antigênico induzia a expressão do marcador, indicando que as CMSP foram ativadas (figura 12).

Na fase de doença ativa, a população total de células T CD3⁺ e as subpopulações fenotípicas analisadas expressam mais CD69 após estimulação *in vitro* com antígeno de *L. (V.) braziliensis* ($p < 0,009$) do que os demais antígenos. É interessante avaliar que os pacientes antes de iniciar o tratamento apresentam maiores percentuais de ativação celular, baseada nesse marcador, e que essa frequência de expressão vai decaindo ao longo do tratamento, onde no último tempo analisado (“final de tratamento”) em geral, as medianas têm valores 10% menores do que aquelas para o tempo “antes do tratamento”.

A rigor, não houve definição de células T CD8⁺, somente do fenótipo T CD4⁻, no entanto, estas se mostram como as mais importantes respondedoras ao estímulo de *L. (V.) guyanensis*, já que nos três períodos temporais acompanhados, houve um aumento significativo na expressão do CD69 após a estimulação *in vitro*; mas vale salientar que, assim como a percentagem de ativação celular avaliada pelo marcador CD69 diminui no período “fim de tratamento” quando comparado aos outros dois iniciais, há concomitante redução na expressão desse marcador para as CMSP estimuladas com Ag-Lg comparadas com BG, ou seja, a ação do estímulo antigênico sobre as células T CD8⁺ é menos intensa no fim do tratamento quando comparado ao período inicial avaliado. É possível se observar tal fato comparando-se o valor p de BG *versus* Lg no período antes do tratamento (imagem C, figura 12; $p = 0,008$) e no final do tratamento (imagem I, figura 12; $p = 0,016$).

Antes do tratamento

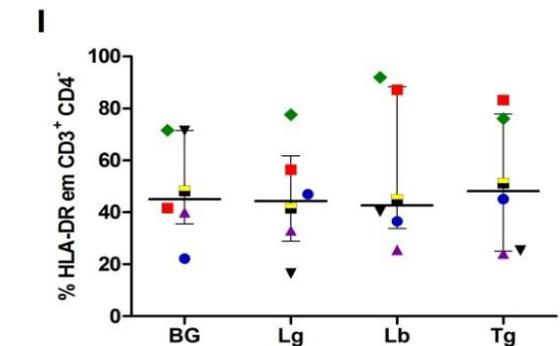
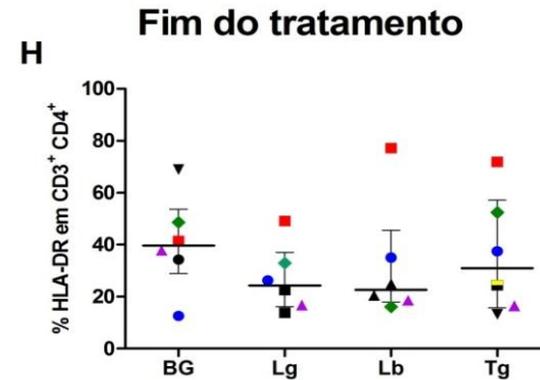
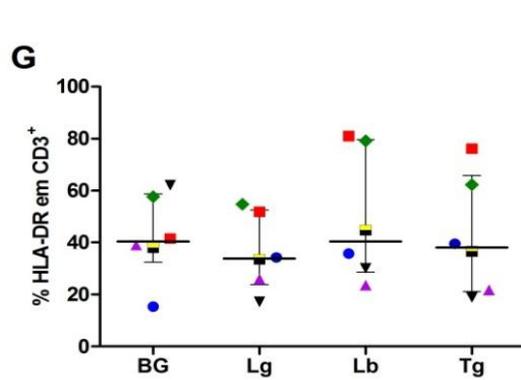
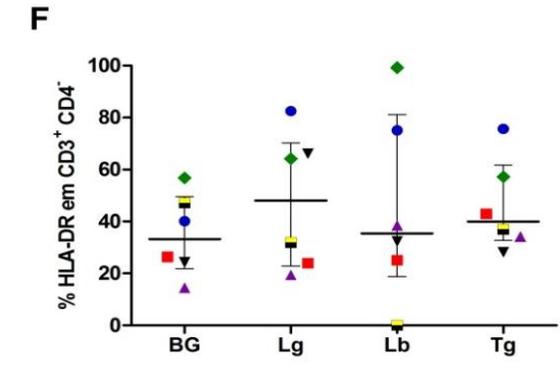
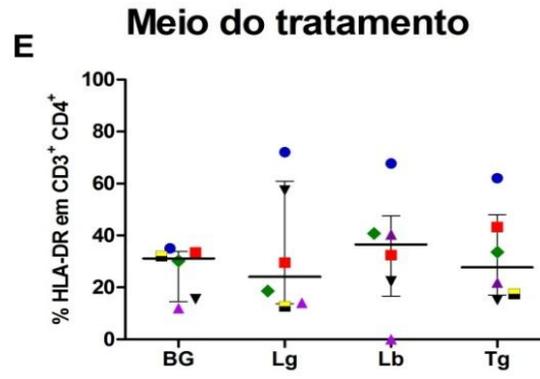
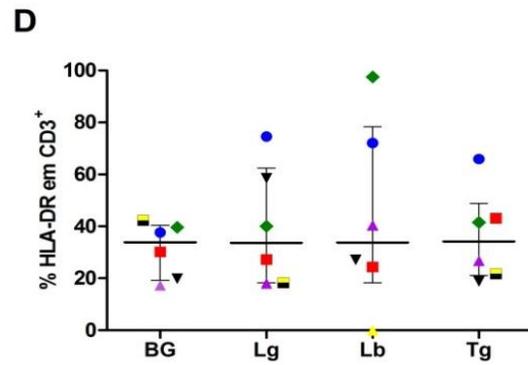
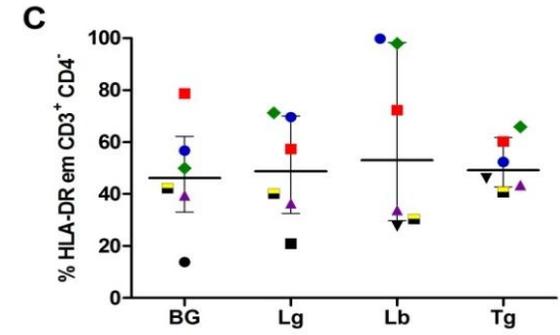
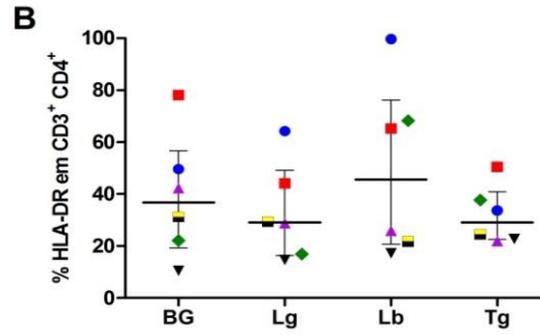
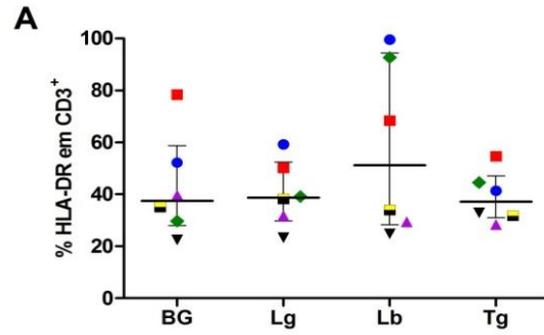


Figura 11: Frequência de HLA-DR em células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻ dos pacientes com leishmaniose cutânea após estimulação *in vitro*; em doença ativa e ao longo do tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas para o percentual de linfócitos T CD3⁺ que expressam HLA-DR quando estimulados *in vitro* com antígenos de *Leishmania (V) guyanensis* (Ag-Lg); *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *Toxoplasma gondii* (Ag-Tg) em relação àquelas não estimuladas (BG-background). Imagem A-C: células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻, respectivamente dos seis pacientes com acompanhamento terapêutico completo no período “antes do tratamento”; imagem D-F: células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻, respectivamente dos seis pacientes com acompanhamento terapêutico completo no período “meio do tratamento” e imagem G-I: células T (CD3+), T CD4+ e T CD4-, respectivamente dos seis pacientes com acompanhamento terapêutico completo no período “fim de tratamento”. A linha horizontal em cada grupo de análise mostra o valor de mediana para esse grupo, e seus interquartis (25% e 75%). A representação dos pacientes é feita graficamente como a seguir: 008/16 (●); 013/16 (●); 014/16 (●); 015/16 (●); 016/16 (●) e 017/16 (●). Não houve significância estatística entre nenhum grupo avaliado ($p > 0,05$ – Wilcoxon teste).

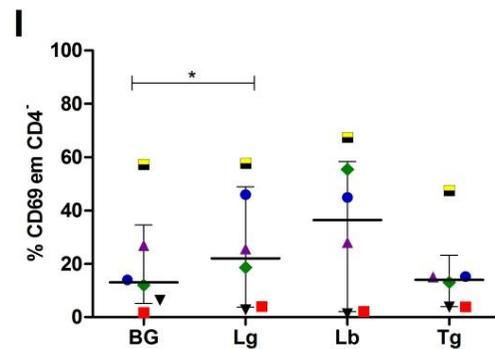
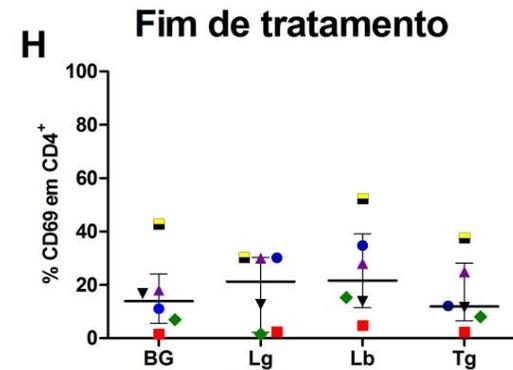
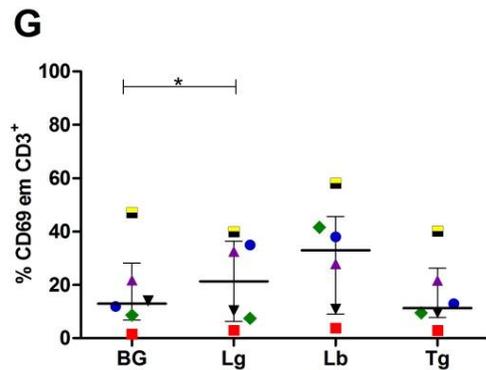
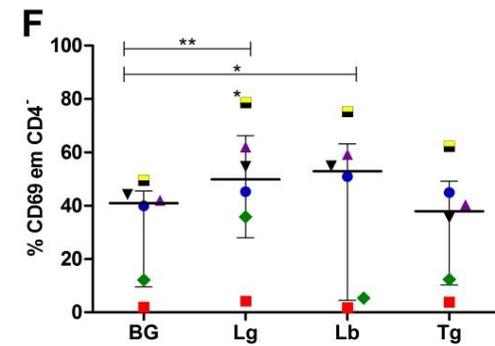
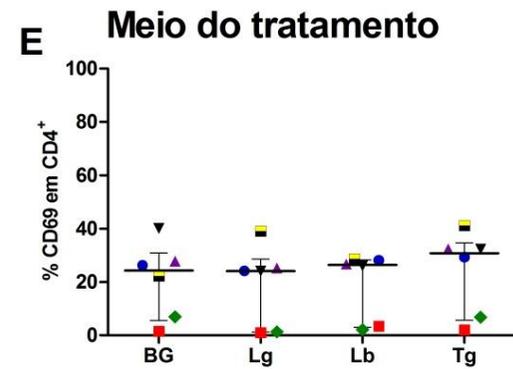
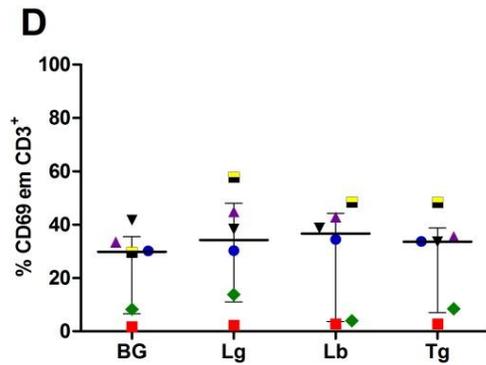
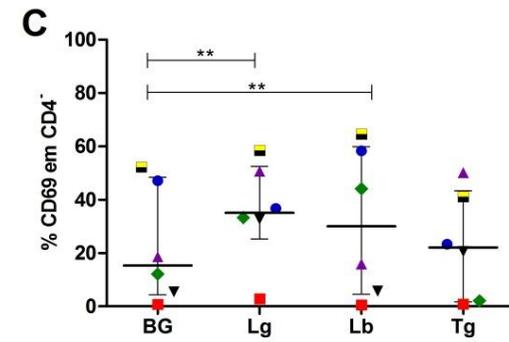
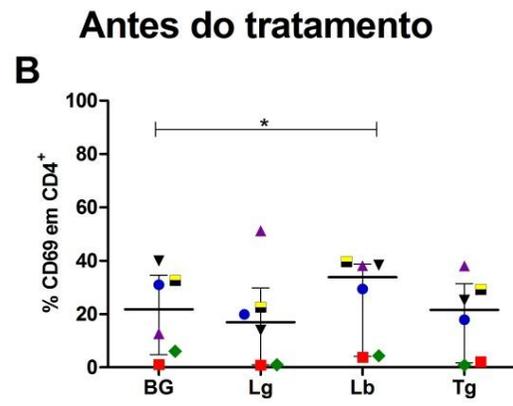
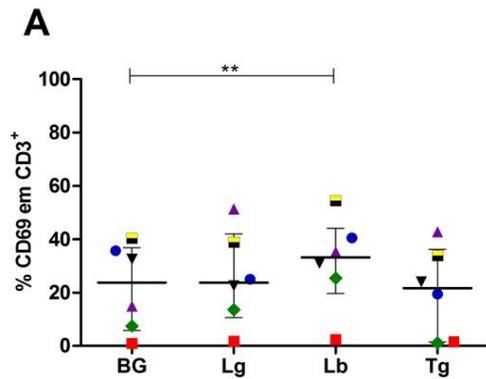


Figura 12: Frequência de CD69 em células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻ dos pacientes com leishmaniose cutânea após estimulação *in vitro*; em doença ativa e ao longo do tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas para o percentual de linfócitos T CD3⁺ que expressam CD69 quando estimulados *in vitro* com antígenos de *Leishmania (V) guyanensis* (Ag-Lg); *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *Toxoplasma gondii* (Ag-Tg) em relação àquelas não estimuladas (BG- *background*). Imagem A-C: células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻, respectivamente dos seis pacientes com acompanhamento terapêutico completo no período “antes do tratamento”; imagem D-F: células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻, respectivamente dos seis pacientes com acompanhamento terapêutico completo no período “meio do tratamento” e imagem G-I: células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻, respectivamente dos seis pacientes com acompanhamento terapêutico completo no período “fim de tratamento”. A linha horizontal em cada grupo de análise mostra o valor de mediana para esse grupo, e seus interquartis (25% e 75%). A representação dos pacientes é feita graficamente como a seguir: 008/16 (●); 013/16 (●); 014/16 (●); 015/16 (●); 016/16 (●) e 017/16 (●). * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$, Teste *t* pareado não paramétrico.

4.4.3 Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ circulantes e após estímulo *in vitro*; na doença ativa e ao longo do tratamento em paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.

O paciente que apresentou falha terapêutica (005/16) teve uma avaliação individual do percentual de suas células T e seus perfis de memória. Como apenas um paciente se enquadrou nesse grupo, os resultados serão expressos em percentual de cada população celular.

O resultado do percentual de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ estão na figura 13. Apesar da marcante diminuição de células T CD3⁺CD4⁺ em relação às células T CD3⁺CD4⁻ durante o cultivo e estimulação antigênica em todos os períodos (antes, meio e fim de tratamento) observados quando comparado aos controles, não foi possível realizar nenhuma inferência estatística.

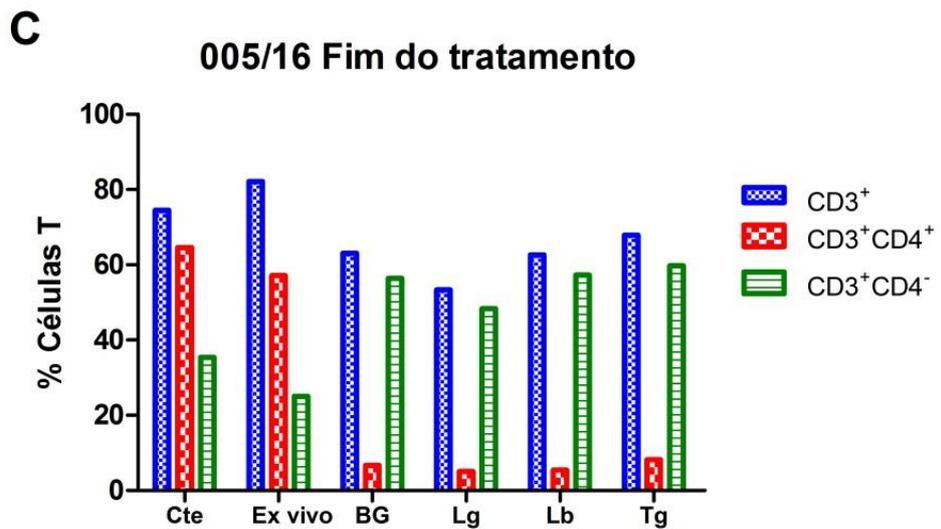
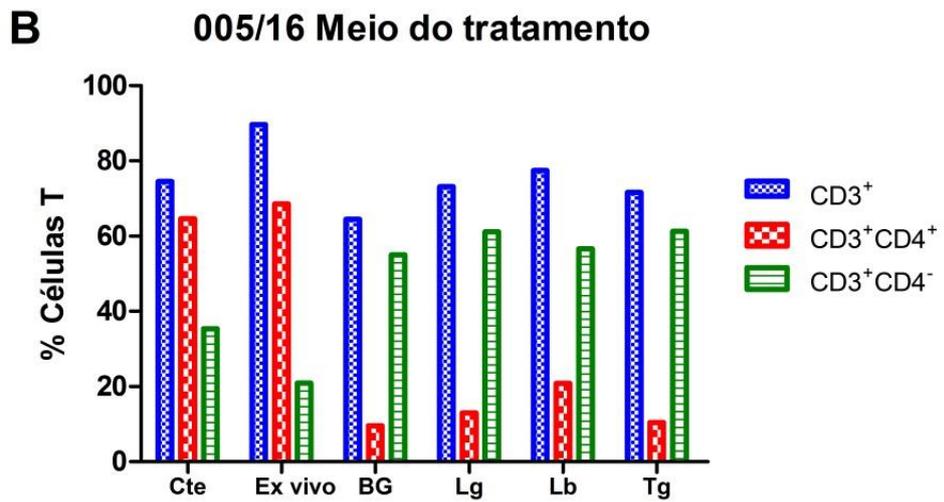
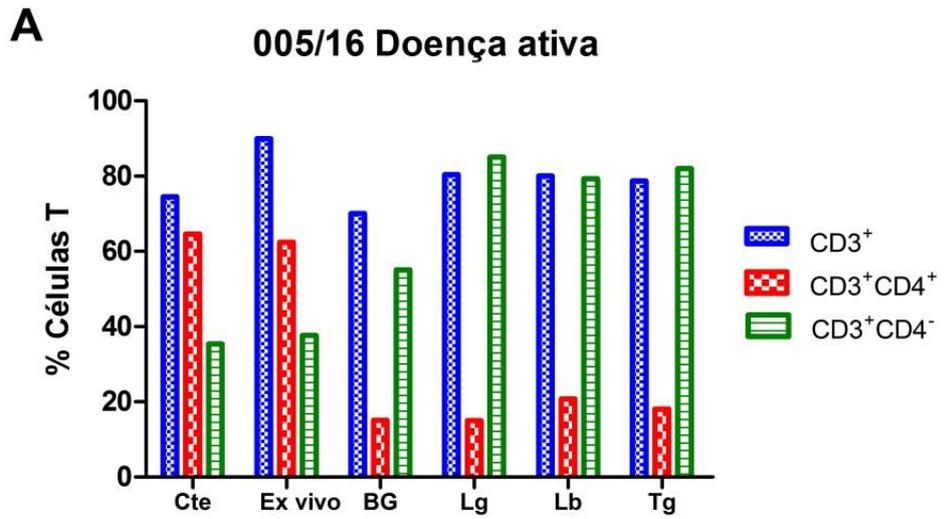


Figura 13 - Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ circulantes e após cultivo *in vitro*; antes, durante e após tratamento de paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha ao antimonial pentavalente. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo*, e *in vitro* após o 5º dia de cultivo com antígenos de *L. braziliensis* (Lb); *L. (V.) guyanensis* (Lg); *T. gondii* (Tg) e na ausência de estímulo (BG). A imagem A mostra o percentual de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ antes do início do tratamento. A imagem B mostra essas células no meio do tratamento, e a imagem C ao final do tratamento. Os valores estão expressos em percentual absoluto. O grupo controle é composto por cinco indivíduos de área endêmica sem histórico de LTA

4.4.4 Frequência de células T (CD3⁺) ativadas, e dos fenótipos T CD4⁺ e T CD4⁻ em função dos marcadores de ativação CD69 e HLA-DR no paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento.

Foi realizada uma análise mais ampla e robusta da ativação das células T e seus principais fenótipos, utilizando como marcadores as moléculas de ativação HLA-DR e CD69.

A figura 14 mostra o percentual das células que expressam a molécula HLA-DR em sua superfície dentre as células circulantes (*ex vivo*) e após estimulação *in vitro* com antígenos parasitários específicos. Na figura 15 é possível observar que as células T CD3⁺CD4⁺ são as que se mostram mais ativadas pela expressão de CD69. Tal ativação é maior antes e durante o tratamento, além de ser mais frequente quando para as CMSP estimuladas com antígeno de *L. (V.) braziliensis*.

Já a Figura , mostra o percentual de linfócitos T que expressam o marcador precoce de ativação, CD69. Para essa molécula, é observado que apenas no meio do tratamento é que as células T e seus fenótipos passam a expressar CD69 em quantitativo a ser considerado. A expressão de CD69 se mantém após o fim do tratamento, e assim como descrito para HLA-DR (figura 15), as células T CD3⁺ CD4⁺ são o principal tipo celular que tem a expressão de CD69 modulada positivamente em decorrência da avaliação *in vitro*.

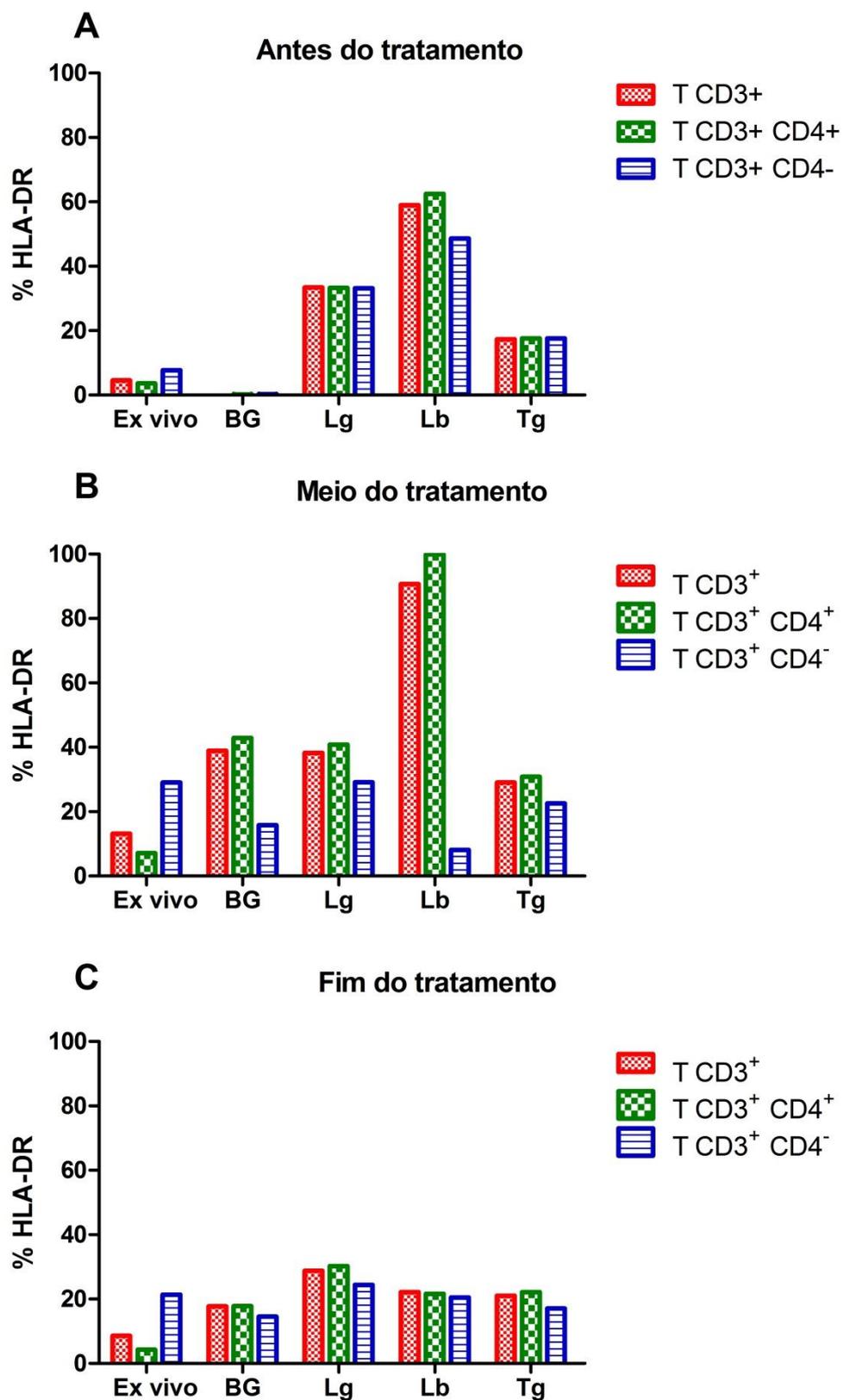


Figura 14: Frequência da expressão do receptor HLA-DR em células T circulantes (ex vivo) e *in vitro* após estímulo antigênico em células T e seus fenótipos T CD4⁺ e T CD4⁻ no paciente que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo* e no 5º dia (*in vitro*) de cultivo na ausência de estímulo (BG) e com antígenos específicos: *L. braziliensis* (Lb); *L. (V.) guyanensis* (Lg); *T. gondii* (Tg). As imagens A, B e C mostram respectivamente o paciente 005/16 na doença ativa, durante e após o tratamento. A figura representa as frequências de HLA-DR em linfócitos T e seus fenótipos em percentual absoluto.

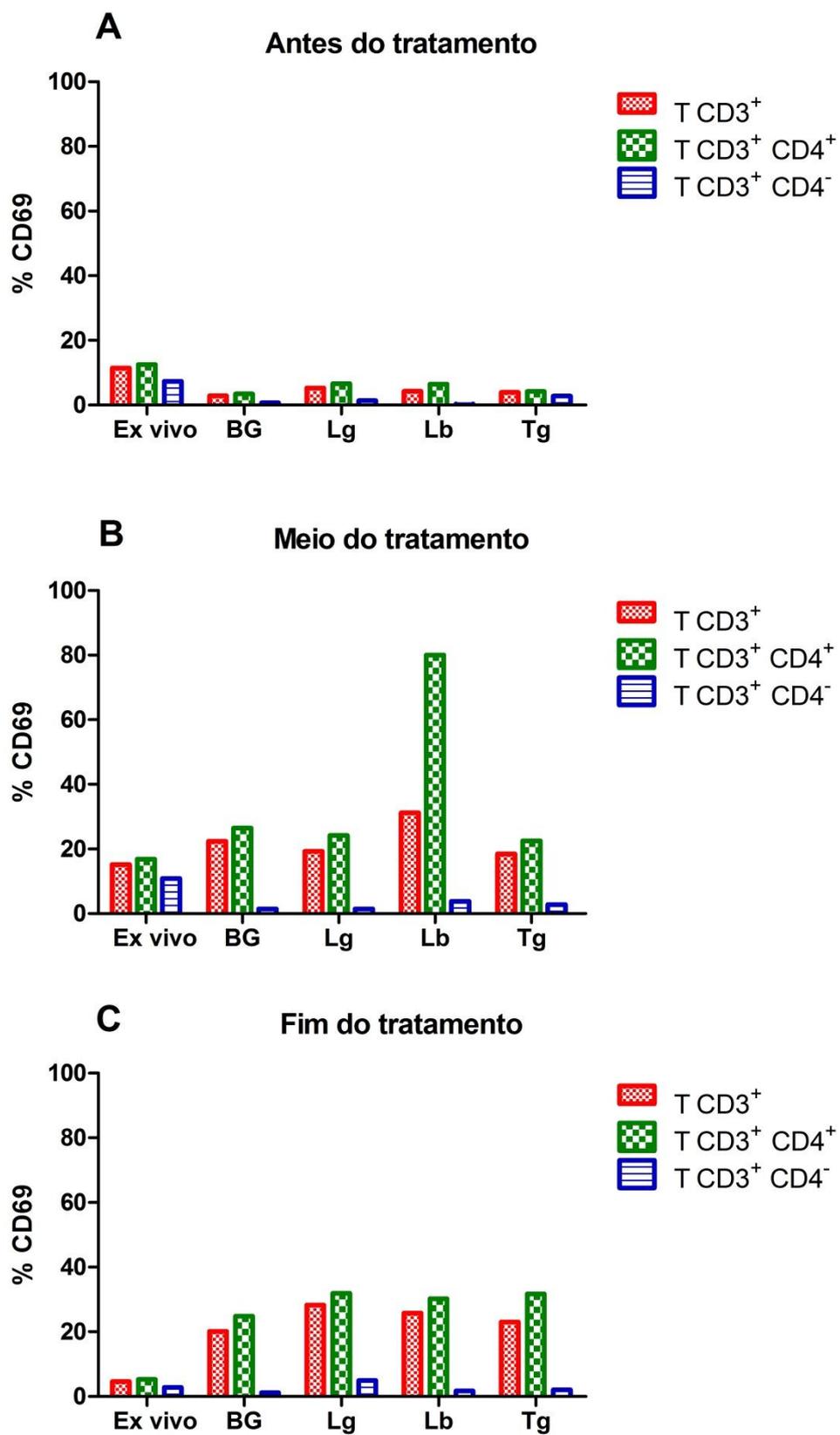


Figura 15: Frequência da expressão do receptor CD69 circulantes (*ex vivo*) e *in vitro* após estímulo antigênico em células T e seus fenótipos T CD4⁺ e T CD4⁻ no paciente que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo* e no 5º dia (*in vitro*) de cultivo na ausência de estímulo (BG) e com antígenos específicos: *L. braziliensis* (Lb); *L. (V.) guyanensis* (Lg); *T. gondii* (Tg). As imagens A, B e C mostram respectivamente o paciente 005/16 na doença ativa, durante e após o tratamento. A figura representa as frequências de CD69 em linfócitos T e seus fenótipos em percentual absoluto.

4.4.5 Frequência de linfócitos T de memória efetora em pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento anti-Leishmania.

A avaliação dos perfis de memória de célula T dos indivíduos de área endêmica (controles) está expressa na Tabela 3 do **anexo**.

Para a melhor visualização do perfil de resposta de cada indivíduo, frente a um antígeno, e mostrar que esse padrão de resposta pode diferir ainda na doença ativa e ao longo do tratamento, foi confeccionada a figura 16, que mostra de maneira individual como é o comportamento dos indivíduos sadios de área endêmica (controles) para a população de TME.

Já as tabelas Tabela 4, Tabela 5 e Tabela 6 (anexo) mostram a frequência das células T de memória avaliadas *ex vivo* e *in vitro* para os pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento. A figura 17 e figura 18 mostra a avaliação individual do percentual de células TME tanto para os pacientes durante o acompanhamento do estudo. Essa análise foi importante para inferir que mesmo todos os pacientes desse grupo (n=6) tenham obtido sucesso terapêutico, há uma variação em como cada paciente interage com o estímulo antigênico. Uma avaliação individual é importante para melhor compreensão dos valores de mediana, *fold* e valor de *p* descrito nas tabelas. O perfil de ativação dessas células T de memória encontra-se no **anexo**.

O perfil de frequência de células T de memória e seus perfis de ativação para o paciente que teve falha terapêutica encontra-se no **anexo**.

Controles (n=5)

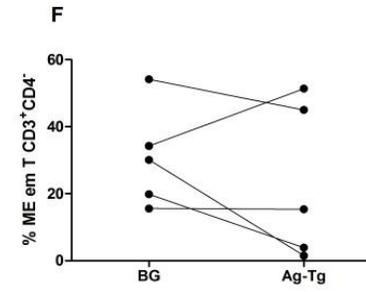
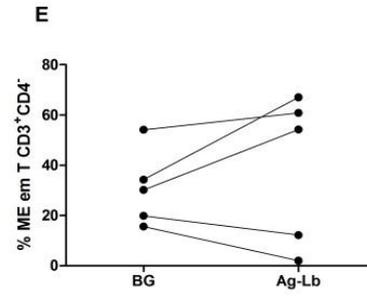
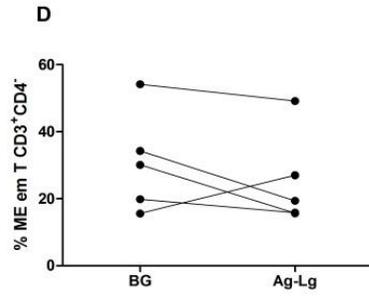
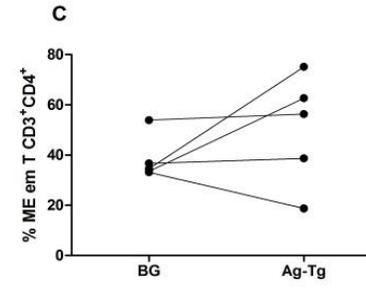
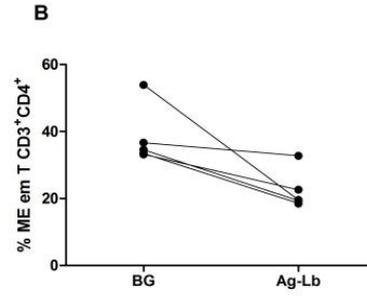
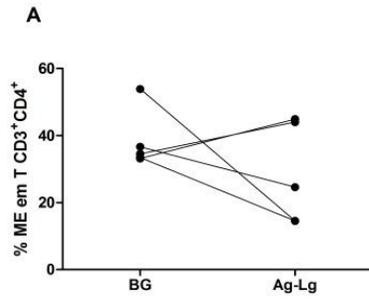
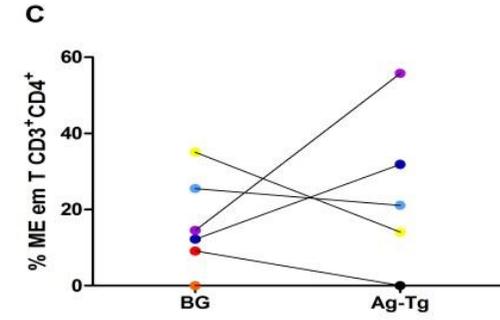
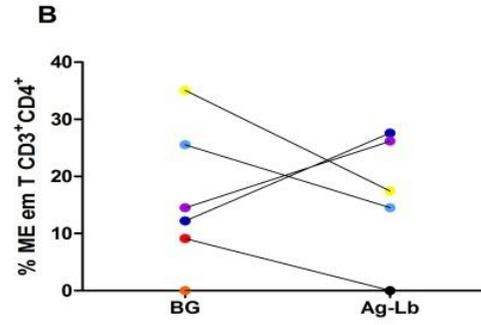
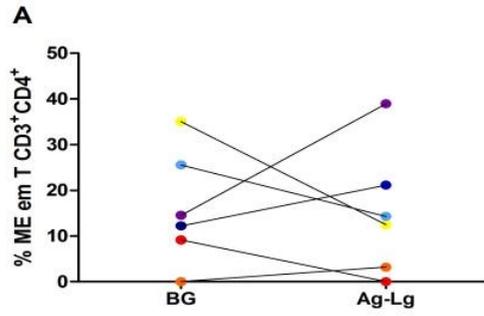
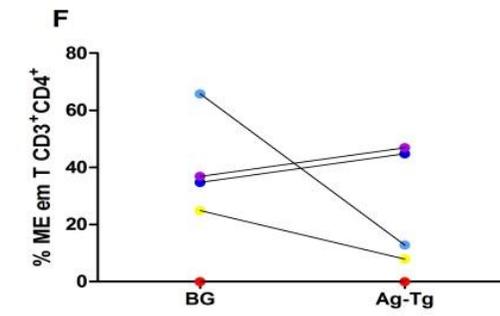
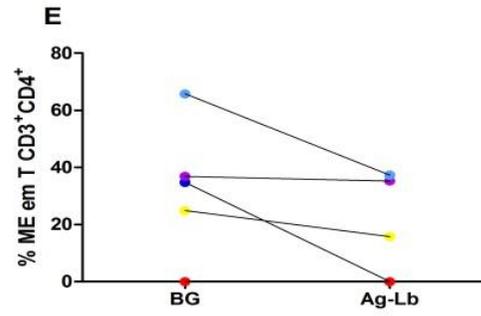
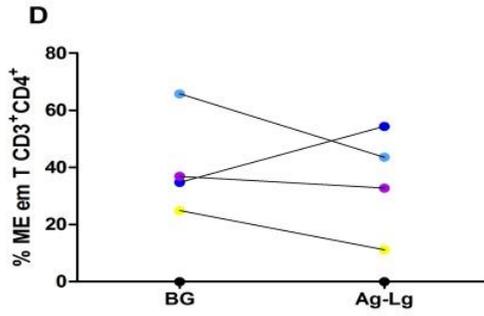


Figura 16: Frequência de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ de memória efetora nos indivíduos sadios de área endêmica após cultivo com antígenos parasitários específicos. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas após estimulação *in vitro* (5º dia) com antígenos de *L. (V) guyanensis* (Ag-Lg); *L. (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *T. gondii* (Ag-Tg). O percentual de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ de memória efetora é avaliado em relação às células não estimuladas (BG- background). Os gráficos A-C representam os ensaios *in vitro* realizados para o fenótipo T CD3⁺CD4⁺; D-F aqueles para o fenótipo T CD3⁺CD4⁻.

Doença ativa (n =6)



Meio do tratamento (n =6)



Fim do tratamento (n =6)

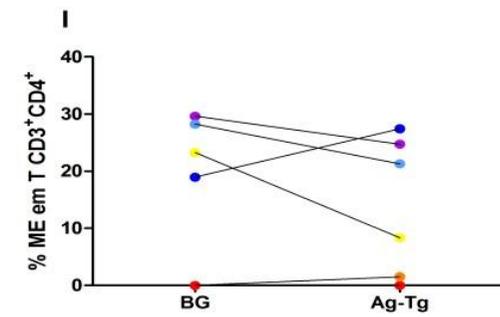
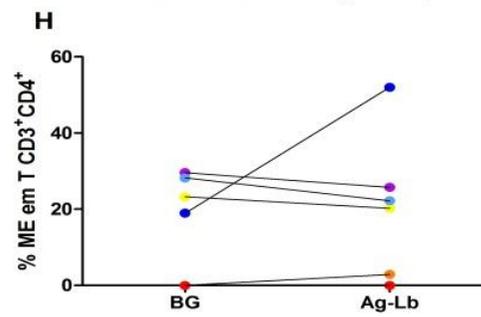
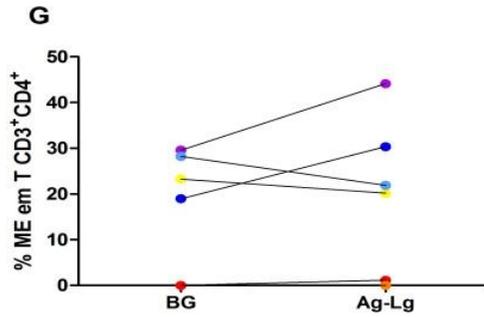
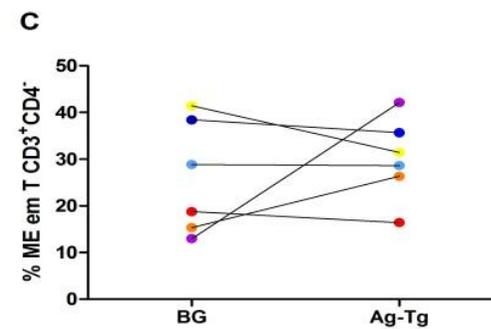
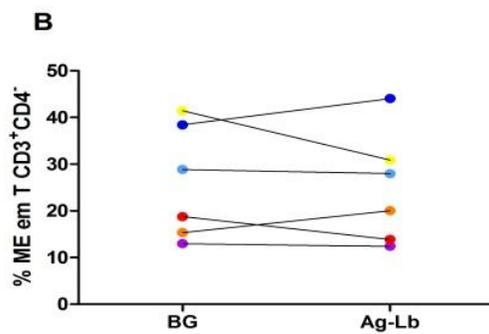
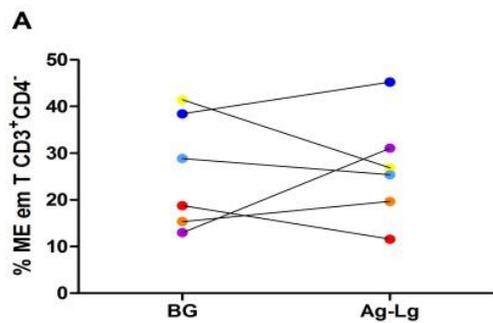
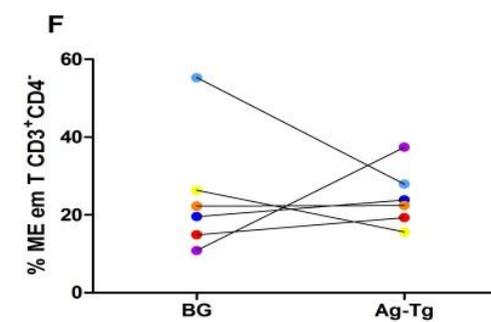
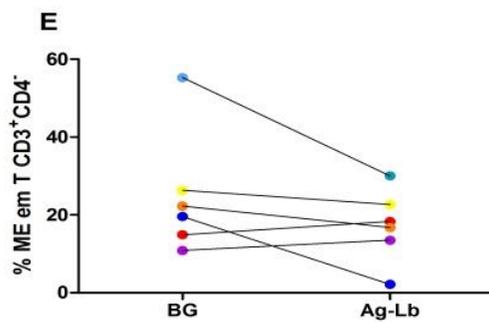
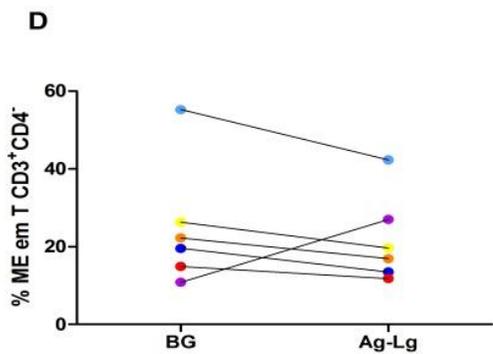


Figura 17: Frequência *in vitro* de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ de memória efetora em pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento anti-*Leishmania*. Representação individual do percentual de células T CD3⁺CD4⁺ de memória efetora quando estimuladas *in vitro* (5^o dia) com antígenos de *L. (V) guyanensis* (Ag-Lg); *L. (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *T. gondii* (Ag-Tg) em relação às que não foram estimuladas (BG- *background*). Os gráficos A-C representam os ensaios *in vitro* realizados no tempo antes do início do tratamento (“doença ativa”); D-F durante o curso terapêutico (meio do tratamento); e G-I no fim do tratamento. A representação dos pacientes é feita graficamente como a seguir: 008/16 (●); 013/16 (●); 014/16 (●); 015/16 (●); 016/16 (●) e 017/16 (●).

Doença ativa (n =6)



Meio do tratamento (n =6)



Fim do tratamento (n =6)

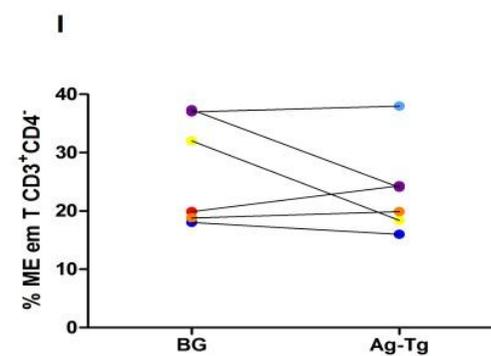
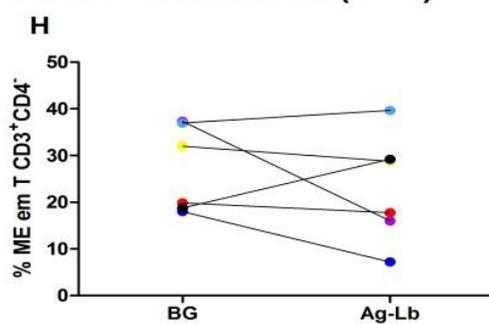
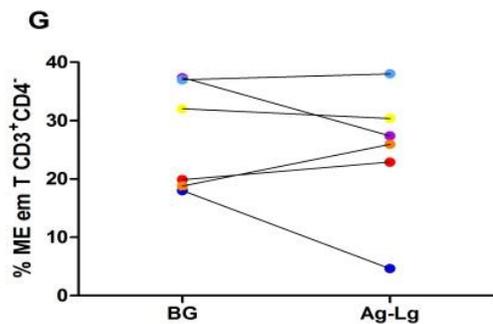


Figura 18: Frequência *in vitro* de linfócitos T CD3⁺CD4⁻ de memória efetora em pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento anti-*Leishmania*. Representação individual do percentual de células T CD3⁺CD4⁻ de memória efetora quando estimuladas *in vitro* (5^o dia) com antígenos de *L. (V) guyanensis* (Ag-Lg); *L. (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *T. gondii* (Ag-Tg) em relação às que não foram estimuladas (BG- *background*). Os gráficos A-C representam os ensaios *in vitro* realizados no tempo antes do início do tratamento (“doença ativa”); D-F durante o curso terapêutico (meio do tratamento); e G-I no fim do tratamento. A representação dos pacientes é feita graficamente como a seguir: 008/16 (●); 013/16 (●); 014/16 (●); 015/16 (●); 016/16 (●) e 017/16 (●).

4.5 Frequência de células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻ em perfil de senescência celular (CD57⁺CD27⁻), nos pacientes com leishmaniose cutânea, durante doença ativa e ao longo do tratamento anti-*Leishmania*.

Foi avaliado de maneira geral, o percentual das células T e seus principais fenótipos indicativos de senescência celular. O estudo define senescência como a não expressão de um importante marcador de superfície celular de linfócitos T, o CD27, que é uma molécula co-estimulatória, ou seja, sua presença é indispensável para a correta ativação e desenvolvimento de uma resposta adequada. Células senis, em geral, não expressam esse receptor porque são incapazes de responder adequadamente a um estímulo que induza o desenvolvimento de uma resposta imune, já que dificilmente gerarão células efetoras competentes para desempenhar sua função. Já o CD57 é um clássico marcador de senescência, sendo expressas em linfócitos, células NK e NKT do sangue periférico, e tende a ser expresso após sucessivas multiplicações celulares.

A figura 19 mostra o percentual de células senescentes dentre aquelas T CD3⁺, T CD4⁺ e T CD4⁻ de acordo com o estímulo antigênico aplicado e também *ex vivo*. Os valores na figura 19 estão expressos em média do percentual, com a representação do desvio-padrão para cada grupo. Não houve diferença estatística entre nenhuma análise realizada ($p > 0,05$ – Kruskal-Wallis).

É possível observar que as células T CD3⁺CD4⁻ apresentam os maiores percentuais de senescência, no entanto, não há diferença na frequência da população senescente em decorrência do cultivo *in vitro*.

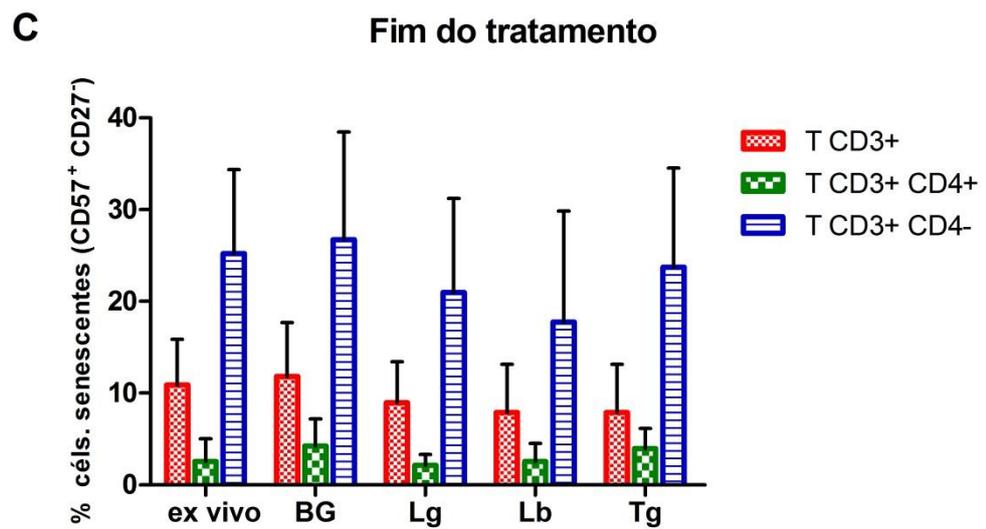
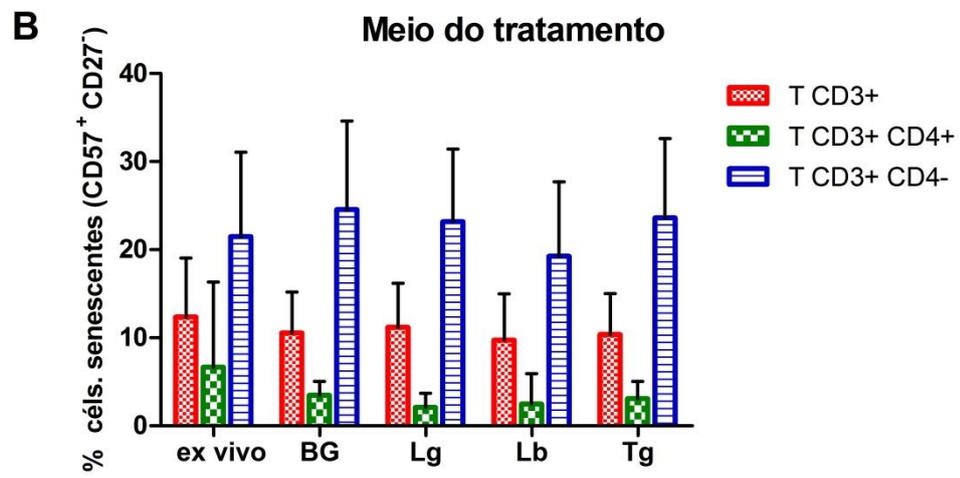
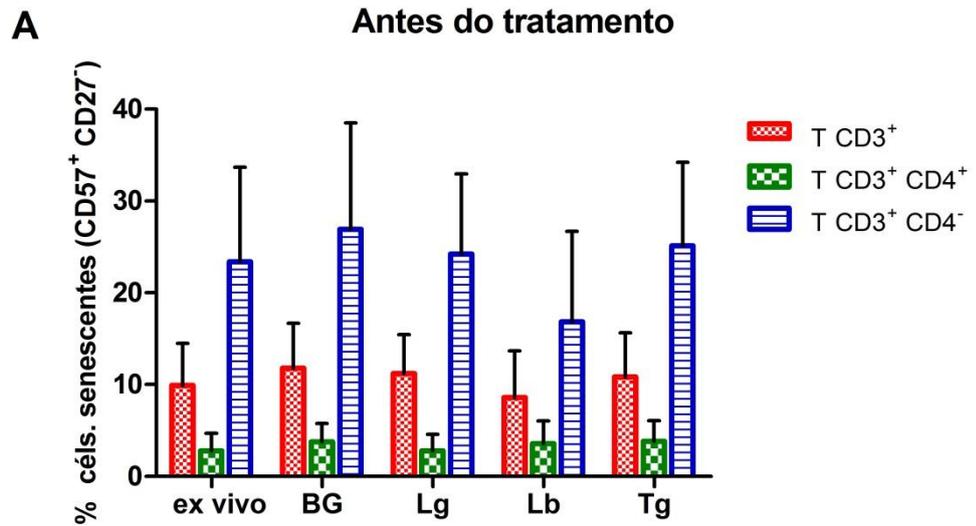


Figura 19: Frequência de células senescentes em linfócitos T CD3⁺, T CD3⁺ CD4⁺ e T CD3⁺ CD4⁻ circulantes (ex vivo), e frente a estímulos antigênicos em pacientes com leishmaniose cutânea; antes, durante e após o tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo* e no 5º dia após cultivo, na ausência de estímulo (BG) e frente antígenos específicos: *Leishmania (V) guyanensis* (Ag-Lg); *Leishmania (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *Toxoplasma gondii* (Ag-Tg). Os resultados da imagem estão em média seguido de desvio-padrão para determinado grupo. As imagens A, B e C representam respectivamente, avaliações na doença ativa, meio e fim do tratamento.

4.5.1 Frequência de células T (CD3⁺), T CD4⁺ e T CD4⁻ em perfil de senescência celular (CD57⁺CD27⁻), no paciente com leishmaniose cutânea, que apresentou falha terapêutica; antes, durante a após o tratamento.

Novamente o perfil de senescência celular usado pelo estudo, baseia-se na expressão do fenótipo CD57⁺ CD27⁻. A figura 20 abaixo mostra a representação do percentual desse fenótipo avaliado para as células T, T CD4⁺ e T CD4⁻.

A figura 20 mostra que as células T CD4⁻ são as que mais expressam um perfil fenotípico de senescência celular, e que esse processo mostra-se de forma mais marcante no meio do tratamento. No final do tratamento, a quantidade dessas células expressando tal perfil senescente, é aproximadamente intermediária entre o quantitativo observado no período antes do tratamento e meio de tratamento.

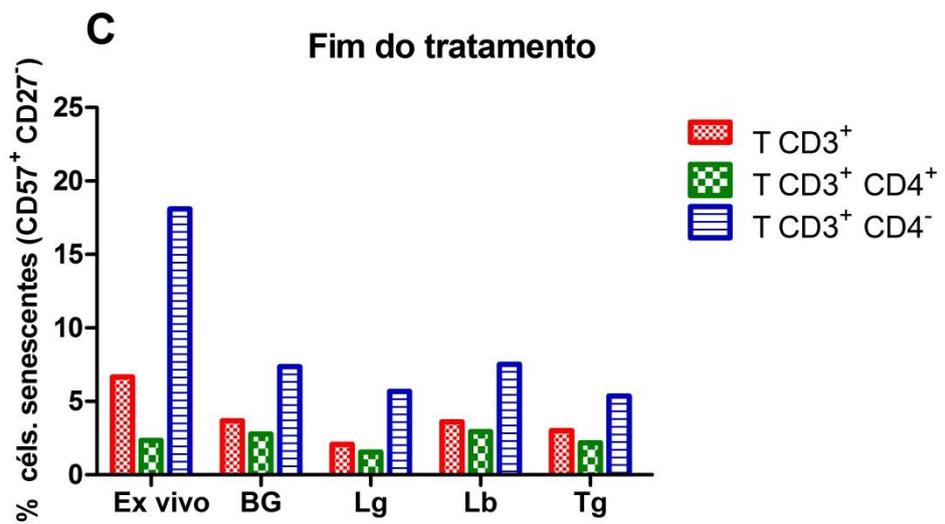
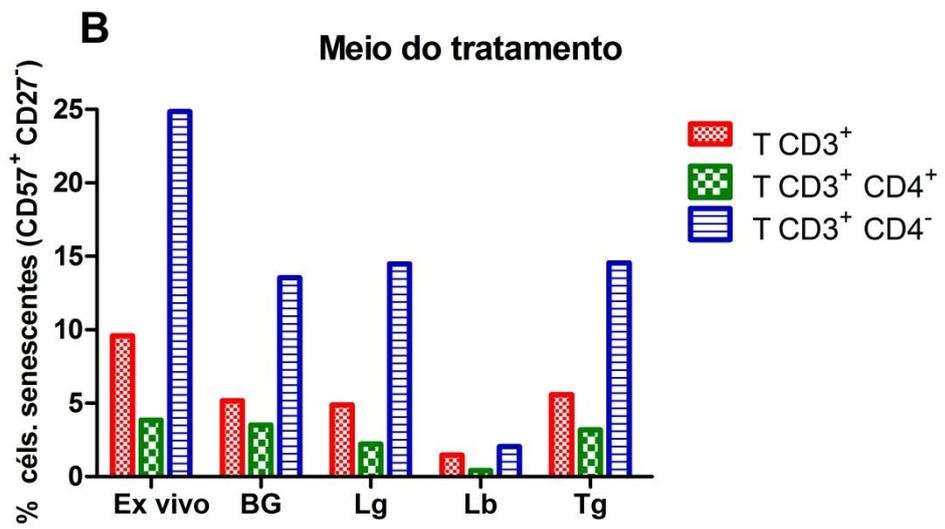
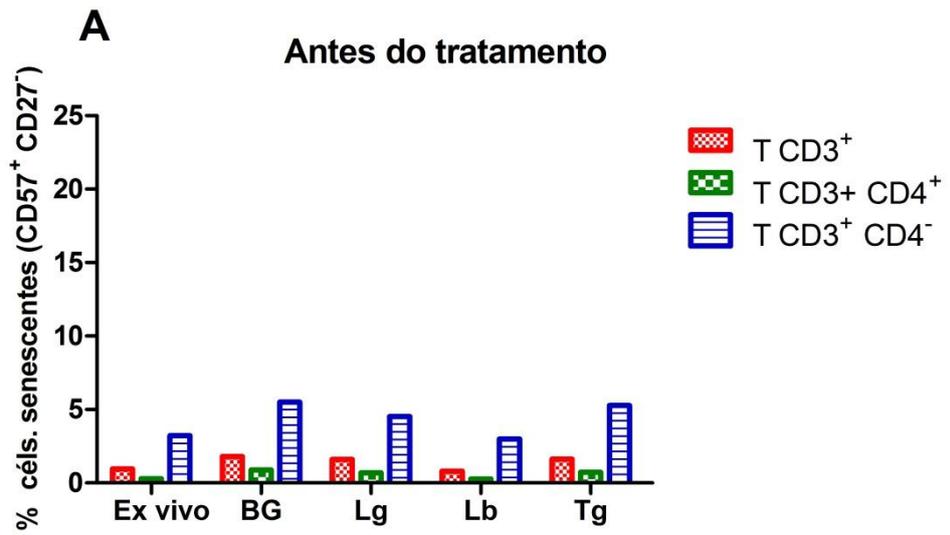


Figura 20: Frequência de células senescentes em linfócitos T CD3+, T CD3+ CD4+ e T CD3+ CD4- circulantes (ex vivo), e frente a estímulos antigênicos em paciente de leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; antes, durante e após o tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo* e no 5º dia após cultivo, na ausência de estímulo (BG) e frente antígenos específicos: *L. (V) guyanensis* (Ag-Lg); *L. (V.) braziliensis* (Ag-Lb) e *T. gondii* (Ag-Tg). Os resultados da imagem estão em percentual absoluto. As imagens A, B e C representam respectivamente, avaliações na doença ativa, meio e fim do tratamento.

4.6 Percentual de células T regulatórias em pacientes com acompanhamento terapêutico completo

O fenótipo de células T regulatórias foi definido como CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺IL-10⁺ e os resultados expressos na figura 21. Também se fez necessário avaliar se a produção de IL-10 tinha outra origem celular que não as células Tregs, por isso a figura 21 mostra a produção de IL-10 também no fenótipo celular CD4⁺CD25⁺FOXP3⁻IL-10⁺.

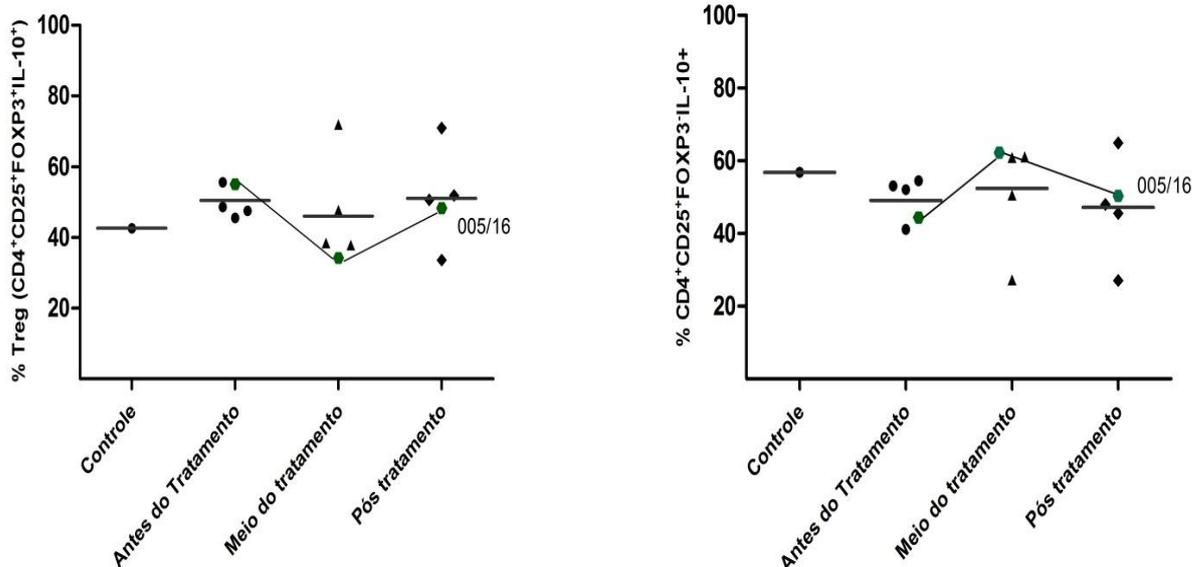


Figura 21 - Frequência de linfócitos T CD4⁺ reguladores (Treg) produtores de IL-10 circulantes no sangue de pacientes com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo* e o percentual de células Treg (CD4⁺ CD25⁺ FOXP3⁺) produtora de IL-10, encontra-se na imagem da esquerda. O fenótipo clássico de células T CD4⁺ ativadas produtoras de IL-10 tem seu percentual representado na imagem da direita. Os cinco pacientes são representados pelos símbolos (●) e foram analisados antes, durante e após o tratamento. A linha horizontal em cada grupo que compõe os gráficos é a média do grupo. Os pontos unidos por uma linha representam o paciente que apresentou falha terapêutica ao antimonial pentavalente (005/16). O controle é um paciente sem histórico de leishmaniose.

5 DISCUSSÃO

5.1 Casuística e resultados obtidos através das amostras biológicas

Durante onze meses foram recrutados dezessete pacientes com LTA atendidos na FMT-HVD (AM).

O estudo foi pioneiro em padronizar uma nova logística de coleta e envio de amostras biológicas de Manaus (AM) para o Rio de Janeiro (RJ), mantendo os critérios de recuperação celular proposto e viabilidade (> 80%). A coleta, transporte e obtenção de CMSP em tubo comercial CPT® foi padronizada antes do início do recrutamento dos pacientes, e o tempo adequado para envio das amostras foi avaliado de acordo com os critérios citados acima. As amostras biológicas terem sido colhidas, armazenadas e transportadas em tubo CPT® foi a melhor maneira para se trabalhar biologicamente com tais células já que a logística entre AM-RJManaus e Rio de Janeiro requer grande esforço de organização de horários, empresas aéreas etc. No entanto, estudos já têm demonstrado que as CMSP isoladas de tubo CPT® podem apresentar diminuída sensibilidade para a detecção de alguns receptores da superfície celular de linfócitos T, dentre estes, o CCR7 (Berhanu et al. 2003) usado nesse estudo como marcador que permite a definição de distintos perfis de células T de memória. Esse receptor, como a maioria daqueles das famílias dos receptores de quimiocinas, são muito facilmente internalizados em endossomas e degradados quando não há a forte e contínua interação com o ligante, ou ainda por processos químicos e físicos. Vale salientar, no entanto que o perfil fenotípico de caracterização das células T e seus perfis funcionais de memória escolhido para este estudo é similar ao proposto pelo consórcio de imunofenotipagem desenvolvido pela Sociedade de imunologia Clínica dos EUA (Finak et al. 2016). Para corroborar que a nossa marcação imunofenotípica foi adequada para a detecção de CCR7, pode ser citado trabalho de Valian et al. (2013) que mostra percentuais de células T e seus perfis funcionais de memória (definidos por CCR-7 e CD45-RA) semelhantes ao descrito nesse estudo.

De maneira controversa ao já descrito pela literatura, onde o evento de falha terapêutica em pacientes da região Norte do Brasil já foi associado com quase metade dos pacientes recrutados para certos estudos (Romero et al. 2001; Guerra et al. 2015), o nosso estudo só conseguiu recrutar um paciente, dentre os sete com

acompanhamento terapêutico completo, que teve falha terapêutica. Uma justificativa pode ser o pouco tempo de inclusão de pacientes no estudo (um ano) e ainda a grande dificuldade que foi a sensibilização dos pacientes para o retorno nos três tempos previstos e, ainda, a participação no estudo. O centro de Medicina Tropical HVD, atende uma grande quantidade de pacientes todos os meses, muitos deles oriundos de áreas fora da região metropolitana de Manaus e, por isso, o retorno dos pacientes acaba sendo inviabilizado por questões financeiras. Aqueles que retornam, por vezes não querem participar do estudo, pois uma coleta sanguínea acaba por ser mais um procedimento invasivo e doloroso para pacientes que já fazem uso de uma medicação de administração intramuscular. É importante ressaltar ainda que houve perdas de inclusão do estudo decorrente de falhas na logística de envio de amostras.

5.2 Resposta imune humoral mediada por IgG1 e IgG3 anti-*Leishmania*

A dosagem de imunoglobulinas no plasma de todos os pacientes incluídos no estudo, não mostrou diferença no nível destas, durante o curso da doença e nem entre o grupo que obteve sucesso terapêutico e o paciente falha, isso foi avaliado tanto para IgG-1 e IgG-3. É possível que devido à média do tempo de doença (± 69 dias), diferenças entre as Igs não puderam ser observadas, já que para a LC este ainda é considerado um período curto para observação de maiores níveis de Ig. Como de maneira geral, os pacientes incluídos nesse estudo apresentaram baixos níveis de Ig desde a fase ativa da doença, diminuições progressivas neste quantitativo não puderam ser observadas. Vale lembrar ainda, que após a inclusão dos pacientes no estudo, os mesmos foram acompanhados por trinta dias, um período de tempo também curto para que sejam observadas diferenças nos níveis de Ig. No entanto, Guzman-Ribeiro et al. (2015), trabalhando com uma casuística de 34 pacientes com LTA causada por *L. (V.) braziliensis* também não observou diferenças nos níveis de Ig anti-*Leishmania* antes e após o tratamento com antimonial pentavalente. O grupo levanta como hipótese o fato de a LTA ser uma doença de manifestação localizada, onde dificilmente diferenças sistêmicas serão observadas, como ocorre para LV (Guzman-Ribeiro et al. 2013).

Trabalho do nosso grupo também mostrou uma característica interessante da resposta humoral de pacientes de LTA causada por *L. (V.) guyanensis* (Matta et al. 2009). Nesse estudo, a avaliação de Ig por *immunoblot* mostrou um menor

reconhecimento antigênico dos anticorpos de pacientes com *L. (V.) guyanensis*, quando comparados àqueles com *L. (V.) braziliensis*. Quando Matta et al. 2009 avaliou a positividade do teste para cada espécie parasitária avaliada, foi observado que em pacientes com *L. (V.) braziliensis* a sensibilidade da avaliação de Ig foi superior daqueles pacientes com *L. (V.) guyanensis*. Esse fato pode acabar contribuindo por mostrar que *L. (V.) guyanensis* é menos potente na indução do braço humoral da resposta imune (Matta et al. 2009).

5.3 Resposta imune efetora avaliada pelo IFN- γ plasmático e pela liberação de IFN- γ após estimulação *in vitro*.

A ausência de detecção de IFN- γ e IL-10 plasmáticas pode ser explicada por vários pontos de vista. O primeiro deles é inerente às características da própria doença. A LC não é uma doença de manifestação sistêmica. Sendo assim, o quantitativo de citocinas produzidas e grau de ativação do sistema imune em geral são avaliados por estudos histopatológicos, diretamente na lesão; ou seja, as manifestações mais importantes da imunopatogênese da LC estão mais restritas ao sítio de infecção, sendo raras as manifestações sistêmicas, onde os níveis periféricos de citocinas e quimiocinas possam ser modulados (Mendes-Aguiar et al. 2016; Espir et al. 2014). Outra explicação está no tipo metodologia empregada para análise destas citocinas plasmáticas. O ELISA é uma metodologia de sensibilidade e especificidade variadas de acordo com o kit empregado, existem comercialmente uma série de variações do ensaio imunoenzimático colorimétrico, e tais variações diferem principalmente no limite de detecção do ensaio principalmente quando são utilizadas amostras biológicas como plasma ou soro.

No entanto, foi possível observar que quando as CMSP dos pacientes com LC foram diretamente estimuladas com antígeno de *Leishmania* spp. ou *T. gondii*, as mesmas foram capazes de efetuar um correto reconhecimento imunológico com ativação de receptores associados à transcrição gênica de citocinas importantes para a ativação de macrófagos e correta polarização da resposta imune do tipo Th1, com capacidade de eficientemente destruir o parasito em questão. É possível observar que a via de interação imunológica é bem similar entre os três estímulos antigênicos utilizados, no entanto, o antígeno de *T. gondii* foi o mais eficiente na produção de IFN- γ nos três tempos de acompanhamento do trabalho, esse mesmo fato já havia sido observado por Da-Cruz et al. (2010). É muito interessante avaliar

que, no curso terapêutico há a modulação da resposta imune, com diminuição no quantitativo de IFN- γ produzido pelos pacientes que tiveram sucesso terapêutico (a partir do período “meio de tratamento”), para uma posterior estabilização nesse quantitativo. Esse fato, no entanto, não é observado para o paciente que teve falha terapêutica (Figura). Ao contrário dos demais, as CMSP do paciente que apresentou falha terapêutica foram fracamente ou não responsivas ao Ag. de *Leishmania* spp. durante a doença ativa, mas no curso do tratamento mostra um aumento progressivo na produção de IFN- γ ; fato que se reflete no fim de tratamento. O excesso de citocinas pró-inflamatórias pode levar à manutenção do microambiente inflamatório, dano tecidual com a manutenção da lesão, o que poderia se correlacionar à falha terapêutica observada para este paciente.

Estudo de Toledo et al. (2001), com uma casuística de 117 pacientes de LTA causada por *L. (V.) braziliensis*, mostra que após estimular as CMSP com antígeno total do parasito, a produção de IFN- γ e sua posterior liberação no sobrenadantes de cultura foi alta antes do início do tratamento, seguida por marcado declínio durante o curso terapêutico. Ao final do tratamento, o quantitativo de IFN- γ avaliado encontrava-se novamente alto, inclusive, ligeiramente superior aos valores encontrados antes do início do tratamento (Toledo et al. 2001). Neste contexto, tal estudo mostra uma variação nos níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura similar ao encontrado pelo nosso estudo. Vale salientar ainda que, é provável que o quantitativo superior para essa citocina, descrito por Toledo et al. (2001), quando comparado ao nosso trabalho, se dê pela sua análise após 72 horas de estímulo antigênico, enquanto nós dosamos o IFN- γ nos sobrenadantes de cultura após 120 horas de estimulação antigênica. Neste estudo (Toledo et al. 2001), todos os pacientes alcançaram a cura clínica, mostrando novamente o já descrito por Da-Cruz et al. (1994), que é a importância que deve ser dada ao IFN- γ no processo de cura de pacientes com LTA. Já foi observado que as CMSP frente à estímulo de *Leishmania* spp. são capazes de ser imunologicamente ativadas, havendo uma maior contribuição na liberação de citocinas efetoras de polaridade Th1 (como o IFN- γ) e essa liberação é mais marcante no término do tratamento (Da-Cruz et al. 1994). Trabalhos do nosso grupo, avaliaram prospectivamente pacientes em LTA ativa, após tratamento e por dois períodos longos (um e dezessete anos) após o fim do tratamento (Da-Cruz et al. 2002), e observaram que, quando trata-se de liberação de citocinas efetoras após estimulação antigênica, ratifica-se o observado por Da-Cruz et al. (1994) que é um quantitativo maior de IFN- γ após o fim do tratamento. No

entanto, o estudo dos anos 2000 não mostrou aumento no quantitativo dessa citocina, após o tratamento para LTA. As explicações para esse fato pode ser o n reduzido de tal análise (n=8) ou por um viés descrito no próprio estudo que foi a não proliferação das CMSP ao antígeno de *L. (V.) braziliensis*, o que impediu a caracterização fenotípica das células T e pode ter contribuído para uma resposta insuficiente na avaliação *in vitro*.

Uma limitação do estudo, foi não avaliar níveis de outras citocinas como IL-10 e IL-5 (Da-Cruz et al. 2002), pois foi feita apenas uma coleta de sobrenadante de cultura no tempo 120 h após estimulação antigênica. Já foi descrito por Matta et al. 2009 que a liberação de IL-10, ocorre preferencialmente após 72 h de cultivo *in vitro*.

Poucos estudos têm avaliado, no contexto imunológico, diferenças nos pacientes que curaram após o curso terapêutico em relação àqueles que falharam. Para *L. (V.) guyanensis*, a maior parte dos trabalhos têm sido desenvolvidos por pesquisadores da Guiana Francesa. Contudo, os casos de falha terapêutica nessa localidade são comumente associados à presença de LRV-1 (Bourreau et al. 2015) e, por vezes, o evento de falha não é tão frequente quando o já descrito para a região Norte do Brasil (Romero et al. 2001). No entanto, Bourreau et al. 2007 avaliou a resposta de CMSP a antígeno de *L. (V.) guyanensis*, tanto para pacientes com LC quando em indivíduos sadios de área endêmica, de maneira bem similar ao feito pelo nosso trabalho (Bourreau et al. 2007). Neste trabalho foi interessantemente avaliada a liberação de TGF- β 1, IL-10 e IFN- γ . Comparativamente com nosso trabalho, o quantitativo de IFN- γ avaliado nas CMSP *in vitro* que não foram estimuladas foi bem parecido do encontrado por nós (86 pg/mL no trabalho de Bourreau et al. 2007 *versus* 70 pg/mL no nosso trabalho); o quantitativo de IFN- γ liberado pelas CMSP após estímulo com *L. (V.) guyanensis* também é similar entre os estudos. Vale salientar, no entanto, que o trabalho de Bourreau et al. 2007 avaliou as citocinas nos sobrenadantes de cultura após sete dias de cultivo *in vitro*.

Como uma perspectiva para o trabalho, está a avaliação de demais citocinas liberadas após estimulação antigênica, em vários contextos, incluindo avaliações que busquem informações de como uma citocina pode acabar interferindo na liberação e modulação de outra. O estudo de Oliveira et al. (2014), combina a estimulação antigênica com adição de anticorpos neutralizantes para determinada citocina (anti-TNF) na cultura, e infere uma relação de “dependência” entre níveis de IFN- γ e outras citocinas, após avaliar sobrenadantes de cultura *in vitro* (Oliveira et al. 2014). O nosso trabalho seria pioneiro em avaliar o papel do antígeno de *L. (V.)*

guyanensis nesse contexto, principalmente, avaliando-se uma casuística totalmente diversa da avaliada por esse autor.

5.4 Perfis imunofenotípicos de células T.

Partindo de uma análise mais ampla e robusta, foi evidenciado que os fenótipos de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ não mostraram diferenças entre os períodos de acompanhamento avaliados, para os pacientes que alcançaram o sucesso terapêutico. O que foi descrito por Da-Cruz et al.1994 e Da-Cruz et al. 2002 – a inversão da população T CD3⁺ CD8⁺ e T CD3⁺ CD4⁺, onde o primeiro fenótipo está presente em maior frequência do que o segundo após o tratamento – não ocorreu nesse trabalho em nenhuma das condições avaliadas. No entanto, trabalho de Guzman-Rivero et al. 2015 também não observou a inversão desses dois fenótipos quando acompanhou uma casuística de 34 pacientes com LC após o fim do tratamento. Ainda vale citar trabalho de Cunha et al. 2016, que avaliou pacientes com *L. (V.) braziliensis* também antes, durante e após o tratamento, e, apesar de observar aumento no fenótipo T CD8⁺ após a cura clínica, o fenótipo T CD4⁺ também teve um aumento (Cunha et al. 2016), não havendo assim a inversão nestes fenótipos da forma descrita por Da-Cruz et al. 1994.

Interessantemente, quando se avalia os fenótipos de células T CD3⁺ CD4⁺ e T CD3⁺ CD4⁻ para o paciente que teve falha terapêutica, um perfil totalmente diferenciado é evidenciado. Para esse paciente a inversão nos dois fenótipos descrita por Da-Cruz et al. 1994 está marcadamente presente. No entanto, de forma diferente do proposto naquele trabalho, onde a inversão ocorre após o tratamento para LTA (Da-Cruz et al. 1994), o nosso trabalho mostrou uma clara inversão nesses fenótipos desde antes do início do tratamento, mantendo-se durante o tratamento e no fim do tratamento, de forma mais acentuada. Outra diferença entre as observações feitas no nosso estudo e aquele de Da-Cruz et al. 1994, é que esse associou a maior frequência de células T CD8⁺ à eficácia do processo de cura, o que é totalmente inverso ao observado pelo nosso estudo, já que o único paciente que apresentou a inversão dos fenótipos, também foi o único a apresentar falha terapêutica. A presença de apenas um paciente com falha terapêutica, não nos permite realizar grandes inferências sobre o porquê e como ocorre a inversão dos fenótipos de células T, podendo esse fato, ainda, estar restrito a uma característica particular daquele paciente.

Quanto à imunofenotipagem das células T, os pacientes que tiveram acompanhamento completo e um desfecho clínico de cura apresentaram quantidades equivalentes de suas populações de memória antes, durante e após o tratamento, nas avaliações *ex vivo*, onde há o predomínio de células TCD3⁺CD4⁺ de memória central seguido da população T *naive*, e T CD3⁺CD4⁺ TEMRA⁺. A frequência dos linfócitos de memória diferiram um pouco do descrito por Valian et al. 2013, principalmente após a estimulação antigênica. Não observamos diferenças no percentual desses linfócitos de memória após a estimulação antigênica, conforme claramente refletido por análises do *fold* e valor de *p*. São descritos alguns discretos aumentos na população de células TME, por exemplo, após estímulo antigênico; no entanto, após observar a grande diversidade de variação somente dos linfócitos TME para cada um dos seis pacientes que obtiveram sucesso terapêutico, fica claro que não é possível realizar inferências de valor biológico para este sistema a partir meramente dos valores descritos nas tabelas. O aumento observado em algumas células de memória após estímulo (Matta et al. 2009; Wu et al. 200 e Khamesipour et al. 2012) pode ter como explicação o fenômeno de compartimentalização de células T efectoras, descritos por muitos autores.

Como a LTA é uma doença de manifestação localizada, a tendência são as células de memória efectora e as demais com função direta no microambiente inflamatório da pele migrarem para esse local, podendo ocasionar a escassez destas células na circulação. Isso já foi descrito com modelos de outras patologias dermatológicas (Clark et al. 2010), e também em LTA, conforme estudos do nosso grupo (Da-Cruz et al. 2010 e Mendes-Aguiar et al. 2016).

Novamente, para o paciente com falha terapêutica também não foi observada modulação na população de células T de memória em nenhum tempo do acompanhamento, *ex vivo* ou *in vitro*.

5.5 Grau de ativação celular e senescência.

Para os pacientes que tiveram cura terapêutica, a ativação celular avaliada pela expressão de HLA-DR não mostrou diferenças para as células T CD3⁺, T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ em nenhum período avaliado. No entanto, é possível observar que há uma tendência das CMSP estimuladas com antígeno de *L. (V.) guyanensis* e *T. gondii* apresentarem percentuais de HLA-DR similares e que são menores ou equivalentes àqueles das CMSP não estimuladas (BG – *background*). Sendo assim,

graficamente o antígeno de *L. (V.) braziliensis* é o único que mostra percentual superior para a expressão de HLA-DR quando comparado ao BG. Como discutido anteriormente, já que os pacientes que tiveram cura não mostram diferença na frequência de suas células T CD4⁺ e T CD4⁻ ao longo do acompanhamento e nem após estimulação *in vitro*; não é incomum que não haja grandes diferenças no perfil de ativação destes fenótipos.

No paciente que teve falha terapêutica (005/16), o percentual de HLA-DR expresso foi consideravelmente superior aos valores encontrados para os pacientes que tiveram sucesso terapêutico. Esse evento ocorreu antes do início do tratamento e no meio do tratamento, e foi observado que o antígeno de *L. (V.) braziliensis* foi o mais eficiente para induzir uma maior expressão de HLA-DR, principalmente para as células T CD3⁺CD4⁺. De maneira controversa, ao final do tratamento foi observada uma drástica redução na expressão de HLA-DR por todos os fenótipos avaliados, ficando os valores percentuais de expressão, bem similares àqueles encontrados para os pacientes que obtiveram sucesso terapêutico.

Quanto à expressão de CD69, os pacientes com acompanhamento completo expressaram nos fenótipos T CD3⁺ e T CD3⁺ CD4⁺ diferenças estatísticas no período antes do tratamento, onde o estímulo com *L. (V.) braziliensis* levou ao aumento na expressão de CD69 por tais CMSP, quando comparadas às células não estimuladas. Nesse sentido, vale citar que os linfócitos T CD3⁺ CD4⁻ apresentaram maiores percentuais de ativação celular avaliado pela expressão dessa molécula, e que, diferentemente do que foi descrito para os outros dois fenótipos citados acima, o Ag. de *L. (V.) guyanensis* foi o de maior importância na indução positiva de CD69 por linfócitos T CD3⁺CD4⁻, seguido da ação semelhante que o Ag. de *L. (V.) braziliensis* também apresenta. Ou seja, de forma geral, é possível observar que as células T CD3⁺CD4⁻ são as mais importantes para manter o perfil de ativação dessas células após o tratamento. É possível que essa persistência de ativação possa acabar contribuindo para a manutenção de um microambiente inflamatório, e caso não haja uma modulação negativa deste processo pela resposta imune, a lesão e processo inflamatório serão mantidos, acarretando na falha terapêutica. É interessante dizer que Mendes-Aguiar et al. 2016 observou um grande percentual de células T CD4⁺ expressando CD69 em lesões mais tardias no sítio da lesão. Ou seja, é provável que, na circulação, essas células ativadas estejam diminuídas (Mendes et al. 2016), Já o nosso estudo mostrou, de maneira oposta, que mais tardiamente ao tratamento, o paciente falha apresentou níveis mais altos de CD69

na superfície de suas células T do que na fase de doença ativa, logo, é provável que essas células ativadas na circulação ainda não migraram para o sítio de lesão.

Quando se avalia os percentuais de ativação celular em função de CD38 e HLA-DR nos perfis de memória de células T (Tabela 5, Tabela 6 e Tabela 10) para os pacientes que alcançaram o sucesso terapêutico, não é observada nenhuma diferença ou tendência significativa na ativação dos perfis de memória ao longo do acompanhamento. É bem provável que não haja diferença no nível de ativação, pois os próprios fenótipos de células T e seus perfis de memória não se mostram modulados ao longo do acompanhamento.

De maneira análoga, ao se avaliar os percentuais de ativação celular, pela expressão das moléculas CD38 e HLA-DR dentro das células de memória, para o paciente que apresentou falha terapêutica, foi observado que, apesar de o mesmo apresentar um percentual superior de células ativadas, quando comparado aos linfócitos dos pacientes que tiveram cura, só há aumento (discreto e sem significância estatística) destas subpopulações após estímulo, nos períodos meio e fim de tratamento. Esses dados confirmaram o que já havia sido observado para as células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻, na avaliação da expressão do marcador de ativação precoce CD69, que é o fato de as células do paciente com falha terapêutica apresentarem um perfil de ativação celular somente após o início da terapêutica. Isso pode corroborar umas das hipóteses do estudo, que seria uma baixa responsividade das células imunes desse paciente, reconhecendo e desencadeando de maneira ineficiente uma resposta imune para o *clearance* parasitário.

Quando se fala do perfil de senescência celular, foi observado que para os pacientes que obtiveram cura, não foi visto diferença no percentual desse fenótipo para as células T. No entanto, fica claro que as células T CD3⁺ CD4⁻ são as que majoritariamente estão em estado senescente. Isso condiz com alguns trabalhos descritos na literatura que ratificam o papel importante desse fenótipo associado a funções efetoras (Campbell et al. 2001). Dessa forma, essas células estão na maior parte das vezes ativadas e, sendo assim, mais propensas a entrar em um estado senescente. Trabalho de Silva-Freitas et al. (2016), em modelo de co-infecção Leishmaniose visceral/HIV também observou maiores percentuais de senescência nos linfócitos T CD8⁺, além de efetivamente demonstrar a correlação entre o perfil senescente e a ativação celular (Silva-Freitas et al. 2016).

Já para o paciente que apresentou falha terapêutica, novamente as células T CD3⁺CD4⁻ são as que mais expressam um perfil senescente. No entanto, no período

antes do início do tratamento, o paciente apresenta níveis muito baixos de células senescentes, independente das avaliações *ex vivo* e *in vitro*. No período meio de tratamento há um grande aumento na frequência da subpopulação com perfil senescente no grupo de células T CD3⁺CD4⁻, e por fim, ao final do tratamento alcança-se a maior percentagem de células T apresentando o perfil senescente. Essas informações são compatíveis com os resultados descritos para a ativação celular das CMSP, onde o paciente com falha terapêutica apresenta perfil de ativação apenas após o início do tratamento. E como o perfil de células senescentes proposto pelo estudo baseia-se principalmente em células que estão senescentes após uma ativação celular, é de se esperar que esse perfil seja mais observado também, após o início do tratamento.

5.6 Participação de outros tipos celulares e função efetora no acompanhamento terapêutico de pacientes com leishmaniose tegumentar Americana (anexo)

A participação de células T regulatórias (Treg) produtoras de IL-10, foi avaliada apenas *ex vivo* para todos os pacientes com acompanhamento terapêutico completo do estudo. De forma geral, foi observado que os pacientes com LC apresentaram um maior percentual de células Treg do que o controle. E, em geral, o percentual é maior antes do tratamento, com uma grande diminuição no percentual no meio do tratamento, e no fim do tratamento há um discreto aumento no percentual. Estudo de Rodrigues et al. 2014 mostra que lesões causadas por *L. Viannia* apresentam maior expressão de FOXP3 *in situ* do que aquelas causadas por *L. (V.) braziliensis*, e que, após um período maior (> 2 meses), há na lesão uma menor presença de células que expressam FOXP3 (Rodrigues et al. 2014), o que poderia acabar refletindo em uma maior quantidade de células Treg na circulação, como o observado pelo nosso estudo.

Nosso estudo também avaliou que outras células, que não são fenotipicamente Tregs também são importantes na produção de citocinas. Nesse sentido, vale citar que as células T CD4⁺ apresentam-se na circulação em maior percentual do que as células Treg, e estas estão ativadas e produzem ativamente IL-10. Há uma discreta modulação nos níveis destas células ao longo do tratamento, mas não foi observada significância estatística. Vale citar que Kariminia et al. (2005) também avaliaram a importância de citocinas anti-inflamatórias frente ao estímulo de

L. (V.) guyanensis, como TGF- β 1, e mostrou que esta também é uma citocina que pode ser importante para induzir uma resposta supressora nas células T ativadas (Kariminia et al. 2005).

Também avaliamos para um paciente (014/16), que apresentou cura terapêutica, o percentual de células NK e NKT dentro do fenótipo T CD3⁺CD4⁻. Pode-se avaliar que as células NK produzem mais IFN- γ , TGF- β 1 e perforina do que as células NKT, sendo que, dentre estas três moléculas, a perforina é a que mostra maior percentual. Nosso trabalho não demonstra diferença significativa entre os níveis de perforina para as células NK e NKT durante o acompanhamento terapêutico; no entanto, há uma tendência ao aumento no quantitativo de células produtoras de perforina após o tratamento, tanto nas células NK, quanto nas NKT. Estudo de Cunha et al. 2016 também observou que após o tratamento, havia um aumento na expressão do marcador de citotoxicidade (CD107a) nas células NK e NKT (Cunha et al. 2016). Esse fato correlaciona-se com o nosso resultado, pois a produção de perforina por essas células também pode ser avaliado como um marcador de ativação e citotoxicidade. No entanto, como nosso estudo só avaliou um paciente para tais fenótipos celulares, poucas inferências podem ser levantadas sobre os resultados obtidos.

Por último, avaliamos como os fenótipos T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ produziam IFN- γ , TGF- β 1 e perforina, também avaliadas para o mesmo paciente (014/16) e *ex vivo*. Foi observado que as células T CD3⁺CD4⁺ apresentavam maior frequência de células produtoras de TGF- β 1 do que as outras moléculas avaliadas antes do tratamento, e que no fim do tratamento, foi observado uma drástica redução na produção dessa citocina. O mesmo perfil tendendo para a redução após o fim do tratamento também foi observado para IFN- γ ; enquanto a avaliação de perforina foi praticamente insignificante para esse fenótipo. Quanto ao fenótipo de células T CD3⁺CD4⁻, a molécula mais expressa é a perforina, que se encontra em maior quantidade nos períodos antes e após o tratamento. Kariminia et al. 2015 também avaliou a importância de TGF- β 1 nos linfócitos T CD3⁺CD4⁺ ativados (CD25⁺), mas não foi feita uma correlação eficaz com os níveis plasmáticos desse fenótipo e nem a correlação para perforina. Novamente, como o descrito para a fenotipagem de células NK e NKT, como apenas um paciente foi avaliado para esse fenótipo, é muito precoce fazer inferências imunológicas sobre esse sistema.

6 CONCLUSÕES

- O perfil epidemiológico e clínico da casuística do estudo, está de acordo com o já descrito para outros trabalhos da área de Manaus. A predominância de indivíduos do sexo masculino, em idade ativa e com atividade ocupacional relacionada à mata, ratifica que os casos de LC incluídos estão dentro do perfil epidemiológico citado para LTA em Manaus.

- O evento de falha terapêutica não foi observado nas mesmas proporções do que o descrito na literatura, por isso é importante avaliar que fatores como tamanho da casuística e tipo de inclusão para o estudo (busca ativa), deve ser um fator considerado.

- O estudo não foi capaz de avaliar modulações na resposta imune humoral através dos isotipos de IgG anti-*Leishmania*, provavelmente porque o tempo de desenvolvimento das lesões é relativamente curto para que se observe altos níveis de Ig na circulação.

- O estudo foi desenhado para avaliações de curto prazo (um mês após a inclusão do paciente), logo, avaliações humorais não seriam as mais adequadas para inferências durante o curso terapêutico. Já que muitos pacientes já são incluídos no estudo com uma baixa quantidade de anticorpos específicos circulantes.

- O atual estudo mostrou que não há manifestação sistêmica dos pacientes com LTA, através da não detecção de citocinas pró-inflamatórias plasmáticas em nenhum dos períodos terapêuticos avaliados.

- O estudo concluiu que o Ag. de *Leishmania* (V.) *guyanensis* é um forte estímulo para a produção de IFN- γ , sendo inclusive mais “potente” para a produção dessa citocina do que Ag. de *Leishmania* (V.) *braziliensis*, de forma parcialmente contraditória ao mostrado por Matta et al. 2009.

- A avaliação *ex vivo* de células T regulatórias produtoras de citocinas supressoras (IL-10) elucidou que em geral, tais células encontram-se em maior frequência na circulação no paciente que teve falha terapêutica, quando comparado aos pacientes que obtiveram sucesso. Isso pode dar indícios de que o microambiente anti-inflamatório pode induzir uma irresponsividade das células imunes desse paciente ao longo do tratamento, acarretando no evento de falha terapêutica.

- Foi observado que os linfócitos T CD4⁺ são tão importantes quanto as Tregs na produção de IL-10 e consequente manutenção de um microambiente anti-inflamatório. Nesse aspecto a grande liberação de TGF-β1 por células desse mesmo fenótipo também deve ser considerada.

- Através da avaliação fenotípica, o estudo foi capaz de concluir que os fenótipo de células T de memória e o perfil de ativação destas não contribui de maneira significativa para a modulação da resposta imune tanto *ex vivo* quanto *in vitro* no curso do tratamento.

- Foi observado que as células T CD4⁺ tendem a expressar um perfil fenotípico ativado, mais relacionado à expressão de CD69, do que HLA-DR; e que esse perfil de ativação é importante na terapêutica desde antes do início do tratamento até seu término.

- O paciente que teve falha terapêutica, faz um paralelo com os demais que alcançaram cura terapêutica já que expressa um perfil de ativação celular, após o início da terapêutica.

- O estudo também concluiu que o perfil de senescência observado está relacionado com a ativação celular das células da resposta imune. Onde os pacientes que tiveram sucesso, tiveram frequências parecidas de células senescentes ao longo do acompanhamento, e o paciente que teve falha terapêutica, apresenta esse perfil mais marcadamente após o tratamento.

- O estudo também levanta indícios do papel de células NK e NKT na imunopatogênese da LTA, mas outros fatores devem ser incluídos para uma correta análise.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, Den Boer M, WHO leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. PLoS ONE. 2012; 7(5): 3567.

Azeredo-Coutinho R, Mendonça S 2014. Formas clínicas das leishmanioses tegumentares nas Américas. Conceição-Silva Fátima, Alves Carlos. Leishmanioses do continente americano, Brasil 311-322.

Benicio E, Cordeiro M, Monteiro H, Moura MA, Oliveira C, Gadelha E, Talhari A, Talhari C, Ferreira L, Mira M, Machado P, Talhari S, Schriefer A. Sustained Presence of Cutaneous Leishmaniasis in Urban Manaus, the Largest Human Settlement in the Amazon. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2015; 96(6): 1208-1213.

Berhanu D, Mortari F, De-Rosa S, Roederer M. Optimized lymphocyte isolation methods for analysis of chemokine receptor expression. J. Immunol. Method. 2003; 279: 199-207.

Bittar R, Nogueira R, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos M, Oliveira-Neto M, Coutinho S, Da-Cruz A. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007; 102(5): 625-630.

Bourreau E, Ginouves M, Prévot G, Hartley MA, Gangneux JP, Robert-Gangneux F, Dufour J, Sainte-Marie D, Bertolotti A, Pratlong F, Martin R, Schutz F, Couppié P, Fasel N, Ronet C. Presence of *Leishmania* RNA Virus 1 in *Leishmania guyanensis* Increases the Risk of First-Line Treatment Failure and Symptomatic Relapse. J Infect. Dis. 2016; 213: 105-111.

Bourreau E, Ronet C, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. IL-10 producing CD8⁺ cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. Microbes and Infection. 2007; 9: 1034-1041.

Bourreau E, Ronet C, Darsissac E, Lise MC, Marie DS, Clyti E, Tacchini-Cottier F, Couppié P, Launois P. In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*

infection, distinct intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. *J Infect Dis.* 2009; 199(4): 576-579.

Campbell J, Murphy K, Kunkel E, Brightling C, Soler D, Shen Z, Boesvert J, Greenberg H, Vierra M, Goodman S, Genovese M, Wardlaw A, Butcher E, Wi L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J Immunol.* 2001;166:877-884.

Carneiro P, Conceicao J, Macedo M, Magalhaes V, Carvalho E, Bacellar O. The Role of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in the Killing of *Leishmania braziliensis* by Monocytes from Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS ONE.* 2016; 11(2): 1-16.

Clark R. Skin resident T cells: the ups and downs of on site immunity. *J Invest Dermatol.* 2010; 130: 362-370.

Coelho L, Paes M, Guerra JA, Barbosa MG, Coelho C, Lima B, Brito M, Filho S. Characterization of *Leishmania* spp. causing cutaneous leishmaniasis in Manaus, Amazonas, Brazil. *Parasitol Res.* 2011; 108: 671–677.

Costa L, Salles B, Alves P, Dias A, Vaz E, Ramos F, Menezes-Souza D, Duarte M, Roatt B, Chávez-Fumagalli M, Tavares C, Gonçalves D, Rocha M, Goulart L, Coelho E. New serological tools for improved diagnosis of human tegumentary leishmaniasis. *J Immun Metho.* 2016; 434: 39-45.

Cunha C, Ferraz R, Pimentel M, Lyra M, Schoubach A, Da-Cruz A, Bertho A. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. *Parasite Immunol.* 2016; 38: 244-254.

Da-Cruz AM, Pirmez C 2005. Leishmaniose Tegumentar Americana. Coura, José. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias, Brasil* 697-712.

Da-Cruz AM, Oliveira-Neto P, Bertho A, Mendes-Aguiar C, Coutinho S. T cells specific to *Leishmania* and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* 2010; 130: 1329-1336.

Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho A, Coutinho S. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994; 62: 2614-2618.

Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto M, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho R, Coutinho S. T-cell-mediated immune responses with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Immunol*. 2002; 9: 251-256.

Da-Silva ACT, Cupolillo E, Volpini AC, Almeida R, Romero GA. Species diversity causing human cutaneous leishmaniasis in Rio Branco, state of Acre, Brazil. *Trop Med Int Health*. 2006; 11: 1388-1398

De Vries H, Reedijk S, Schallig H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. *Am J Clin Dermatol*. 2015; 16: 99-109.

Espir T, Figueira L, Naiff M, Costa A, Ramalho-Ortigao M, Malheiro A, Franco A. The Role of Inflammatory, Anti-Inflammatory, and Regulatory Cytokines in Patients Infected with Cutaneous Leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. *J Immun Res*. 2014; 1:1-10.

Espir T, Guerreiro T, Naiff M, Figueira L, Soares F, Silva S, Franco A. Evaluation of different diagnostic methods of American Cutaneous Leishmaniasis in the Brazilian Amazon. *Exp Parasit*. 2016; 167: 1-6

Fagundes-Silva G, Romero G, Cupolillo E, Yamashita E, Gomes-Silva A, Guerra J, Da-Cruz A. *Leishmania (Viannia) naiffi*: rare enough to be neglected?. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015; 110(6): 797-800.

Fagundes-Silva G, Vieira-Gonçalves R, Nepomuceno M, Souza M, Favoreto-Jr S, Oliveira-Neto M, Da-Cruz A, Gomes-Silva A. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immun* 2013; 34: 486-491.

Farber L. Donna. T Cell Memory: Heterogeneity and Mechanisms. *Clin. Immunol*. 2000; 95: 173-181.

Figueira LP, Soares FV, Naiff MF, Simas SS, Espir TT, Pinheiro FG, Franco AM. Distribuição de casos de leishmaniose tegumentar no município de Rio Preto da Eva, Amazonas, Brasil. *Rev Patol Trop.* 2014; 43: 173 -181.

Finak G, Langweiler M, Jaimes M, Malek M, Taghiyar J, Korin Y, Raddassi K, Devine L, Obermoser G, Pekalski M, Pontikos N, Diaz A. Standardizing flow cytometry immunophenotyping analysis from the human immunophenotyping consortium. *Nature* . 2016: 10138.

Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molec.* 2009; 14(7): 2317-2336.

Gadelha E, Guerra J, Jr.-Silva R, Talhari S, Neves L, Gontijo B, Talhari A. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. *An Bras Dermatol.* 2015; 90(6): 807-813.

Gomes-Silva A, Biitar R, Nogueira R, Amato V, Mattos M, Oliveira-Neto M, Coutinho S, Da-Cruz A. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?. *Clin Exp Immunol.* 2007; 149: 440-444.

Gomes-Silva A, Souza M, Afonso-Cardoso S, Andrade L, Dietze R, Lemos E, Belli A, Favoreto-Jr S, Ferreira M. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis complex*. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2008; 41(2): 135-141.

Guerra J, Maciel M, Talhari A, Prestes S, Fernandes M, Da-Cruz A, Martins A, Coelho L, Romero G, Barbosa MG. Tegumentary leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need?. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48(1): 12-19.

Guerra J, Prestes S, Silveira H, Coelho L, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa MG, Ferreira LC. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia)*

braziliensis and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon. PLOS Neglect trop diseases. 2011; 5 (3): 980.

Gutierrez Y, Salinas G, Palma G, Valderrama L, Santrich C, Saravia N. Correlation between Histopathology, Immune Response, Clinical Presentation, and Evolution in *Leishmania braziliensis* Infection. Am J Trop Med Hyg 1991; 45: 281–289.

Kariminia A, Bourreau E, Pascalis H, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F, Launois P. Transforming Growth Factor 1 Production by CD4 CD25 Regulatory T Cells in Peripheral Blood Mononuclear Cells from Healthy Subjects Stimulated with *Leishmania guyanensis*. Infect. Immun. 2005; 73(9): 5908-5914.

Khamesipour A, Rostami M, Tasbihi M, Mohammadi A, Shahrestani T, Sarrafnejad A, Sohrabi Y, Eskandari S, Valian H. Phenotyping of circulating CD8⁺ T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis. Microb. Infect. 2012; 14: 708-711.

Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo. 2009; 51(5): 247-253.

Macedo D, Menezes-Neto A, Rugane J, Rocha A, Silva S, Melo M, Lye L, Beverly S, Gontijo C, Soares R. Low frequency of LRV1 in *Leishmania braziliensis* strains isolated from typical and atypical lesions in the State of Minas Gerais, Brazil. Mol. Bioch. Parasit. 2016; 210: 50-54.

Martins-Melo F, Jr. Ramos A, Alencar CH, Heukelbach J. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. Bull World Health Organ. 2016; 94: 103-110.

Matta N, Nogueira R, Franco A, Souza e Souza I, Mattos M, Oliveira-Neto M, Coutinho S, Leon L, Da-Cruz A. *Leishmania (Viannia) guyanensis* Induces Low Immunologic Responsiveness in Leishmaniasis Patients from an Endemic Area of the Brazilian Amazon Highland. Am. J. Trop. Med. Hyg. 2009; 80(3): 339-344.

Mendes-Aguiar C, Vieira-Gonçalves R, Guimaraes H, Oliveira-Neto P, Carvalho M, Da-Cruz AM. Effector memory CD4(+) T cells differentially express

activation associated molecules depending on the duration of American cutaneous leishmaniasis lesions. *Clin. Exp. Immunol.* 2016; 185: 202-209.

Ministério S. Manual da vigilância da leishmaniose tegumentar americana. Ministério da Saúde. Distrito Federal, Brazil. 2013.

Neves LO, Talhari AC, Gadelha EP, Silva Jr RM, Guerra JA, Ferreira LC, Talhari S. A randomized clinical trial comparing meglumine antimoniate, pentamidine and amphotericin B for the treatment of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania guyanensis*. *An Bras Dermatol.* 2011; 86: 1092-110.

Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado D, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 2014; 66(2): 127-132.

Paiva-Cavalcanti M, Morais R, Pessoa-e-Silva R, Trajano-Silva L, Gonçalves-de-Albuquerque S, Tavares D, Brelaz-de-Castro M, Silva R, Pereira V. Leishmaniasis diagnosis: an update on the use of immunological and molecular tools. *Cell & Biosci.* 2015; 5: 31-41.

Peçanha-Brazil R, Brazil B 2014. Vetores na leishmaniose tegumentar Americana. Conceição-Silva Fátima, Alves Carlos. Leishmanioses do continente americano, Brasil 194-198.

Rodrigues F, Neto G, Menezes J, Gama M, Gonçalves E, Silva A, Laurenti M, Corbett C, Silveira F, Gomes C. Expression of Foxp3, TGF- β and IL-10 in American cutaneous leishmaniasis lesions. *Arch Dermatol Res.* 2014; 306: 163-171.

Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macedo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001; 65: 456-465.

Roussel M, Nacher M, Frémont G, Rotureau B, Clyti E, Sainte-Marie D, Carme B, Pradinaud R, Couppié P. Comparison between one and two injections of

pentamidine isethionate, at 7 mg/kg in each injection, in the treatment of cutaneous leishmaniasis in French Guiana. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006; 100(4): 307-314.

Schubach A, Conceição-Silva F 2014. Estado da arte no tratamento da leishmaniose tegumentar Americana no Brasil. Conceição-Silva Fátima, Alves Carlos. *Leishmanioses do continente americano, Brasil* 391-398.

Silva-Freitas ML, Cota G, Machado-de-Assis T, Giacoia-Gripp C, Rabello A, Da-Cruz A, Santos-Oliveira J. Immune activation and bacterial translocation: a link between impaired immune recovery and frequent visceral leishmaniasis relapses in HIV-infected patients. *Plos ONE*. 2016; 12:512.

Souza A, Soto M, Costa J M, Boaventura V, Cristal J, Barral-Neto M, Barral A. Towards a More Precise Serological Diagnosis of Human Tegumentary Leishmaniasis Using Leishmania Recombinant Proteins. *PLoS one*. 2013; 8(6):110.

Toledo V, Gollob W, Oliveira M, Da-Costa C, Genaro O, Pinto J, Afonso F. Immunochemotherapy in American Cutaneous Leishmaniasis: Immunological Aspects before and after Treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. 2001; 96: 89-98.

Valian H, Rostami M, Tashihi M, Mohammadi A, Eskandari S, Sarrafnejad A, Khamesipour A. CCR7⁺ central and CCR7⁻ effector memory CD4⁺ T cells in human cutaneous leishmaniasis. *J Clin Immunol*. 2013; 33: 220-234.

WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases - Weekly epidemiological record [database on the Internet]. Postigo J: Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014 - [cited 2017 Jan 10]. Available from: http://leishmaniasis/resources/who_wer9122/en/.

8 APÊNDICES E/OU ANEXOS

8.1 Parecer substanciado do Comitê de Ética em pesquisa

FUNDAÇÃO DE MEDICINA
TROPICAL DR. HEITOR VIEIRA
DOURADO ((FMT-HVD))



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo de fatores associados à falha terapêutica em pacientes com Leishmaniose Cutânea

Pesquisador: MARA LUCIA GOMES DE SOUZA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 29638514.0.0000.0005

Instituição Proponente:

Patrocinador Principal: Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/MT/AM

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 613.013

Data da Relatoria: 11/04/2014

Apresentação do Projeto:

conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014.

Objetivo da Pesquisa:

conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

conforme parecer # 560.914, de 28/03/2014.

Continuação do Parecer: 613.013

Recomendações:

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que o protocolo e, particularmente, seu cronograma foi devidamente ajustado e esclarecido q não houve início arbitrário da pesquisa, voto pela APROVAÇÃO na forma ora apresentada.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O presente projeto está APROVADO e os interessados ficam informados de apresentar a este CEP os relatórios parciais e final do estudo, conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando os modelos disponíveis em nossa homepage, na aba "Modelos de Documentos". Se houver qualquer tipo de dúvida o pesquisador deve entrar em contato com o CEP/FMT-HVD, que lhe oferecerá as orientações necessárias.

MANAUS, 11 de Abril de 2014

Assinador por:

Maria Paula Gomes Mourão
(Coordenador)

8.2 Frequência de células NK e NKT produtoras de IFN- γ , TGF- β 1 ou perforina em pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento – resultados preliminares

Foi avaliado o fenótipo de células NK (CD3⁻CD4⁻CD56⁺) e NKT (CD3⁺CD4⁻CD56⁺), produtoras de IFN- γ , TGF- β 1 e perforina em um paciente (014/16) ao longo de seu tratamento (antes do tratamento, meio e fim de tratamento). O paciente apresentou sucesso terapêutico. O percentual de NK e NKT produtoras de IFN- γ e TGF- β 1 apresentado na fase de doença ativa não mudou ao longo do tratamento. Entretanto, para ambas as populações houve o um aumento da proporção de células produtoras de perforina ao término do tratamento em relação a antes e durante o tratamento (Figura 22).

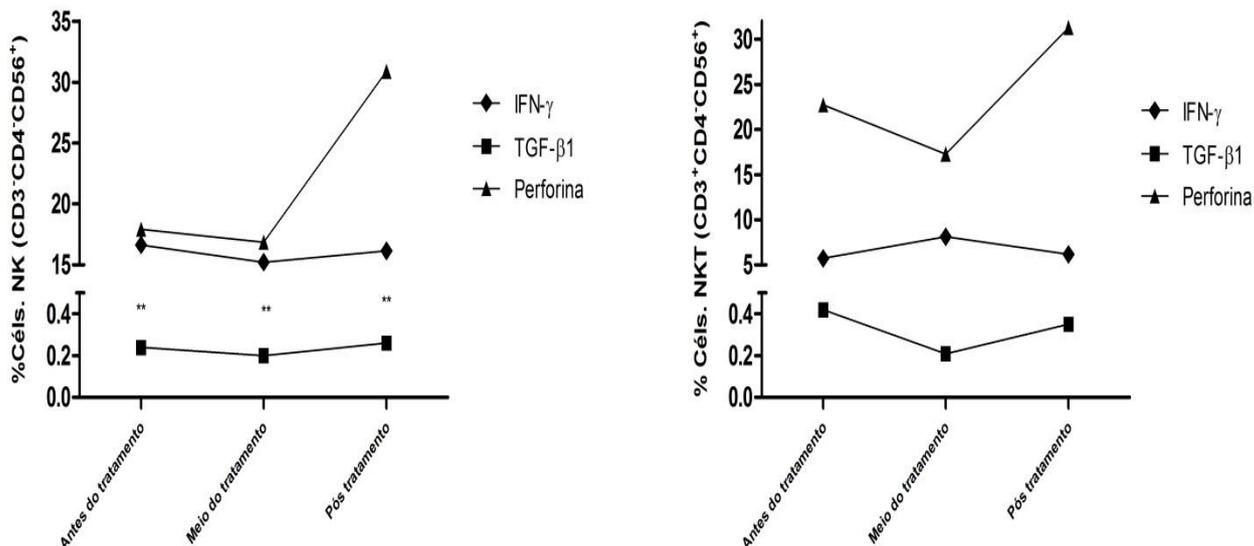


Figura 22 - Frequência de células NK (CD3⁻ CD4⁻ CD56⁺) e NKT (CD3⁺ CD4⁻ CD56⁺) produtoras de IFN-γ, TGF-β1 e perforina circulantes no sangue de um paciente com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas *ex vivo*, e o percentual de células NK (CD3⁻ CD4⁻ CD56⁺) produtora de IFN-γ, TGF-β1 ou perforina encontra-se na imagem da esquerda. Já o percentual de células NKT (CD3⁺ CD4⁻ CD56⁺) produtoras de IFN-γ, TGF-β1 ou perforina está representado na imagem da direita. As imagens mostram a representação de percentual dessas células para um paciente (014/16), antes, durante e após o tratamento. A diferente simbologia gráfica serve para identificar qual molécula é produzida por determinada população: IFN-γ (◆); TGF-β1 (■) e perforina (▲). As linhas de conexão entre cada símbolo identificam a variação no percentual dessas células durante o acompanhamento.

8.3 Frequência de células T CD3⁺CD4⁺ e CD3⁺CD4⁻ produtoras de IFN-γ, TGF-β1 ou perforina em paciente com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento – resultados preliminares.

Foi avaliado por marcação intracelular, a frequência de células T CD4⁺ (CD3⁺CD4⁺) e T CD3⁺CD4⁻ que produziam as citocinas IFN-γ, TGF-β1 e perforina. O gráfico abaixo (figura 23) mostra experimento preliminar de um paciente (014/16) ao

longo do curso terapêutico. Os fenótipos citados estão expressos no gráfico na forma de percentual.

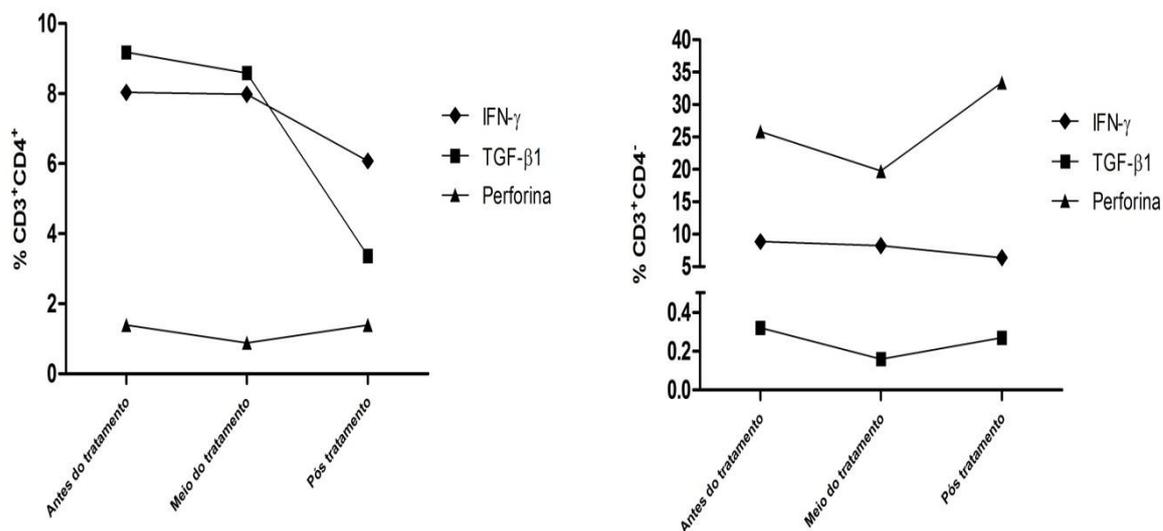


Figura 23 – Frequência do fenótipo de células T CD3⁺ CD4⁺ e T CD3⁺ CD4⁻ produtoras de IFN-γ, TGF-β1 e perforina circulantes em sangue de um paciente (014/16) com leishmaniose cutânea antes, durante e após o tratamento. As células mononucleares de sangue periférico foram avaliadas ex vivo e o percentual de linfócitos T (CD3⁺CD4⁺) produtores de IFN-γ, TGF-β1 ou perforina encontra-se na imagem da esquerda. Enquanto o percentual de linfócitos T (CD3⁺CD4⁻) produtores de IFN-γ, TGF-β1 ou perforina encontra-se na imagem da direita. As imagens mostram a representação de percentual dessas células para um paciente (014/16), antes, durante e após o tratamento. A diferente simbologia gráfica serve para identificar qual molécula é produzida por determinada população: IFN-γ (◆); TGF-β1 (■) e perforina (▲). As linhas de conexão entre cada símbolo identificam a variação no percentual dessas células durante o acompanhamento.

8.4 Frequência de linfócitos T naive; de memória (central e efetora) e TEMRA em pacientes com leishmaniose cutânea com doença ativa e ao longo do tratamento anti-Leishmania.

Os resultados de frequência para cada perfil de memória é expresso em **mediana seguida do interquartil inferior (25%) e superior (75%)**. Esse resultado está numericamente representado pela letra ^a.

No entanto, além de representar corretamente a distribuição dos resultados, inferir como o estímulo antigênico poderia ou não alterar a distribuição dos perfis celulares avaliados também deveria ser mostrado. Para tal foi utilizado o índice “*fold*”, que equivale ao quociente entre a média do percentual de CMSP frente ao estímulo antigênico pelo percentual daquelas que não foram estimuladas (BG-*background*), seguido de seu desvio padrão. Na tabela esse valor é representado pela letra ^b.

O *fold* permite avaliar a modificação da frequência de uma determinada subpopulação frente ao estímulo antigênico em relação à célula não estimulada. A determinação do *fold* auxilia na melhor compreensão da ação de um determinado estímulo antigênico para um fenótipo.

Tabela 3: Frequência dos linfócitos T de memória circulantes e após estímulo antigênico em indivíduos sadios de área endêmica.

Controles (n=5)							
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>
	CMSP	Lg-Ag		Lb-Ag		Tg-Ag	
% TME em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	25.9 ^a 16.5-35.6	19.4 ^a 14.3-27.0	0.54 ±3.11 ^b	25.5 18.4-36.0	0.72 ±5.01	50.1 37.8-52.5	1.46 ±8.0
% TMC em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	26.0 22.3-30.5	39.5 18.5-60.0	0.89 ±1.97	25.3 7.1-49.6	0.49 ±1.90	35.9 16.6-56.8	0.82 ±2.13
% Tnaive em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	33.7 22.7-45.3	28.0 12.4-44.8	1.75 ±2.10	41.3 18.3-63.7	2.60 ±3.21	6.3 4.5-8.1	0.35 ±0.26
% TME em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	24.3 15.3-33.4	35.2 19.3-51.2	0.76 ±3.45	48.8 30.7-67.1	1.11 ±1.65	55.0 51.2-59.2	1.30 ±0.18
% TMC em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	7.4 6.2-8.0	20.5 14.7-26.0	0.77 ±2.96	30.4 6.9-58.1	1.06 ±19.11	23.1 2.9-42.5	0.70 ±13.45
% T naive em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	40.5 34.2-47.0	29.1 16.9-39.4	2.85 ±2.33	10.6 8.1-15.5	0.38 ±0.31	9.2 1.4-15.9	0.40 ±1.21
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	28.1 25.1-31.2	15.5 5.88-25.7	2.18 ±3.0	9.98 2.5-19.3	1.21 ±1.55	14.7 0.3-28.4	2.04 ±4.12

^a - Resultados expressos em mediana seguida de interquartil inferior (25%) e interquartil superior (75%)

^b – Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 4: Frequência das células T de memória circulantes *ex vivo*, e após estímulo antigênico (*in vitro*), antes do início do tratamento para os pacientes com leishmaniose cutânea.

Doença ativa (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻)	13.2	13.4 ^a	0.93 ±1.12 ^b	1.000	16.0	0.88 ±0.97	0.935	17.6	1.27 ±1.70	0.935
	1.59-31.3	2.3-25.6			0-26.5			0-37.9		
% MC em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻)	49.9	45.9	1.01 ±0.9	0.699	47.6	1.15 ±0.90	0.588	45.5	1.09 ±0.82	0.588
	36.0-54.7	13.4-52.8			25.5-55.1			26.6-51.1		
% Tnaive em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	36.1	44.1	1.13 ±1.21	0.393	36.6	1.01 ±1.02	0.937	35.1	0.95 ±2.03	0.699
	15.2-47.7	35.7-56.0			34.0-48.0			28.1-46.0		
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻)	15.4	26.1	1.02 ±0.93	0.937	24.0	0.95 ±0.98	0.937	30.1	1.15 ±0.72	0.588
	8.7-27.6	17.7-34.6			13.5-34.2			23.9-37.3		
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻)	12.6	12.2	1.16 ±0.77	0.514	9.63	1.16 ±0.92	0.514	8.57	1.17 ±0.78	0.415
	3.4-43.8	2.6-46.8			5.59-39.5			4.0-56.7		
% T naive em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	20.9	24.1	1.32 ±1.46	0.748	19.9	1.15 ±1.10	0.748	20.2	1.08 ±1.24	0.872
	6.6-32.0	7.6-43.1			10.8-34.1			5.1-33.3		
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	39.6	25.9	0.75 ±0.80	0.630	24.6	0.88 ±0.85	0.872	25.6	0.77 ±0.86	0.572
	17.5-57.6	3.7-42.7			10.1-58.4			0-51.9		

^a - Resultados expressos em mediana seguida de interquartil inferior (25%) e interquartil superior (75%)

^b – Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

p valor avaliado entre as CMSP estimuladas e aquelas que não receberam estímulo antigênico (BG – *background*). Significância estatística se *p* < 0,05 (Kruskall-Wallis).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 5: Frequência das células T de memória circulantes *ex vivo*, e após estímulo antigênico (*in vitro*), durante o tratamento anti- *Leishmania* para os pacientes com leishmaniose cutânea.

Meio do tratamento (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻)	23.7 0-58.5	21.9 ^a 0-46.2	0.87 ±0.92 ^b	0.935	7.9 0-35.7	0.54 ±0.71	0.561	10.4 0-45.2	0.69 ±0.86	0.806
% MC em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	43.9 16.3-55.6	43.5 14.5-57.2	1.44 ±1.57	0.588	44.9 30.2-58.1	1.64 ±1.46	0.179	50.6 13.2-59.3	1.54 ±1.79	0.393
% T naíve em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	31.4 11.7-42.5	39.4 18.3-44.2	1.06 ±0.95	0.630	36.0 28.4-44.5	1.11 ±0.71	0.818	37.8 19.9-43.0	1.02 ±1.05	0.937
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁻)	28.3 11.8-35.1	18.3 13.0-30.8	0.87 ±0.71	0.937	17.5 10.6-24.5	0.69 ±0.58	0.588	23.1 18.3-30.2	0.98 ±0.47	0.588
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	9.8 2.0-31.6	11.6 6.7-70.3	1.21 ±0.99	0.748	15.6 4.0-84.1	1.44 ±1.21	0.748	12.6 3.7-38.6	0.86 ±0.70	1.000
% T naíve em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	14.6 6.0-39.7	22.6 2.16-45.4	0.97 ±1.16	1.000	15.5 10.1-29.3	0.79 ±0.91	0.748	23.6 10.0-33.3	0.96 ±1.00	1.000
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	38.3 12.9-59.6	25.1 9.7-38.0	0.93 ±1.17	0.872	31.8 0-51.0	1.10 ±1.79	0.808	35.6 11.2-48.8	1.20 ±1.36	0.521

^a - Resultados expressos em mediana seguida de interquartil inferior (25%) e interquartil superior (75%)

^b – Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

p valor avaliado entre as CMSP estimuladas e aquelas que não receberam estímulo antigênico (BG – *background*). Significância estatística se *p* < 0,05 (Kruskall-Wallis).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 6: Frequência das células T de memória circulantes *ex vivo*, e após estímulo antigênico (*in vitro*), no fim do tratamento anti- Leishmania para os pacientes com leishmaniose cutânea.

Fim do tratamento (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	20.3 0-35.1	21.0 ^a 0.8-33.8	1.17 ±1.26 ^b	0.686	21.2 2.1-32.3	1.23 ±1.39	0.935	14.8 1.1-25.9	0.83 ±0.89	0.808
% MC em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	48.0 37.9-65.1	52.3 15.5-58.0	0.87 ±1.02	0.937	46.2 15.7-58.3	0.88 ±1.03	0.818	52.6 34.1-59.8	1.01 ±0.78	0.818
% T naíve em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	28.7 13.3-35.6	30.6 22.0-40.6	0.92 ±1.06	0.818	31.9 22.5-48.8	1.00 ±1.53	0.818	35.1 22.4-42.4	1.01 ±1.20	0.937
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	20.4 13.8-26.6	26.6 18.3-32.2	0.91 ±1.20	1.000	23.3 13.8-31.8	0.85 ±1.25	0.393	21.9 17.8-27.7	0.86 ±0.84	0.699
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	7.9 2.1-55.5	19.4 6.8-61.7	1.44 ±1.12	0.484	7.9 5.1-77.7	1.47 ±1.49	0.484	9.5 3.6-46.7	1.00 ±0.95	1.000
% T naíve em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	11.5 6.6-30.2	21.1 7.6-32.7	1.16 ±1.28	0.872	16.4 10.1-28.3	1.13 ±1.44	1.000	15.2 9.1-33.4	1.16 ±1.62	0.748
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	34.5 13.1-69.0	18.1 0-44.9	0.72 ±1.10	0.572	20.9 2.5-53.1	0.81 ±1.10	0.748	27.8 9.4-63.4	1.06 ±1.19	1.000

^a - Resultados expressos em mediana seguida de interquartil inferior (25%) e interquartil superior (75%)

^b – Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

p valor avaliado entre as CMSP estimuladas e aquelas que não receberam estímulo antigênico (BG – *background*). Significância estatística se *p* < 0,05 (Kruskal-Wallis).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

8.5 Frequência de células T ativadas (CD38+HLA-DR-, CD38+HLA-DR+ e CD38- HLA-DR+) nos perfis celulares de memória (memória central, memória efetora, Tnaive e TEMRA+) de pacientes com leishmaniose cutânea durante doença ativa e ao longo do tratamento.

Para a avaliação do perfil de ativação celular, foram utilizados os marcadores de superfície celular CD38 e HLA-DR. Esses dois receptores são descritos em células da linhagem linfóide e mieloide, e o primeiro está relacionado ao metabolismo energético da célula, sendo importante nos processos de fosforilação do ADP e mobilização de cálcio intracelular, e o segundo como um clássico MHC humano, tendo papel importante durante a formação da “sinapse imunológica”, nas fases de reconhecimento e desenvolvimento da resposta imune.

Os percentuais desses receptores foram avaliados em cada perfil de memória de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ de acordo com o percentual expresso para cada um dos receptores, e para os dois juntos (naquelas células que expressaram ambos CD38 e HLA-DR).

No entanto, como a avaliação do perfil de ativação foi realizada nas células de cada perfil de memória citado, o quantitativo de células analisadas foi menor do que aquelas utilizadas para a avaliação geral do fenótipo celular, já que o grau de ativação está restrito ao “universo” das células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ e seus perfis de memória. Por isso, para que a percentagem avaliada para cada receptor fosse de fato representativa do evento biológico que queremos avaliar, foram considerados apenas percentuais referentes a no mínimo 300 eventos celulares no fenótipo avaliado. Percentuais relativos a eventos celulares inferiores a 300 foram considerados como “não expressão de determinado fenótipo associado à ativação” e denotados nas tabelas 7 e 8. Como muitos pacientes não expressaram um fenótipo de ativação para nenhum dos dois receptores (zero), as tabelas dessa seção expressam os valores de CD38 e HLA-DR como **média seguida de desvio-padrão** para cada grupo avaliado, e representada na tabela como ^d. O índice “*fold*” é o **coeficiente da média das CMSP estimuladas *in vitro* e daquelas que não sofreram estímulo antigênico (BG- background)**.

Não houve significância estatística entre nenhum grupo na análise temporal meio do tratamento e fim de tratamento. No primeiro período temporal avaliado (“doença ativa”), foi verificado que o estímulo antigênico de *L.(V.) braziliensis* foi capaz de aumentar em mais de vinte vezes o fenótipo de células T CD3⁺CD4⁻ de memória efetora ativadas, expressando o receptor HLA-DR. Esse marcante aumento foi acompanhado de significância estatística ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis).

Tabela 7: Percentual dos perfis funcionais de células T *ex vivo* e *in vitro*, e seus perfis de ativação celular antes do início do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo.

Doença ativa (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	Fold	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	Fold	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	Fold	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	18.16±24.10 ^d	14.03±17.48	1.15±0.93 ^b	0.864	11.87±13.28	0.97±0.70	0.864	22.81±27.97	1.87±1.48	0.732
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	-	10.35±25.35	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% MC em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	13.36±14.75	25.58±18.60	1.06±1.13	1.000	33.03±30.40	1.37±1.86	0.748	35.93±16.54	1.49±1.01	0.484
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0.33±0.80	3.89±6.28	0	-	12.97±21.44	0	-	1.37±2.25	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	5.34±5.31	6.83±9.49	0	-	3.17±6.03	0	-	3.53±3.93	0	-
% Tnaive em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	1.31±2.58	29.35±24.05	0.81±0.79	0.937	33.09±33.14	0.91±1.08	0.818	35.13±32.08	0.97±1.05	0.818
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	2.56±3.03	18.14±8.70	0.70±0.28	0.935	28.14±29.55	1.09±0.96	0.086	8.0±9.48	0.31±0.30	0.678
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	36.98±30.0	20.81±19.85	3.22±1.59	0.114	16.24±27.40	2.51±2.20	0.655	14.23±16.61	2.20±1.33	0.421

^d - Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

^b - Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

p valor avaliado entre as CMSP estimuladas e aquelas que não receberam estímulo antigênico (BG – *background*). Significância estatística se *p* < 0,05 (Kruskall-Wallis).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 7: Percentual dos perfis funcionais de células T *ex vivo* e *in vitro*, e seus perfis de ativação celular antes do início do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo (continuação).

Doença ativa (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	29.95±21.54 ^d	33.90±36.30	15.9±6.95 ^b	0.060	44.08±31.36	20.6±6.0	0.016*	40.01±34.43	18.78±6.59	0.060
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	7.44±9.42	0.74±1.82	0	-	7.62±18.67	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	16.87±20.30	17.20±33.94	0	-	28.63±37.42	0	-	30.24±34.53	0	-
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	1.21±2.96	0	-	7.43±18.20	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	1.14±2.80	0	-
% Tnaive em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	13.83±18.78	26.88±25.03	1.74±0.77	0.347	24.36±23.09	1.57±0.71	0.347	31.6±22.12	2.05±0.68	0.158
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	10.44±14.42	8.77±12.96	2.74±1.65	0.340	20.60±33.28	6.43±4.23	0.462	3.71±6.56	1.15±0.83	0.752
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	10.95±11.77	5.78±10.96	0	-	6.57±13.48	0	-	1.31±3.21	0	-
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	24.32±20.47	31.5±30.8	2.42±1.52	0.347	29.2±16.16	2.24±0.80	0.361	33.72±31.55	2.59±1.56	0.199
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	12.98±18.55	13.38±22.97	3.18±2.14	0.599	25.62±34.33	5.87±3.20	0.253	10.17±17.89	2.33±1.67	0.599
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	9.47±12.77	1.22±2.99	0	-	0.97±2.38	0	-	4.23±10.38	0	-

^d - Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

^b - Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

Tabela 8: Percentual dos perfis de memória de células T *ex vivo* e *in vitro*, e seus perfis de ativação celular no meio do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo.

Meio do tratamento (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	14.40±16.34 ^d	13.86±23.56	1.44±2.01	0.928	10.03±16.03	1.04±1.37	0.928	6.77±16.60	0.70±1.41	0.446
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% MC em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	27.07±30.31	19.08±25.24	0.72±1.08	0.415	21.59±21.50	0.82±0.92	0.808	15.87±18.11	0.60±0.78	0.419
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	2.59±3.56	5.36±9.59	6.45±4.67	0.462	2.90±7.10	3.49±3.46	1.000	2.08±5.11	2.50±2.49	1.000
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	12.34±19.20	6.33±13.41	0	-	1.33±3.27	0	-	5.03±7.87	0	-
% Tnaive em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	14.87±29.09	21.69±25.18	0.92±1.18	0.808	22.33±25.85	0.95±1.21	0.935	17.85±34.41	0.75±1.62	0.280
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	8.34±11.66	24.21±21.45	2.09±1.17	0.158	18.57±20.58	1.60±1.13	0.549	15.29±18.91	1.35±1.03	0.549
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	26.49±22.07	8.70±10.59	0.83±0.78	1.000	8.37±17.16	0.79±1.26	0.655	27.65±30.67	2.63±2.26	0.280

^d - Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

^b - Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

p valor avaliado entre as CMSP estimuladas e aquelas que não receberam estímulo antigênico (BG – *background*). Significância estatística se *p* < 0,05 (Kruskal-Wallis).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 8: Percentual dos perfis de memória de células T ex vivo e in vitro, e seus perfis de ativação celular no meio do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo (continuação).

Meio do tratamento (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p valor</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p valor</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p valor</i>
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD3⁺CD4⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	25.49±15.67 ^d	28.96±32.36	2.26±1.52 ^b	0.421	12.13±19.06	0.94±0.89	0.924	25.92±29.79	2.02±1.40	0.421
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	3.62±5.88	0	0	-	7.50±18.37	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% MC em CD3⁺CD4⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	2.67±6.54	36.71±41.33	2.45±1.13	0.340	0	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	1.45±3.56	0	-	1.06±2.60	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% Tnaive em CD3⁺CD4⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	12.09±14.46	13.47±19.95	0.68±0.70	1.000	10.09±16.67	0.51±0.59	0.532	8.18±14.35	0.41±0.51	0.532
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	9.45±14.76	12.89±23.07	3.94±2.88	0.462	6.06±14.85	1.85±1.85	1.000	9.70±19.03	2.96±2.37	0.599
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	5.24±6.49	0	0	-	2.35±5.76	0	-	3.74±9.16	0	-
% TEMRA em CD3⁺CD4⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	20.81±14.19	24.89±24.53	1.72±1.53	0.678	9.03±14.26	0.62±0.89	0.655	10.30±17.24	0.71±1.07	0.655
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	10.78±17.64	10.35±25.36	2.25±2.25	1.000	11.45±28.04	2.48±2.48	1.000	10.14±24.83	2.20±2.20	1.000
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	5.42±9.86	0	0	-	0	0	-	0	0	-

^d - Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

^b - Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

Tabela 9: Percentual dos perfis de memória de células T *ex vivo* e *in vitro*, e seus perfis de ativação celular no final do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo.

Fim do tratamento (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	14.52±17.14 ^d	3.30±8.09	0.18±0.28	0.462	7.56±12.16	0.43±0.42	0.755	13.65±16.97	0.78±0.59	0.928
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% MC em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	13.86±21.07	13.16±8.55	0.32±0.27	0.093	16.97±13.48	0.42±0.43	0.179	29.11±30.87	0.72±1.00	0.484
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0.93±1.49	6.98±10.68	2.23±2.54	0.732	1.43±2.26	0.45±0.53	0.532	4.02±2.50	1.28±0.59	0.415
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	6.48±8.87	3.98±8.54	2.12±2.42	0.924	2.71±6.64	1.44±1.88	0.752	5.09±8.66	2.72±2.46	0.755
% Tnaive em CD4 ⁺										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	10.53±20.0	18.80±30.8	0.53±1.10	0.468	18.93±24.16	0.54±0.86	0.375	30.13±30.02	0.86±1.07	0.872
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	4.40±4.33	15.41±18.25	0.72±2.32	0.240	9.84±8.34	0.46±1.06	0.064	13.33±8.61	0.62±1.09	0.064
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	30.78±30.05	14.59±30.89	1.17±1.61	0.924	14.64±26.18	1.18±1.19	0.788	23.71±31.26	1.91±0.69	0.441

^d - Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

^b - Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão.

p valor avaliado entre as CMSP estimuladas e aquelas que não receberam estímulo antigênico (BG – *background*). Significância estatística se *p* < 0,05 (Kruskal-Wallis).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 9: Percentual dos perfis de memória de células T *ex vivo* e *in vitro*, e seus perfis de ativação celular no final do tratamento para os pacientes com acompanhamento completo (continuação).

Fim do tratamento (n=6)										
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor	<i>In vitro</i>	<i>Fold</i>	<i>p</i> valor
	CMSP	Lg-Ag			Lb-Ag			Tg-Ag		
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	17.91±15.39	17.23±18.91	0.81±0.64	0.864	33.61±23.50	1.58±0.80	0.415	36.67±25.37	1.73±0.86	0.328
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	3.17±5.48	5.05±8.47	0	-	3.44±8.44	0	-	0	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0.66±1.62	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	3.95±9.68	7.57±12.08	0	-	21.77±38.34	0	-	5.65±10.11	0	-
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	3.51±8.61	3.67±8.99	0	-	0.95±2.34	0	-	0.76±1.87	0	-
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	-	0	0	-	0	0	-
% Tnaive em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	26.48±31.61	5.01±7.93	0.19±0.28	0.146	11.49±17.94	0.44±0.70	0.347	23.97±36.89	0.93±1.30	0.803
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	9.99±16.92	12.32±16.58	1.61±1.36	0.788	3.11±7.63	0.40±0.62	0.599	7.78±16.06	1.01±1.32	0.924
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	11.94±20.06	7.48±18.34	1.51±1.51	1.000	5.07±12.44	1.02±1.02	1.000	9.77±18.64	1.98±1.54	0.599
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻										
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	13.89±14.66	19.02±16.0	0.80±0.62	0.683	22.13±18.80	0.93±0.73	0.806	23.91±14.99	1.01±0.58	0.935
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	9.33±12.99	13.07±17.24	5.12±2.75	0.253	4.79±8.17	1.87±1.30	0.599	10.06±15.59	3.94±2.49	0.462
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	10.02±15.93	4.69±8.91	0.60±0.46	0.752	2.39±5.85	0.30±0.30	1.000	7.24±10.48	0.92±0.54	0.446

^d - Resultados expressos em média ± desvio-padrão.

^b - Resultado expresso em quociente da média de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*) ± desvio padrão

8.5.1 Frequência de linfócitos T naive; de memória (central e efetora) e TEMRA em paciente com leishmaniose cutânea e que apresentou falha terapêutica; na doença ativa e ao longo do tratamento anti-Leishmania.

A tabela 10 mostra-nos mesmos moldes das anteriores, como as CMSP do paciente que apresentou falha terapêutica (005/16) foram avaliadas *ex vivo* e *in vitro* e como os diferentes estímulos antigênicos inferiram na frequência das subpopulações de memória. Os valores estão expressos em percentual, pois apenas um paciente se enquadrou no grupo “falha terapêutica”.

A tabela 11 mostra como a estimulação antigênica alterou a frequência das células T de memória desse paciente, sendo os valores descritos expressos em *fold*.

Tabela 10: Frequência das células T de memória circulantes *ex vivo*, e após estímulo antigênico (*in vitro*); antes, durante e após o tratamento para paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.

Falha terapêutica (005/16)												
Doença ativa					Meio do tratamento				Fim do tratamento			
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	<i>Ex vivo</i>	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	<i>Ex vivo</i>	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag
% ME em CD4 ⁺ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	30.76 ^c	40.72	29.59	52.73	54.24	0	0	0	38.97	0	7.22	0
% MC em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	12.72	5.09	4.56	11.80	19.29	0	0	0	21.38	28.21	12.30	15.25
% T naíve em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	43.29	46.87	57.20	31.90	20.48	95.0	95.0	91.0	32.36	64.46	80.28	80.40
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁻ CCR7 ⁺)	24.33	96.46	77.73	98.0	52.85	67.07	4.86	66.01	48.73	78.93	82.02	69.70
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁺)	0	2.20	18.35	0	4.21	27.44	40.16	26.10	3.58	19.62	16.63	28.88
% T naíve em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	45.70	0	0.69	0	8.99	4.07	54.42	5.99	30.92	1.10	0.82	0.99
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	27.70	1.28	3.23	0.82	33.95	0	0	1.90	16.78	0	0.53	0

^c - Resultados expressos em percentual.

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

Ex vivo - CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Tabela 11: Avaliação do aumento de frequência nas células T de memória após estímulo antigênico; em paciente de leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; em doença ativa e ao longo do tratamento.

Falha terapêutica (005/16)									
Linfócitos T	Doença ativa			Meio do tratamento			Fim do tratamento		
	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag
% ME em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	2.39 ^b	1.74	3.10	0	0	0	0	0.74	0
% MC em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	0.40	0.36	0.93	0	0	0	2.79	1.21	1.50
% T naïve em CD4 ⁺ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	0.66	0.81	0.45	1.01	1.01	0.96	0.80	1.00	1.00
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	15.14	4.74	5.98	0.88	0.06	0.87	0.95	0.99	0.84
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	0.14	1.23	0	1.54	2.26	1.47	1.26	1.06	1.85
% T naïve em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	0	0.01	0	0.76	10.21	1.12	1.08	0.81	0.98
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻ (CD45RA ⁺ CCR7 ⁻)	0.10	0.26	0.06	0	0	1.37	0	0.85	0

^b – Resultado expresso em quociente do percentual de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

8.6 Frequência de células T ativadas (CD38+HLA-DR-, CD38+HLA-DR+ e CD38- HLA-DR+) nos perfis celulares de memória (memória central, memória efetora, T *naïve* e TEMRA) de paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica; durante doença ativa e ao longo do tratamento.

Para o paciente que apresentou falha terapêutica ao tratamento preconizado foi feita novamente uma avaliação individual dos seus valores, e a Tabela 12 abaixo, mostra o **percentual** de seus fenótipos de ativação entre as células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ e seus respectivos perfis de memória.

Para a determinação do perfil de ativação celular frente ao estímulo antigênico foi utilizado mais uma vez o índice *fold* representado na Tabela 13 como ^f que mostra a variação no quantitativo de determinado fenótipo de ativação celular quando aquela CMSP fora exposta a determinado antígeno em comparação aquelas CMSP não expostas a nenhum estímulo (BG – *background*). O índice *fold* permite observar de maneira mais clara que não houve alteração alguma em nível de expressão de marcadores de ativação celular tanto para as células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD4⁻ e seus perfis de memória no período antes do tratamento (doença ativa); Só é observado aumento na expressão de certos receptores de ativação celular no período “meio de tratamento” e “fim de tratamento” e marcadamente para as células T CD3⁺CD4⁻.

Não houve significância estatística entre nenhum fenótipo avaliado ao longo do acompanhamento do estudo para o paciente 005/16 ($p < 0,05$ - Kruskal-Wallis).

Tabela 12: Frequência de células T circulantes (*ex vivo*) e após estímulo antigênico *in vitro*; na doença ativa e ao longo do tratamento, de acordo com o perfil de ativação celular definido por HLA-DR e CD38; para o paciente de leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.

Falha terapêutica (005/16)												
Doença ativa					Meio do tratamento				Fim do tratamento			
Linfócitos T	<i>Ex vivo</i>	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	<i>Ex vivo</i>	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	<i>Ex vivo</i>	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag
% ME em CD4 ⁺												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0 ^e	33.10	90.40	36.78	14.80	0	0	0	4.61	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% MC em CD4 ⁺												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	74.04	94.56	92.0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	95.40	91.52
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Tnaive em CD4 ⁺												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	1.82	63.74	52.54	59.97	0	0	0	0	2.33	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	35.07	17.46	39.88	0	98.3	99.2	97.71	0	99.73	99.8	99.87
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	5.21	23.72	5.58	20.10	41.61	61.47	42.39	12.19	26.64	26.82	22.25
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	7.80	8.95	0	8.19	0	34.81	21.61	33.31
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	5.59	0	0	0	0	3.60	3.74	4.98
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	15.45	0	0	24.76	68.74	29.41	0	17.74	12.26	9.22
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	7.97	28.64	8.94	0	37.10	30.37	25.28
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5.42	7.56	15.37
% Tnaive em CD3 ⁺ CD4 ⁻												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	0	0	0	34.84	39.36	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	44.14	64.90	50.20	0	0	82.32	90.54
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻												
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	57.84	0	26.36	0	0	0	14.47	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	17.04	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	10.92	0	0	0	0	0	0	0

^e - Resultados expressos em percentual absoluto

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

Ex vivo - CMSP – células mononucleares de sangue periférico avaliadas *ex vivo*.

Zero (0) – não expressão de determinado fenótipo

Tabela 13: Frequência de aumento de determinado perfil de ativação de célula T após estímulo *in vitro*; antes, durante e após tratamento de paciente com leishmaniose cutânea que apresentou falha terapêutica.

Falha terapêutica (005/16)									
Doença ativa				Meio do tratamento			Fim do tratamento		
Linfócitos T	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag	Lg-Ag	Lb-Ag	Tg-Ag
% ME em CD4 ⁺	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0 ^f	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% MC em CD4 ⁺	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% Tnaive em CD4 ⁺	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% ME em CD3 ⁺ CD4 ⁻	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	1.98	2.93	2.02	1.02	1.21	1.00
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	2.57	0	2.35	1.72	1.07	1.65
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	1.18	1.23	1.63
% MC em CD3 ⁺ CD4 ⁻	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	1.13	3.14	1.34	1.74	1.20	0.90
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	1.15	4.13	1.29	1.00	0.85	0.007
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	1.04	1.45	2.95
% Tnaive em CD3 ⁺ CD4 ⁻	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
% TEMRA em CD3 ⁺ CD4 ⁻	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>	<i>Fold</i>
HLA-DR ⁺ CD38 ⁻	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁺ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HLA-DR ⁻ CD38 ⁺	0	0	0	0	0	0	0	0	0

^f – Resultado expresso em quociente do percentual de CMSP expostas ao estímulo antigênico, e aquelas que não foram submetidas ao estímulo (BG – *background*).

Lg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) guyanensis*; Lb-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *L.(V.) braziliensis*; Tg-Ag – CMSP estimuladas *in vitro* com antígeno de *T. gondii*.

Zero (0) – não expressão de determinado fenótipo

