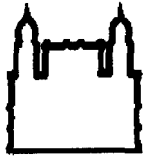




UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação das células T CD8⁺ em pacientes com Leishmaniose
Tegumentar Americana**

Claire da Silva Santos

**Salvador – Bahia - Brasil
2009**





UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação das células T CD8⁺ em pacientes com Leishmaniose
Tegumentar Americana**

Claire da Silva Santos

Orientadora: Dra. Cláudia Ida Brodskyn

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia - Brasil

2009



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

S237a Santos, Claire da Silva
Avaliação das células T CD8 em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana
[manuscrito] / Claire da Silva Santos. - 2009.
89 f.; 30 cm

**Dissertação (mestrado) - Fundação Oswaldo Cruz. Centro de Pesquisa
Gonçalo**

Moniz. Pós-Graduação em Patologia Humana, 2009.
Orientadora: Profa. Dra. Claudia Ida Brodskyn.

1. Células T CD8 2. Leishmaniose . 3. L. braziliensis. 4. Granzima B. I.Título.

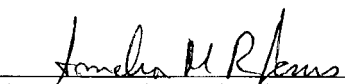
CDU 57.086.8:616.993.161

“Avaliação da célula TCD8+ em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana”.

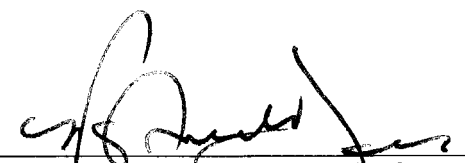
CLAIRE SILVA SANTOS

FOLHA DE APROVAÇÃO

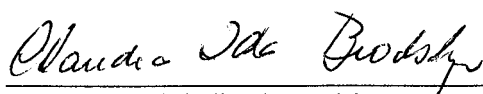
COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus
Professora Adjunta
UFS



Dr. Washington Luís Conrado dos Santos
Pesquisador Titular
FIOCRUZ-UFBA



Dra. Cláudia Ida Brodskyn
Pesquisadora Titular
FIOCRUZ-UFBA

“Eu aprendi que todos querem
viver no topo da montanha,
mas toda felicidade e crescimento
ocorrem quando você está escalando-a.”
William Shakespeare

Agradeço a Deus pela dádiva da vida,
aos meus pais Getúlio Rodrigues dos Santos
e Francisca Joana da Silva Santos
pelo exemplo de vida, pelos ensinamentos
e pelo apoio incondicional,
aos meus irmãos Cleverson e Cledison
pela cumplicidade, e a todos os meus amigos
pelo companheirismo.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a colaboração de várias pessoas, tendo cada uma delas participação essencial para seu desfecho. Gostaria de demonstrar minha gratidão por cada gesto de apoio e atenção durante estes anos de trabalho, dentro e fora do laboratório.

Cláudia Brodskyn

Manoel Barral-Netto

Aldina Barral

Viviane Boaventura

Cristina Ribeiro B. Cardoso

Camila Indiani

Valeria Borges

José Andrade

Jorge Clarêncio

Jackson Costa

Juqueline Rocha Cristal

Maiana Pitombo

Natalia Machado

Jaqueline França

Elze Leite e Andrezza Kariney Miranda

Colegas e professores do curso de pós-graduação Patologia Humana e Experimental FIOCRUZ

Amigos LIP e LIM1

Todos do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Todos do Centro de Referência de doenças Endêmicas do Vale de Jequiriça

CNPq e FAPESB (PRONEX)

Minha família

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	09
Lista de Abreviaturas.....	10
I. Resumo.....	12
II. Abstract.....	13
III. INTRODUÇÃO.....	14
III.1. LEISHMANIOSE.....	14
III.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	15
III.2.1 Leishmaniose Cutânea Localizada.....	15
III.2.2 Leishmaniose Mucosa.....	16
III.2.3 Leishmaniose Cutânea Disseminada.....	16
III.2.4 Leishmaniose Cutânea Difusa.....	16
III.3-RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	17
III.4-FUNÇÃO DAS CÉLULAS T CD8 ⁺	20
III.4.1 Células T CD8 ⁺ citotóxicas na leishmaniose.....	21
III.5- MARCADORES FENOTÍPICOS.....	23
III.5.1 Marcadores De Ativação.....	23
III.5.2 Marcador de Memória de células T.....	25
III.5.3 Marcadores de Endereçamento.....	25
IV. JUSTIFICATIVA.....	28
V. HIPÓTESE.....	29
VI. OBJETIVOS.....	29
VI.1 Objetivo geral.....	29
VI.2 Objetivos específicos.....	29
IV.2.1 Avaliar o estado de ativação das células T CD8 ⁺	29
IV.2.2 Avaliar a expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8 ⁺	29
IV.2.3 Avaliar a expressão de citocinas nos linfócitos T CD8 ⁺ após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	29
IV.2.4 Verificar o potencial citotóxico das células T CD8 ⁺ pela análise da expressão de granzima B.....	29
VII. MATERIAIS E MÉTODOS.....	30
VII.1. Área de Estudo.....	30
VII.2 Pacientes.....	30
VII.3 Critério de Inclusão.....	30
VII.4 Critérios de Exclusão.....	31
VII.5 Controles Saudáveis.....	31
VII.6 Parasitas.....	31
VII.7 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico.....	31
VII.8 Determinação do fenótipo de células mononucleares do sangue periférico.....	32
VII.9 Re-estimulação <i>in vitro</i>	33
VII.10 Detecção de citocinas no sobrenadante da cultura.....	34
VII.11 Detecção de citocinas intracelulares e granzima B.....	34
VII.12. Biópsia.....	35

VII.13. Obtenção de células da Biópsia e da Pele Normal	35
VII.14. Determinação do fenótipo das células obtidas das biopsias por Citometria de Fluxo	36
VII.15. Microscopia Confocal	36
VII.16. Análise estatística	37
VIII. DESENHO EXPERIMENTAL	38
IX. RESULTADO	39
IX.1. Expressão de Marcadores de ativação nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺	39
IX.2. Expressão do Marcador de Memória nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺	42
IX.3. Expressão de Marcadores de Endereçamento nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺	44
IX.4. Produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico após 24h de estimulação com <i>L. braziliensis</i>	50
IX.5. Expressão de citocinas nas células T após 24h de estimulação com <i>L. braziliensis</i>	51
IX.6. Expressão de granzima B nas células T CD8 ⁺ após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	52
IX.7. Células T CD8 ⁺ expressando granzima B na biópsia	53
IX.8. Caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório no tecido da lesão	54
X. DISCUSSÃO	57
XI. CONCLUSÃO	66
XII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
XIII. ANEXO	
XIII.1. Dados Clínicos Dos Pacientes.....	84
XIII.2. Anticorpos Utilizados Nas Análises De Citometria De Fluxo	85
XIII.3. Ficha Clínico- Epidemiológica.....	86
XIII.3. Termo De Consentimento Esclarecido.....	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação gráfica da poluição linfocitária analisada	33
Figura 2. Expressão de marcadores de ativação nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ <i>ex vivo</i>	40
Figura 3. Expressão de marcadores de ativação nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	41
Figura 4. Expressão do receptor de IL-2 (CD25) nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ da biópsia....	42
Figura 5. Expressão de marcador CD45RO nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ <i>ex vivo</i>	43
Figura 6. Expressão do CD45RO nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	43
Figura 7. Expressão do CD45RO nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ da biópsia.....	44
Figura 8. Expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ <i>ex vivo</i>	46
Figura 9. Expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	48
Figura 10. Expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ da biópsia.....	49
Figura 11. Produção de citocinas pelas células mononucleares do sangue periférico após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	50
Figura 12. Porcentagem de células T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ produtoras de IFN- γ e IL-2 após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	52
Figura 13. Porcentagem de células T CD8 ⁺ produtoras de granzima B após estimulação com <i>L. braziliensis</i>	53
Figura 14. Expressão de granzima B pelas células T CD8 ⁺ na biópsia.....	54
Figura 15. Caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório no tecido da lesão.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	“Cell Differentiation Molecule”
CLA	“Cutaneous Lymphocyte Antigen”
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CCR	CC Chemokine Receptor
CCL	CC Chemokine Ligand
DNA	Ácido dextroribonucleico
FACS	“Fluorescence-activated Cell Sorting”
FasL	“Fas ligand”
FSC	“Forward Scatter”
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LACK	“Leishmânia homolog of receptors for activated C-kinase”
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
NK	“Natural Killer”
NKT	“Natural Killer T”
NO	Óxido Nítrico
RNA	Ácido ribonucléico
PBS	Tampão-fosfato salina
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PSGL-1	“P-selectin glycoprotein ligand-1”
SLA	“Soluble Leishmânia Antigen”
SSC	“Side Scatter”
Tc1	“T cytotoxic type 1 cell”
Tc2	“T cytotoxic type 2 cell”

LISTA DE ABREVIATURAS

CD	“Cell Differentiation Molecule”
CLA	“Cutaneous Lymphocyte Antigen”
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CCR	CC Chemokine Receptor
CCL	CC Chemokine Ligand
DNA	Ácido dextroribonucleico
FACS	“Fluorescence-activated Cell Sorting”
FasL	“Fas ligand”
FSC	“Forward Scatter”
HIV	“Human Immunodeficiency Virus”
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN-γ	Interferon gama
IL	Interleucina
LACK	“Leishmânia homolog of receptors for activated C-kinase”
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LCM	Leishmaniose cutânea mucosa
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose visceral
NK	“Natural Killer”
NKT	“Natural Killer T”
NO	Óxido Nítrico
RNA	Ácido ribonucléico
PBS	Tampão-fosfato salina
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PSGL-1	“P-selectin glycoprotein ligand-1”
SLA	“Soluble Leishmânia Antigen”
SSC	“Side Scatter”
Tc1	“T cytotoxic type 1 cell”
Tc2	“T cytotoxic type 2 cell”

TCR	“T-Cell Receptor”
TGF	Fator transformador do crescimento
Th	“T helper”
TNF	Fator de necrose tumoral

RESUMO

Avaliação das células T CD8⁺ em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana.

A imunopatogênese da leishmaniose cutânea é dependente de uma complexa rede de interação envolvendo tanto o parasita quanto fatores do hospedeiro. As células T CD8⁺ são importantes na resposta imune do organismo contra vírus, porém pouco é conhecido sobre sua participação na defesa contra parasitas. Durante a fase aguda da infecção por leishmânia, um grande número de células T CD8⁺ tem sido observado tanto nas lesões como também no sangue periférico dos pacientes. Nesse estudo avaliamos os linfócitos T CD8⁺ tanto no sangue periférico quanto em biópsias de pacientes com leishmaniose tegumentar americana na fase inicial da infecção. Análises de citometria de fluxo (FACS) foram feitas para caracterizar a expressão de marcadores de ativação (CD25 e CD71), endereçamento (CD62L, CCR7 e CLA), produção de citocinas e expressão de Granzima B em células mononucleares do sangue periférico *ex-vivo* e após a estimulação com *Leishmania braziliensis*, como também, nas células obtidas de biópsias. Uma maior frequência na expressão de marcadores de ativação (CD25 e CD71) e endereçamento (CLA) foi observada nas células T CD8⁺ dos pacientes, tanto nas análises do *ex-vivo* quanto após estimulação com leishmânia. Uma maior frequência de células T CD8⁺CLA⁺ foi também encontrada nas biópsias, sugerindo que essas células estariam se deslocando do sangue periférico para o tecido da lesão. Análises de FACS mostraram ainda uma maior produção de IL-10 e granzima B nas células T CD8⁺ após estimulação com leishmânia sugerindo que essas células podem estar participando dos mecanismos de regulação e citotoxicidade. Análises de imunofluorescência do tecido da lesão mostraram uma co-localização entre as células T CD8⁺ e granzima B, indicando um possível papel citotóxico dessas células. Esses resultados sugerem que as células T CD8⁺, de pacientes com leishmaniose cutânea localizada na fase inicial da infecção, apresentam um perfil característico de células efetoras e que tais células estão se dirigindo para o tecido da lesão, onde exercem uma ação citotóxica e reguladora.

Financiamento: CNPq, FAPESB (PRONEX)

Palavras-chave: células T CD8⁺, leishmaniose, *L. braziliensis*, Granzima B.

ABSTRACT

Evaluation of CD8⁺ T cells in patients with American Tegumentar Leishmaniasis.

The immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis is dependent on a complex network of interaction involving both the parasite and host factors. CD8⁺ T cells are important in the immune response against viruses, but little is known about their involvement in defense against parasites. During the acute phase of infection with leishmania, a large number of CD8⁺ T cells have been observed both in the lesions but also in the peripheral blood of patients. As shown by our group, these cells are involved in the chronicity of infection through the exacerbation of tissue lesions caused by *Leishmania braziliensis*. In this study we evaluated CD8⁺ T lymphocytes both in peripheral blood and in biopsies of patients with American Tegumentar Leishmaniasis in the early phase of infection. Analysis by flow cytometry (FACS) was performed to characterize the expression of activation markers (CD25 and CD71), and addressing (CD62L, CCR7 and CLA), markers as well as- the production of cytokines and expression of granzyme B in peripheral blood mononuclear cell (PBMC) ex vivo and after stimulation with *Leishmania braziliensis*. We also performed the analysis in cells obtained from patients' biopsies. Increase in the frequency of expression of activation (CD25 and CD71) markers and addressing markers (CLA) was observed in CD8⁺ T cells of patients, both in the *ex vivo* analysis or after stimulation with leishmania. Higher frequency of CD8⁺CLA⁺ T cells was also found in the biopsies, suggesting that these cells would migrate from peripheral blood to the lesion. FACS analysis showed increase production of IL-10 and granzyme B in CD8⁺ T cells after stimulation with leishmania suggesting that these cells may participate of the mechanisms of regulation and cytotoxicity. These results suggest that CD8⁺ T cells in patients with ATL in early stages of infection, have a peculiar profile of effectors cells and such cells migrate to the tissue of the lesion, where act in cytotoxic and regulatory response.

Supported by CNPq, FAPESB (PRONEX)

Keywords: CD8⁺ T cells, leishmaniasis, *L. braziliensis*, Granzyme B.

1- INTRODUÇÃO

1.1. LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* (família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*). São consideradas um grande problema de saúde pública e são endêmicas em 88 países das Américas Central e Sul, África e Ásia. No entanto, 90% dos casos da leishmaniose cutânea ocorrem no Iran, Afeganistão, Argélia, Arábia Saudita, Síria, Peru e Brasil. A Organização Mundial da Saúde estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco da infecção e aproximadamente dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas sejam relatados anualmente (<http://www.who.int/tdr/dw/leish2004.htm>). No Brasil foram registrados 19.070 casos da Leishmaniose Cutânea Localizada em 2008, sendo que 2.952 notificações foram provenientes da Bahia, (MS/SVS, SES e SINAN, 2008)

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos intracelulares obrigatórios, digenéticos. São encontrados na forma flagelada promastigota e na forma amastigota sem flagelo. Os promastigotas estão presentes no interior do trato digestivo do vetor, flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo). A forma amastigota encontra-se no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. A transmissão do parasita ocorre quando a fêmea do vetor flebotomíneo infectado, ao realizar seu repasto sangüíneo, pica um hospedeiro mamífero e inocula junto com a saliva as formas promastigotas metacíclicas. As formas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e se instalam no interior do vacúolo parasitóforo. Neste vacúolo, o promastigota diferencia-se em amastigota, o qual se multiplica por divisão binária e, após sucessivas divisões, o macrófago se rompe e os amastigotas liberados são fagocitados por novas células hospedeiras, propagando a infecção no hospedeiro vertebrado (revisado em Genaro et al., 2000).

A transmissão para o hospedeiro invertebrado ocorre quando a fêmea do flebótomo, ao se alimentar em um hospedeiro infectado, ingere macrófagos parasitados por formas amastigotas. No interior do trato digestivo do inseto os macrófagos se rompem liberando as formas amastigotas as quais sofrem divisões multiplicam-se e se transformam em promastigotas ainda no sangue ingerido, envolto pela matriz peritrófica secretada pelas células do estômago do inseto. Após a digestão, a matriz se rompe e as promastigotas colonizam o piloro ou íleo (subgênero *Viannia*) ou colonizam o estômago (subgênero *Leishmania*)

(Alexander et al., 1999). Prosseguindo a metaciclo-gênese, em ambos os casos, as promastigotas migram para as regiões anteriores do intestino e, no segundo repasto sanguíneo, quando o flebótomo infectado ingere o sangue, ele ejeta as formas promastigotas metacíclicas pelo mesmo canal (Schlein, 1993).

O gênero *Leishmania* pode ser dividido em dois subgêneros: o subgênero *Leishmania* que engloba o complexo *Leishmania donovani* e o complexo *Leishmania mexicana* e o subgênero *Viannia* que engloba o complexo *Leishmania braziliensis* somente (Lainson et al., 1987). As leishmanioses, por sua vez, apresentam duas formas clínicas principais: a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar (LT). A LV é uma forma grave e pode ser fatal se não tratada. Consiste em uma infecção generalizada que acomete o sistema reticuloendotelial envolvendo baço, fígado, medula óssea e linfonodo (revisado em Bittencourt and Barral-Netto, 1995) A leishmaniose tegumentar apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas sendo as principais a leishmaniose cutâneo-localizada (LCL), a leishmaniose cutânea mucosa (LCM) e a leishmaniose cutâneo-difusa (LCD). Nas Américas, a LT é causada por uma variedade de espécies sendo seus principais agentes etiológicos a *Leishmania braziliensis*, a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania guyanensis*, enquanto que, no Velho Mundo, as espécies responsáveis por esta manifestação da doença são, entre outras, a *Leishmania tropica*, a *Leishmania major* e a *Leishmania aethiops*. A ocorrência de diferentes manifestações clínicas da leishmaniose depende de complexas interações que abrangem, desde a característica infectiva da espécie de *Leishmania* até o estado imunológico do hospedeiro humano (Pearson and Sousa, 1996).

1.2. ASPECTOS CLÍNICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Um amplo espectro de formas clínicas pode ser vistos na LTA.

1.2.1- Leishmaniose Cutânea Localizada

A LCL é a forma clínica mais freqüente sendo que no Brasil é ocasionada, principalmente, pelas espécies *L. braziliensis* e *L. amazonensis*. A LCL tem como principal característica uma lesão ulcerada que se desenvolve, geralmente, nos membros inferiores, no local de inoculação do parasito pelo inseto vetor. A lesão ulcerada com fundo granuloso, de bordos bem delimitados, elevado e eritematoso geralmente indolor é a apresentação mais comum. Podem ocorrer lesões cutâneas únicas ou múltiplas. Ocasionalmente, lesões verrugosas

são observadas (Marsden, 1986). Um achado clínico encontrado em alguns pacientes é a linfadenopatia regional, que, por vezes precede o aparecimento de lesões cutâneas (Barral et al., 1992). Alguns casos podem evoluir para a cura espontânea, contudo, a maioria requer tratamento com drogas leishmanicidas (Costa et al., 1990; Marsden et al., 1984). Alguns pacientes podem apresentar lesões múltiplas, decorrentes possivelmente de picadas múltiplas do vetor (Pearson and Sousa, 1996).

1.2.2- Leishmaniose Mucosa

Estima-se que 3 a 5% dos casos de LCL causados por *L.braziliensis* desenvolvam lesão cutânea mucosa (Marsden, 1986; Netto et al., 1990). Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver LM (Marsden, 1990). A forma mucosa é classicamente tida como secundária e metastática havendo mais raramente a possibilidade de ocorrer acometimento da mucosa por contigüidade das lesões de pele na face ou por inoculação direta do parasito. A LM se expressa principalmente por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores acometendo palato mole e duro, úvula, faringe, gengivas e lábio superior (Castes et al., 1984).

1.2.3 Leishmaniose Cutânea Disseminada

É uma expressão relativamente rara, aproximadamente 2% dos pacientes com LCL apresentam disseminação da lesão inicial. Pode-se observar o aparecimento de múltiplas lesões pequenas, papulares e de aparência acneiforme, que podem atingir cerca de 800 lesões espalhadas por várias partes do corpo (Carvalho et al., 1994). Em 38 % dos pacientes, aproximadamente, ocorre comprometimento concomitante das mucosas e manifestações sistêmicas, como febre, dores musculares e calafrios sugerindo que a disseminação seja hematogênica (Carvalho et al., 1994; Costa et al., 1986)

1.2.4 Leishmaniose Cutânea Difusa

A LCD constitui uma forma clínica rara, porém grave. Inicia-se com uma lesão única que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões cutâneas. As lesões da mucosa são discretas e superficiais, sem

dano tecidual como as observadas na forma cutâneo-mucosa. A forma não responsiva caracteriza-se por não apresentar úlcera, ter curso lento e progressivo, com resposta imune anérgica (Convit and Kerdel-Vegas, 1965; Da Silva, 1982). A forma subpolar pode apresentar sinais de resposta imune e lise do parasito, com a cura espontânea de lesões em algumas áreas do corpo (Barral et al., 1995; Costa et al., 1995). A resposta à terapêutica é refrataria em ambos os casos.

1.3-RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

O controle de uma infecção depende da capacidade do nosso organismo em montar uma resposta imune eficiente contra o agente infeccioso. O controle dessa resposta é fundamental para o estabelecimento da patologia ou da cura. Essa ação coordenada do sistema imune envolve a mobilização de mecanismos inflamatórios e antiinflamatórios (Faria et al., 2005).

A leishmânia é um parasito intracelular obrigatório no hospedeiro vertebrado e a resposta imune protetora à esse parasito se caracteriza por uma imunidade celular (Bryceson, 1970; Da-Cruz et al., 2002). Os eventos iniciais que ocorrem após o estabelecimento da infecção podem ser determinantes para o curso da resposta efetora. A resposta imune celular na leishmaniose vem sendo amplamente estudada em modelos que utilizam camundongos resistentes e susceptíveis a infecção com diferentes espécies de leishmânia. Modelos de resistência a *Leishmania major* têm sido caracterizados pelo desenvolvimento de uma resposta Th1 (do inglês *T helper 1*) associada com a produção de citocinas pró-inflamatórias com IL-12, IL-2, IL-8, IFN- γ e TNF- α . O IFN- γ leva à ativação de mecanismos leishmanicidas do macrófago como a síntese de óxido nítrico (NO) (Liew et al., 1990; Murray and Cartelli, 1983), de radicais livres derivados do oxigênio e de enzimas lisossomais (Channon et al., 1984; Murray, 1981; Passwell et al., 1994) que levam a destruição do parasita. O TNF- α também está envolvido na indução da ativação de macrófagos em sinergismo com IFN- γ , estimulando-os a produzirem óxido nítrico (NO) (Liew et al., 1990; Theodos et al., 1991). Além disso, o IFN- γ induz a ativação de células dendríticas e a secreção de interleucina 12 (IL-12) por células apresentadoras de antígenos. A IL-12 é uma citocina com importante papel na indução da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (Gumy et al., 2004). A secreção de IL-12 pode ser desencadeada pela fagocitose do parasito e pode ser amplificada pelo IFN- γ (Marovich et al., 2000; Sutterwala and Mosser, 1999), estabelecendo uma importante alça de ampliação positiva

(Belosevic et al., 1989; Heinzl et al., 1995) que induzem a destruição do parasito pelo macrófago (Nacy et al., 1985; Reiner and Locksley, 1995).

A susceptibilidade da infecção do modelo murino está associada com a resposta Th2 (do inglês *T helper 2*), caracterizada pela produção de IL-4, IL-10, IL-5, IL-13 e TGF- β . A interleucina 4 (IL-4), interleucina 13 (IL-13) e o fator transformador do crescimento beta (TGF- β) inibem a produção de intermediários reativos de oxigênio em macrófagos ativados por IFN- γ (Bogdan et al., 2000) possibilitando a sobrevivência dos parasitas e progressão da doença (Hondowicz and Scott, 1999; Launois et al., 1997). IL-10 é uma importante citocina imunomodulatória, parece regular a resposta imune tanto em camundongos susceptíveis como em resistentes. A produção do IL-10 tem sido atribuída a mecanismos supressores mediados por um subtipo de células T denominado células T regulatórias (T reg) (Belkaid, 2003). IL-10 é um potente inibidor da produção de IFN- γ (Belkaid et al., 2001) e TNF- α (Antonelli et al., 2004) esse fato favorece a persistência do parasita no tecido das lesões (Belkaid et al., 2001). No entanto, a produção de IL-10 por células Treg parece ser importante para manutenção da imunidade em camundongos resistentes (Belkaid et al., 2002a). Células T regulatórias produtoras de IL-10 também têm sido demonstradas em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea (Campanelli et al., 2006). Entretanto, esse mecanismo precisa ser melhor esclarecido, já que trabalhos com toxoplasmose (Jankovic et al., 2007) e também com leishmaniose (Anderson et al., 2007) têm atribuído a células Th1 a produção do IL-10.

Assim como é observado no modelo experimental, na leishmaniose humana o perfil de linfócitos T e as citocinas que são produzidas por essas células estão associadas ao processo de cura (Coutinho et al., 1998; Coutinho et al., 1996; Da-Cruz et al., 1994), ao desenvolvimento da doença (Bomfim et al., 1996; Carvalho et al., 1985; Ribeiro-de-Jesus et al., 1998) e também aos mecanismos de proteção (Castes et al., 1994; Mendonca et al., 1995).

Na leishmaniose cutânea humana observa-se um amplo espectro de formas clínicas e a resposta imune desempenha um importante papel na patogênese, não existindo uma clara polarização da resposta imune em Th1 ou Th2 como o observado em modelos experimentais com *L. major* (Ajadary et al., 2000). O controle da infecção parece estar relacionado com uma resposta inflamatória modulada (Bottrel et al., 2001; Reed et al., 2003). Os pacientes com leishmaniose cutânea disseminada têm uma resposta imune anérgica aos antígenos de leishmânia. Ensaios *in vitro* com células mononucleares do sangue periférico (CMSP) desses pacientes quando estimuladas com antígenos de leishmânia mostraram produção de TNF- α e IFN- γ em níveis inferiores ao observados em pacientes com LCL, enquanto que a produção de

citocinas antiinflamatórias como IL-5 e IL-10 foi similar entre as duas formas da doença (Leopoldo et al., 2006). A LCD é caracterizada pela ausência da resposta imune mediada por célula para leishmânia (Convit et al., 1993; Zerpa et al., 2007). As CMSP desses pacientes quando estimuladas com antígenos de leishmânia produzem altas concentrações de citocinas como IL-10, IL-4 e também IL-2, e nenhuma produção de IFN- γ é observada (Bomfim et al., 1996). A LM por outro lado, faz parte do pólo hiper-responsivo da doença, os pacientes com essa patologia desenvolvem uma resposta imune exacerbada (Bacellar et al., 2002) com teste intra-dérmico de Montenegro (IDRM) positivo (Antonelli et al., 2005; Convit et al., 1993; Pirmez et al., 1993). As CMSP quando estimuladas com antígenos de leishmânia produzem altos níveis de TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL-10, quando comparados com LCL (Bacellar et al., 2002). Os pacientes com LCL, por outro lado, desenvolvem uma resposta imune apropriada e bem modulada, com uma mistura de citocinas pró e antiinflamatórias, a resposta ao teste IDRM também é positiva nesse pacientes.

Os pacientes com LCL infectados com *L. braziliensis* mostram um aumento preferencial de células T CD4⁺ no sangue periférico na fase ativa da doença (Da-Cruz et al., 1994). As células T CD4⁺ são as principais células produtoras de IFN- γ após estimulação *in vitro* com antígeno solúvel de leishmânia (SLA) (Antonelli et al., 2004; Bottrel et al., 2001). Esses pacientes também produzem IL-10, que exerce uma importante função na regulação da resposta imune necessária para o controle da infecção, inibindo alguns efeitos produzidos pelo IFN- γ (Bacellar et al., 2002; Belkaid et al., 2001; Gomes-Silva et al., 2007; Rocha et al., 1999) como a resposta inflamatória exacerbada encontrada em pacientes com LM (Brodszyn et al., 1997; Gomes-Silva et al., 2007). Um fator importante da infecção por leishmânia é que a resposta imune encontrada no tecido da lesão parece ser diferente da vista no sangue periférico (Pirmez et al., 1990). Em pacientes com LCL, causada por *L. braziliensis*, a cura da infecção esta associada à produção de IFN- γ (Kolde et al., 1996) e IL-2 que predominam sobre a produção de IL-4 (Louzir et al., 1998; Pirmez et al., 1993). No entanto, a alta frequência de linfócitos produzindo IFN- γ e TNF- α tem se correlacionado com o tamanho da lesão, o que pode indicar que essas citocinas estejam contribuindo para o dano tecidual (Antonelli et al., 2005). Já foi demonstrado também que IL-4 e IL-13, citocinas antiinflamatórias, são encontradas no tecido em lesões iniciais, sugerindo que teriam um papel na imunoregulação de leões recentes (Bourreau et al., 2003). Em pacientes curados a imunidade adquirida à infecção é caracterizada pela manutenção da produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e T CD8⁺ reativas a leishmânia (Da-Cruz et al., 2002)

1.4-FUNÇÃO DAS CÉLULAS T CD8⁺

As células T CD8⁺ são importantes na resposta imune do organismo contra vírus, porém pouco é conhecido sobre sua participação na defesa contra parasitas (Ruiz and Becker, 2007). A ação citotóxica das células T CD8⁺ pode ocorrer por meio de três mecanismos complementares. Dois envolvem o contato direto entre as células T CD8⁺ e as células alvo e são eles: citotoxicidade mediada por grânulos e interação de moléculas expressas na membrana das células T CD8⁺ e das células alvo (Trapani and Smyth, 2002). O terceiro mecanismo é mediado pela secreção de citocinas como IFN- γ e TNF- α (Harty et al., 2000; Muller et al., 1994).

Após o reconhecimento do antígeno e posterior ativação, as células T CD8⁺ ligadas especificamente às células alvo liberam o seu conteúdo de grânulos induzindo a morte celular por apoptose (Smyth et al., 2001), essa especificidade evita que as células adjacentes ou mesmo as células T CD8⁺ citotóxicas sejam lisadas. Os grânulos contem várias moléculas que incluem proteínas formadoras de poro, denominadas perforina, granulinas, serinas proteases, chamadas de granzimas (Krensky, 2000; Smyth et al., 2001). A maioria dessas proteínas citolíticas encontra-se pré-sintetizadas e já estão prontas para serem usadas. A perforina tem um papel essencial no processo de lise celular, primeiro com a formação de poros na membrana da célula alvo e mais importante, favorecendo a entrada de outros mediadores do endossoma para o citosol e o núcleo (Browne et al., 1999; Shi et al., 1997).

As células T CD8⁺ citotóxicas de camundongos possuem oito granzimas identificadas (A-G e M), mas apenas cinco granzimas são conhecidas em humanos (A, B, H, M e triptase 2 que também é conhecida como granzima3) (Trapani, 2001), mas as granzimas A, B são as mais abundantes e possuem vias distintas de indução de apoptose. A granzima B é a mais bem caracterizada e atua através de vias dependentes e independentes de caspases para induzir a rápida fragmentação do DNA e é a principal protease responsável pela apoptose das células alvo (Heusel et al., 1994; Smyth et al., 2001). As caspases formam uma família conservada de cisteínas proteases que apresentam diversas funções em respostas inflamatórias e em vias de apoptose celular (Ho and Hawkins, 2005).

A granzima A induz um aumento da acessibilidade do DNA para endonucleases exógenas e induz ativação de caspases de maneira menos eficiente que a granzima B (Trapani, 2001). Os genes de perforina e granzima podem ser diferentemente regulados e expressos em populações de células T CD8⁺ ativas, em infecções com o vírus da influenza em camundongos,

por exemplo, observa-se um aumento da indução de perforina e granzimas A e B, mas não de granzima C (Johnson et al., 2003).

Outro mecanismo utilizado pelas células T CD8⁺ para induzir morte celular por apoptose é a via do Fas/FasL. O Fas (CD95) é um membro da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) expresso por todos os tipos celulares (Cascino et al., 1995; Li et al., 1998). A interação do Fas com uma proteína de membrana expressa pelas células T CD8⁺ ativadas, chamada ligante de FasL (CD95L), leva a ativação de caspase-8, e conseqüentemente à indução da morte celular por apoptose (Trapani and Smyth, 2002).

O terceiro mecanismo é mediado pela secreção de citocinas. Anteriormente acreditava-se que as células T CD8⁺ fossem formadas por uma população homogênea de células T citolíticas e com capacidade limitada de produção de citocinas (Vukmanovic-Stejic et al., 2000). Atualmente, estudos vêm demonstrando que as células T CD8⁺ podem produzir uma variedade de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β , e de acordo com as suas características e com as citocinas produzidas elas foram subdivididas em Tc1 e Tc2 (Salgame et al., 1991). As células T CD8⁺ têm um papel importante na regulação da ativação e diferenciação das células T CD4⁺ (Vukmanovic-Stejic et al., 2000). Essa regulação pode ser mediada através da secreção de citocinas ou por interação direta entre as células. Essas células também possuem a capacidade de influenciar outros componentes da resposta imune, como ativação de macrófagos e regulação da produção de anticorpo pelos linfócitos B (Maggi et al., 1994).

1.4.1 CÉLULAS T CD8⁺ CITOTÓXICAS NA LEISHMANIOSE

Muito do que se tem descrito na literatura sobre a ação das células T CD8⁺ na leishmaniose foi demonstrado em modelos murinos. Em 1991, Muller et al. mostraram que com a depleção transitória inicial de células T CD4⁺ em camundongos susceptíveis a infecção com *L. major* podiam se tornar resistentes, essa resistência foi atribuída a um ambiente rico em células T CD8⁺. Eles também observaram nesse mesmo modelo que a ausência de células T CD8⁺ favorecia a susceptibilidade a infecção (Muller et al., 1991). Em 2003, Herath e colaboradores, utilizando esse mesmo modelo de infecção, mostraram que a depleção de células T CD8⁺, reduzia os níveis de IFN- γ produzidos, como também a frequência de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , indicando a existência de uma interação entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺. Outros estudos, porém, utilizando diferentes modelos de linhagens de camundongos

resistentes à infecção com *L. major*, demonstraram que as células T CD8⁺ não eram importantes na resolução da infecção primária, mas que essas células eram requeridas no controle de re-infecções. Em 2002, Belkaid e colaboradores utilizando um modelo de infecção que se assemelha à infecção natural, demonstraram que as células T CD8⁺ são importantes para controlar infecções primárias em camundongos resistentes infectados com *L. major* (Belkaid et al., 2002b). Essas diferenças encontradas na literatura podem estar associadas a diferentes vias de infecção e a diferentes concentrações de parasitas inoculados no tecido.

Na leishmaniose humana já foi demonstrado que as células T CD8⁺ desempenham um importante papel nos processos de cura (Coutinho et al., 1996; Da-Cruz et al., 1994; Maasho et al., 1998), e de resistência à infecção (Mendonca et al., 1995) mas, poucos trabalhos têm avaliado a participação dessas células citotóxicas na infecção primária. No entanto, as células T CD8⁺ vêm sendo observadas tanto no infiltrado inflamatório do sítio da lesão como no sangue periférico dos pacientes infectados (Ruiz and Becker, 2007). Em infecções com *L. braziliensis* foi descrito um aumento preferencial de células T CD8⁺ reativas a antígenos de leishmânia nas CMSP dos pacientes durante o processo de cura da infecção (Da-Cruz et al., 2002), essas células seriam importantes no desenvolvimento da imunidade adquirida à infecção. Entretanto, um aumento preferencial de células T CD8⁺ foi observado no infiltrado inflamatório das lesões de pacientes infectados por *L. venezuelensis* (Modlin et al., 1985), *L. panamensis* (Isaza et al., 1996), *L. braziliensis* (Da-Cruz et al., 2005) e *L. major* (Gaafar et al., 1999) na fase ativa da infecção, o que pode sugerir que fatores imunoregulatórios poderiam favorecer o recrutamento dessas células para o sítio da lesão, e que elas estariam contribuindo com os processos de eliminação do parasita, mas também poderiam estar associadas com a exacerbação da lesão tecidual.

As células T CD8⁺ podem participar do controle da infecção por leishmânia através de diferentes mecanismos como pela produção de IFN- γ (Gaafar et al., 1999; Muller et al., 1994), pela modulação da resposta das células T CD4⁺ ou pela ação citotóxica direta em macrófagos infectados (Da-Cruz et al., 1994). Tanto a citotoxicidade mediada por grânulos quanto a via do Fas/FasL parecem ser importantes no controle da infecção. Eidsmo e colaboradores, em 2005, observaram um aumento na expressão de Fas e FasL em biópsias de pacientes infectados com *L. major*. Uma maior atividade citotóxica associada com a atividade da granzima B foi também observada em indivíduos infectado com *L. major* (Bousoffara et al., 2004). Esses mecanismos estariam associados com o controle da replicação do parasita.

A ação das células T CD8⁺ citotóxicas também tem sido avaliada em mecanismos que determinam a resistência à infecções contra outros patógenos. Em pacientes infectados com

Mycobacterium leprae, por exemplo, um infiltrado inflamatório rico em células T CD8⁺ citotóxicas é predominante nas lesões tuberculóides (Kahawita and Lockwood, 2008). Na malária severa a resistência a infecção tem sido correlacionada com a presença dessas células (Urban and Roberts, 2003). Mecanismos citotóxicos dependentes de liberação de grânulos são importantes na resistência à infecções aguda, crônica e secundária de *T. gondii* (Dlugonska, 2000). Modelos experimentais de infecção com o *Trypanosoma cruzi* também mostram a importância de mecanismos efetores das células T CD8⁺ no controle da parasitemia (Brodskyn et al., 1996; Harty et al., 2000), em infecções com *Listeria monocytogenes* a participação dessas células é correlacionada com a resistência e a imunidade (Pamer, 2004).

Entretanto, a ação das células T CD8⁺ também tem sido associada com a cronicidade das infecções. Na LM a exacerbação do dano tecidual observado nos pacientes tem sido relacionado à presença de células T CD8⁺ citotóxicas (Barral-Netto et al., 1995; Brodskyn et al., 1997) e a elevada produção de IFN- γ e TNF- α encontrados tanto no sangue periférico como no sítio da lesão (Bacellar et al., 2002; Tuon et al., 2008)

1.5- MARCADORES FENOTÍPICOS

1.5.1- Marcadores de Ativação

A estimulação de leucócitos leva à expressão de diversos marcadores associados com padrões diferentes de ativação. Dentre essas moléculas destacam-se CD69, CD71 e CD25. CD69 é um receptor de superfície expresso em linfócitos T, linfócitos B, monócitos, células natural killer, neutrófilos e plaquetas (Bajorath and Aruffo, 1994; Natarajan et al., 2000; Sancho et al., 2005). O ligante biológico do CD69 ainda é desconhecido (Bajorath and Aruffo, 1994) e sua expressão é encontrada em linfócitos T ativados, mas não em células T em repouso (Sancho et al., 2005). Na leishmaniose muitos trabalhos têm correlacionado a expressão de marcadores de ativação e a resposta das células T. Em 2005, Antonelli et al., observaram uma correlação positiva entre a frequência de células T CD4⁺ expressando CD69 e o tamanho da lesão (Antonelli et al., 2005). Em 2002, Diaz e colaboradores demonstraram um aumento significativo do número de células T expressando CD69 no tecido da lesão de pacientes com Leishmaniose Cutânea Intermediária. Uma maior frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando CD69 tem sido observada, também, em infecções com *Listeria monocytogenes* (Maruyama et al., 2007).

Embora a maioria dos trabalhos *in vitro* sugira que CD69 atua como receptor com função pró-inflamatória, já que a sua expressão está associada com a indução da produção de

IL-2 (Cebrian et al., 1988), síntese de TNF- α (Santis et al., 1992), indução da secreção de óxido nítrico pelos monócitos (De Maria et al., 1994) e degranulação de plaquetas (Testi et al., 1990), recentes resultados *in vivo* indicam que esse receptor pode atuar como molécula regulatória, pela indução da produção de TGF- β , modulando a resposta inflamatória (Han et al., 2009; Sancho et al., 2005).

CD71 é o receptor de transferrina, uma proteína que transporta o ferro no soro, é amplamente expresso em células em proliferação e diferenciação (Bayer et al., 1998). Está envolvido com a captação celular de ferro e associado de forma não covalente com a porção ζ (zeta) do TCR nas células T (Salmeron et al., 1995), sendo considerado um receptor de células T no estágio tardio de ativação. Ele é pouco expresso em linfócitos em repouso, mas sua expressão é aumentada em células ativadas. O aumento na frequência de células T expressando CD71 tem sido observado em diferentes infecções, na filariose já foi demonstrado que CMSP de pacientes quando estimuladas com larvas de filaria aumentam a frequência de linfócitos T expressando CD71 (Babu and Nutman, 2003). Uma maior frequência de células T CD8⁺ expressando CD71 também tem sido encontrada em indivíduos infectados com o HIV (Imlach et al., 2001).

A proliferação das células T ativadas é regulada pela secreção de IL-2, e pela expressão do receptor para IL-2. Esse receptor é formado por três cadeias, α , β e γ (Bayer et al., 2007; Minami et al., 1993). A cadeia α é conhecida como Tac ou CD25, é amplamente expressa nas células T após ativação (Minami et al., 1993; Reddy et al., 2004). A ligação da cadeia α com as cadeias β e γ formam um receptor de alta afinidade para o IL-2 (Giri et al., 1995). A produção do IL-2 por células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Paliard et al., 1988), e a ligação autócrina dessa citocina com seu receptor de alta afinidade induz expansão clonal das células T ativadas (Nelson and Willerford, 1998) e aumento na produção de IL-2. Foi descrito também que o bloqueio do CD25 leva a perda da atividade estimulatória e produção de citocinas pelas células T (Velten et al., 2007). A sinalização via receptor de IL-2 induz ainda proliferação e diferenciação de linfócitos B (Waldmann et al., 1984) e células NK (Fehniger et al., 2003). Uma maior frequência de células T expressando o receptor de IL-2 tem sido observada nas CMSP de pacientes com LCL como também em pacientes com leishmaniose mucosa após estimulação com antígenos de leishmânia (Castes et al., 1988). A expressão do receptor de IL-2 tem sido demonstrada também em biopsias de pacientes infectado com leishmânia (Da-Cruz et al., 2005; Lima et al., 1994).

Recentes trabalhos têm atribuído a células T CD4⁺ CD25⁺ a função de células T regulatórias (Fehervari and Sakaguchi, 2004), as quais suprimem a resposta imune de outras

células T (Sakaguchi, 2004). Assim, a participação dessas células também tem sido descrita em varias doenças auto-inume, como no diabetes mellitus, na artrite reumatóide e no lúpus eritematoso (Kuhn et al., 2009).

1.5.2- Marcador de Memória de células T

O CD45 é uma glicoproteína de membrana presente em todas as células nucleadas, essa molécula esta envolvida na transdução de sinal associada com o receptor de células T e B (Byth et al., 1996), e possui em seu domínio citoplasmático uma proteína com atividade de tirosina fosfatase (Earl and Baum, 2008). As células T podem ser funcionalmente subdivididas de acordo com a expressão de isoformas do CD45 (Beverley et al., 1988). As células T virgens expressam CD45RA, enquanto que a expressão de CD45RO está associada com células T de memória. Uma das características das células T CD4⁺ que expressam CD45RO é a maior produção de citocinas como IL-2, IFN- γ , IL-1, TNF- α , IL-5, IL-6 que as células T CD4⁺CD45RA⁺. Da mesma forma, as células T CD8⁺ que expressam CD45RO possuem maior atividade citotóxica (Akbar et al., 1990), expressam uma maior quantidade de grânulos e produzem mais IFN- γ e IL-2 (Adamthwaite and Cooley, 1994) que as células T CD8⁺ CD45RA⁺. Em biopsias de pacientes com leishmaniose cutânea já foi demonstrado uma predominância de células T expressando CD45RO (Gaafar et al., 1999; Pirmez et al., 1990). Em 2004, Antonelli et al., mostraram uma correlação positiva entre a frequência de células T CD4⁺CD45RO⁺ no *ex vivo* de pacientes com LCL e a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ específicas após estimulação com SLA (Antonelli et al., 2004). A expressão de isoformas do CD45 tem sido amplamente usada e aceita para identificar e seleccionar células T de memória e virgens (Muraro et al., 2000).

1.5.3-Marcadores de Endereçamento

Durante a resposta imune, os linfócitos circulantes migram dos órgãos linfóides para o sítio da infecção, esse processo não ocorre de forma randômica (Santamaria-Babi, 2004). Existe uma série de receptores que são expressos de forma particular propiciando a interação dos linfócitos com moléculas de adesão nos órgãos específicos. As moléculas de adesão desempenham um importante papel na migração e no recrutamento celular. As células T virgens proliferam e se diferenciam em células T efetoras após o contacto com o antígeno dentro dos órgãos linfóides secundários (Junt et al., 2004). A função efetora das células T é acompanhada pela mudança na expressão de moléculas de superfície, que facilitam a

recirculação das células T dos órgãos linfóides secundários para o tecido periférico (Sprent, 1997; Ziegler et al., 2007). A expressão de moléculas nas células que migram para os tecidos de inflamação é um evento importante na formação e manutenção das lesões de leishmaniose (Costa et al., 2003). CCR7 é um receptor das quimiocinas CCL19 e CCL21 produzidas nas zonas de células T dos órgãos linfóides secundários. Esse receptor é expresso pelas células T virgens, células T de memória central e também pelas células dendríticas (Junt et al., 2004; Seneviratne et al., 2007; Ziegler et al., 2007) e tem como principal função a migração e posicionamento dessas células dentro da zona de células T nos órgãos linfóides secundários (Forster et al., 1999; Luther et al., 2000). Células T virgens e de memória central expressam altos níveis de CCR7 e mantêm a característica de entrar nos órgãos linfóides, enquanto que a baixa expressão desse marcador está associado com o perfil de ativação dessas células e com a sua migração para órgãos periféricos. Esse marcador pode ser re-expresso possibilitando a recirculação de células T de memória efetora para dentro do linfonodo.

CD62L é um receptor de adesão da família das selectinas expresso em leucócitos. Células T que expressam altos níveis de CD62L em sua superfície são recrutadas para os órgãos linfóides secundários através da interação desse receptor com glicoproteínas de mucinas expressas nas células do endotélio. Experimentos usando modelos murinos têm demonstrado que a alta expressão desse marcador é característico de células T virgens, favorecendo o seu recrutamento para os órgãos linfóides secundários e que células T efectoras possuem uma baixa expressão desse receptor. Estudos com humanos diferem dos dados encontrados em modelos com animais, a recirculação e o recrutamento das células que expressam o CD62L ainda não estão bem definido, mas já foi demonstrado que aproximadamente metade das células T efectoras expressam altos níveis de CD62L (Tedder et al., 1990). Em 2002, Bourreau et al. demonstraram que células T $CD4^+CD62L^+$ de paciente com LCL expressavam $IFN-\gamma$ quando estimuladas com LACK (Bourreau et al., 2002a). Em 2003, Costa et al., observaram uma alta percentagem de linfócitos T $CD4^+CD62L^+$ no sangue periférico de pacientes com LCL. Eles observaram ainda que a estimulação de CMSP com SLA não leva a uma diminuição significativa na expressão do CD62L nos linfócitos T (Costa et al., 2003). Em infecções causadas por *Leishmania guyanensis* foi demonstrado a produção de $IFN-\gamma$ por células T $CD8^+CD62L^+$ quando estimuladas com LACK (Bourreau et al., 2002b).

A migração de células T para a pele é caracterizada pela expressão do antígeno linfocitário cutâneo (CLA) (Santamaria-Babi, 2004; Seneviratne et al., 2007; Sieling, 2007). O CLA é uma isoforma glicosilada do glicolipideo-1 da selectina P (PSGL-1), e se liga a selectina

E, expressa por células endoteliais de tecidos inflamados, mucosa oral e trato genital feminino (Seneviratne et al., 2007; Sieling, 2007).

CLA é expresso pela maioria das células T dentro dos infiltrados inflamatórios cutâneos e apenas 5-20% das células T no sangue periférico (Santamaria-Babi, 2004; Seneviratne et al., 2007). A frequência de células T no sangue periférico expressando CLA é aumentada em diversas doenças inflamatórias cutâneas (Seneviratne et al., 2007). Em indivíduos com dermatite atópica foi demonstrado que tanto células T CD4⁺CLA⁺ quanto células T CD8⁺ CLA⁺ isoladas do tecido de infecção ou do sangue periférico secretavam altos níveis de IL-5 e IL-13 após estimulação (Akdis et al., 1999). Essas citocinas são capazes de prevenir a apoptose espontânea de eosinófilos. Em pacientes com psoríase e dermatite atópica a frequência de células T CD8⁺CLA⁺ no sangue periférico tem se correlacionado fortemente com a severidade da doença (Santamaria-Babi, 2004; Sigmundsdottir et al., 2001). Experimentos com *Mycobacterium leprae* mostraram que as lesões de pacientes com hanseníase tuberculóide possuem uma maior expressão do CLA que a de pacientes com hanseníase lepromatosa e que essa expressão se correlaciona com a restrição do crescimento bacteriano *in vivo* (Sieling, 2007). Foi observado também que a expressão do CLA em células T está associada com a responsividade a *M. leprae in vitro* (Sieling, 2007) contribuindo para a proteção imune. Na leishmaniose cutânea foi demonstrada uma correlação positiva entre a expressão do CLA e a presença de células T CD4⁺ e T CD8⁺ no tecido da lesão sendo que a expressão dessa molécula foi maior na fase inicial que na fase tardia (Morgado et al., 2008) e apresentava-se mais elevada em lesões de pacientes com LCL que em lesões de pacientes LCI e LCD (Diaz et al., 2002).

A imunopatogênese da leishmaniose cutânea é dependente de uma complexa rede de interação envolvendo tanto o parasita quanto fatores do hospedeiro. A natureza das células que compõem o infiltrado inflamatório é de suma importância para determinar o curso da infecção. Alguns trabalhos demonstram que os linfócitos representam a maioria das células presentes nas lesões de leishmaniose cutânea, sugerindo uma comunicação entre o sangue periférico e o sítio da lesão. As moléculas de adesão são importantes para a circulação e recrutamento das células nos diferentes compartimentos do organismo. O grau de ativação celular e as substâncias que são produzidas pelas diferentes populações celulares que migram para o sítio da lesão favorecem tanto o controle da infecção como também podem estar associadas com a patogênese da doença. Desta forma, se torna importante determinar a frequência de expressão dessas moléculas nas diferentes subpopulações linfocitárias, a fim de compreender o papel que cada população celular desempenha no curso da infecção.

2- JUSTIFICATIVA

No Brasil, as leishmanioses incluem-se no quadro das grandes endemias que estão em um processo de expansão e crescimento. *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e a *L. guyanensis* são as principais causadoras das formas tegumentares da doença no Novo Mundo. Essa infecção é um importante problema de saúde pública e 30.372 casos da doença foram registrados no Brasil em 2002.

As células T CD8⁺ são importantes na resposta imune do organismo contra vírus, porém pouco é conhecido sobre sua participação na defesa contra parasitas (Ruiz and Becker, 2007). Na leishmaniose humana já foi demonstrado que essas células desempenham um importante papel nos processos de cura (Coutinho et al., 1996; Da-Cruz et al., 1994; Maasho et al., 1998), e de resistência à infecção (Mendonca et al., 1995), mas poucos trabalhos têm avaliado a participação dessas células citotóxicas na infecção primária. Durante a fase aguda da infecção, grande número de células T CD8⁺ tem sido observado tanto nas lesões como também no sangue periférico dos pacientes (Ruiz and Becker, 2007). Essas células podem participar do controle da infecção através de diferentes mecanismos como pela produção de IFN- γ (Gaafar et al., 1999; Muller et al., 1994), pela modulação da resposta das células T CD4⁺ ou através da ação citotóxica direta em macrófagos infectados (Da-Cruz et al., 1994).

Desta forma, nesse trabalho avaliamos a presença das células T CD8⁺, bem com a função desempenhada por essas células no que diz respeito ao seu endereçamento e suas diferentes funções efetoras em pacientes com LCL na fase inicial da infecção. O conhecimento do papel exercido por essas células pode ser importante para o entendimento da resposta imune no início da infecção, na modulação da patogênese da doença, além de contribuir também no delineamento de vacinas e estratégia terapêutica.

3- HIPÓTESE

Os linfócitos T CD8⁺ participam da resposta imune inicial em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada infectados por *L. braziliensis* produzindo IFN- γ e Granzima B.

4- OBJETIVOS

4.1-Objetivo Geral

Avaliar a participação dos linfócitos T CD8⁺ na resposta imune em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada na fase inicial da infecção.

4.2-Objetivos Específicos

4.2.1. Avaliar o estado de ativação através da expressão do CD25 e do CD71 nos linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico e de biópsias de pacientes com LCL na fase inicial da infecção.

4.2.2. Avaliar a expressão de marcadores de endereçamento CD62L, CCR7 e CLA nos linfócitos T CD8⁺ do sangue periférico e de biópsias de pacientes com LCL na fase inicial da infecção.

4.2.3. Avaliar a função dos linfócitos T CD8⁺ pela expressão de citocinas intracelulares nas células mononucleares do sangue periférico estimuladas com *L. braziliensis*

4.2.4. Verificar o potencial citotóxico das células T CD8⁺ pela análise da expressão de granzima B nas células mononucleares do sangue periférico estimuladas com *L. braziliensis* e em biópsias de pacientes com LCL na fase inicial da infecção

5- MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. Área de estudo

Os estudos de campo foram realizados no município de Jiquirica, Bahia, onde as leishmanioses são endêmicas. Jiquirica situa-se no sudoeste da Bahia (a 13°15' de latitude sul e 39° 35' de longitude oeste), distando 258km de Salvador. O município possui uma extensão territorial de aproximadamente 262 km², com clima tropical médio, temperatura média de 23°C e uma população estimada em cerca de 14.000 habitantes. Jequiriça tem como principal atividade econômica a agropecuária.

5.2. Pacientes

A população de leishmaniose tegumentar estudada constituiu de casos ativos de leishmaniose tegumentar (LT) diagnosticados na área de Jequiriça, Ba (Anexo A). Os pacientes foram examinados no posto por médicos especializados e submetidos a testes laboratoriais, visando o diagnóstico da doença. Todos os pacientes apresentaram teste cutâneo (intradermo reação de montenegro) e sorologia anti-*Leishmania* positivos. Foram realizadas coleta de sangue periférico e biópsia das lesões, após assinatura do termo de consentimento informado (Anexo D) pelos pacientes ou pelos seus tutores e todos os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética (parecer 124/2007).

5.3. Critérios de Inclusão

Fizeram parte do estudo os pacientes que tiveram diagnóstico clínico de Leishmaniose Cutânea Localizada, confirmados com exame anátomo-patológico com e IDRMs positivas. Os pacientes selecionados apresentavam lesão típica de Leishmaniose Cutânea Localizada com no máximo 90 dias e não haviam começado o tratamento.

5.4. Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo os pacientes com outras formas de LTA que não a LCL. Pacientes que ao procurar o ambulatório já haviam começado o tratamento e aqueles com mais de 90 dias de lesão.

5.5. Controles Saudáveis

Todos os voluntários que fizeram parte desse estudo não tinham história prévia de infecção por *Leishmania*, eram residentes de Salvador, BA, uma área não endêmica para LT. Estes indivíduos apresentaram sorologia anti-*Leishmania* negativa. Todos os voluntários foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo e os riscos inerentes aos procedimentos, e todos concordaram em participar do trabalho e assinaram o termo de consentimento.

5.6. Parasita

A cepa MHOM/BR/01/BA788 foi isolada da úlcera de um paciente com leishmaniose cutânea localizada, do estado da Bahia. O isolado foi identificado como *L. braziliensis* por PCR (Castilho et al., 2003) e anticorpos monoclonais (McMahon-Pratt et al., 1982). Os promastigotas foram mantidos em meio de cultura Schneider (Sigma, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado (Cripion), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µl/ml (Sigma). Após 7 dias de cultura, o meio de cultura contendo as formas promastigotas, em fase estacionária, foi coletado e centrifugado a 700rpm por 4 min a 20°C. O sobrenadante foi coletado e lavado 2 vezes por centrifugação a 3000rpm por 10 min em solução salina estéril. A concentração de promastigotas obtidas foi ajustada para 3×10^6 /ml em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB RH+ inativado (BD PharMingen), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µl/ml (Sigma), denominado RPMI completo, após contagem em câmara de Neubauer.

5.7. Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Aproximadamente 20mL de sangue foi coletado de cada paciente e dos controles sadios através de venopunção utilizando-se tubos de ensaio de 10mL estéreis, com vácuo e contendo anticoagulante (heparina sódica, Lique mine® 5000 UI/mL – Roche Produtos

químicos e Farmacêuticos AS, RJ, Brasil). O sangue foi diluído 1:1 com salina estéril, e posteriormente essa mistura foi cuidadosamente depositada sobre um gradiente de Ficoll-histopaque (Sigma) na proporção 1:2 com sangue, de modo que a camada de Ficoll ficasse abaixo da camada de sangue. Centrifugou-se a 1500 rpm (Centrifuga 5810R, Eppendorf Brasil) durante 30 min a temperatura ambiente. O plasma foi retirado e a camada de CMSP coletada. Essa camada foi lavada três vezes por centrifugação a 1500 rpm, 4°C por 10 min, com solução salina estéril para retirada do Ficoll residual e as células ajustadas para 3×10^6 /ml em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB RH+ inativado (BD PharMingen), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/ml e estreptomicina 100µl/ml (Sigma).

5.8. Determinação do fenótipo de células mononucleares do sangue periférico

A expressão de marcadores de superfície, nos pacientes e nos controles sadios, foi determinada por citometria de fluxo nas células obtidas *ex vivo*, bem como nas CMSP após 24h de estimulação com *L. braziliensis*. Aproximadamente 2.5×10^5 células por 200µL de PBS eram colocadas em cada tubo cônico de polipropileno de 1.5mL (LGC Biotecnologia) e incubadas com 1% de soro AB RH+ inativado (BD PharMingen) e anticorpos monoclonais anti-CD4 (FITC ou PE), anti-CD8 (PerCP-Cy5.5), anti-CD25 (PE), anti-CD62L (FITC), anti-CCR7 (PE), anti-CD71 (PE), anti-CLA (FITC) e anti-CD45RO (PE) conjugados com isoticianiano de fluoresceína (FITC), Phicoeritrina (PE) e Phicoeritrina-Cy5.5 (PE-Cy5.5) todos da BD PharMingen (Anexo B). Após a incubação, as células eram lavadas 1 vez por centrifugação a 1000rpm por 10 min e ressuspensas em 200µL em tampão de FACS (PBS 1x, 0.5% SBF, 0.01% azida de sódio). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSort (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson) com 10.000 eventos/amostras. A população linfocitária foi determinada, tendo como base os parâmetros FSC (do inglês forward scatter - FSC) versus SSC (do inglês side scatter) e a frequência das subpopulações linfocitárias foi analisada na janela delineada na região de marcação, CD4⁺ ou CD8⁺ versus SSC. Os limites dos quadrantes foram determinados com as células marcadas com os isotipos controle.

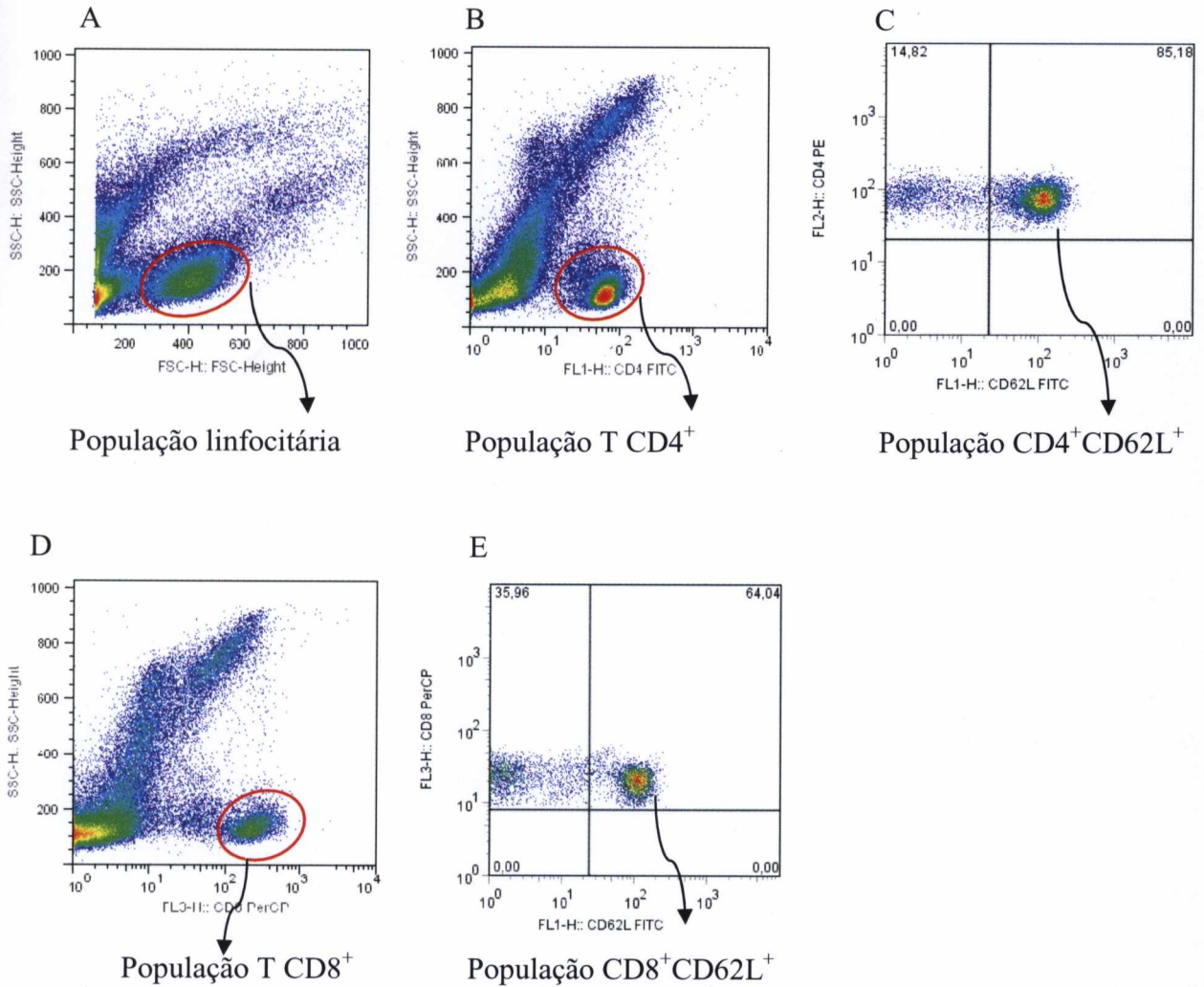


Figura 1: Representação gráfica da população linfocitária analisada. (A) População linfocitária tendo como base os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC). (B) Região de marcação da subpopulação T CD4⁺. (C) Região de marcação da subpopulação T CD4⁺CD62L⁺. (D) Região de marcação da subpopulação T CD8⁺. (E) Região de marcação da subpopulação T CD8⁺CD62L⁺.

5.9. Re-estimulação *in vitro*

Para quantificar a produção de citocinas *in vitro* nos pacientes e nos controles saudáveis, as CMSP obtidas como descrito anteriormente foram ajustadas para 3×10^6 células/ml em meio RPMI completo. As células foram plaqueadas em placas de 24 poços (Corning) e estimuladas na presença de *L. braziliensis* (3×10^6 leishmânia/ml) ressuspensas em meio RPMI completo. As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após 24 horas de incubação para detecção de IFN- γ , IL-2 e IL-10 e foram conservados a -20°C até o momento do uso. Como controle positivo, as células foram re-

estimuladas com anti-CD28 (0.5µg/ml) (BD PharMingen) e anti-CD3 solúvel (0.5µg/ml) (BD PharMingen).

5.10. Detecção de citocinas no sobrenadante da cultura

As concentrações das citocinas presentes nos sobrenadantes de cultura foram determinadas pelo método de citometria de fluxo usando um kit de imunoenensaio comercial para citocinas (Cytometric Bead Array- BD Bioncience Pharmingen, San Diego, CA, USA), de acordo com as recomendações dos fabricantes. As CMSP foram obtidas por gradientes de ficoll, ajustadas para a concentração de 3×10^6 /ml e distribuídas em placas de 24 poços (Corning), sendo estimuladas na presença de 3×10^6 /ml de *L. braziliensis* a 37°C em 5% CO₂, após 24 horas de estimulação o sobrenadante da cultura foi coletado. O Kit usa microesferas de poliestireno ligadas com anticorpos contra as citocinas analisadas. Em tubos de ensaio foi adicionado 25µL de cada sobrenadante de cultura (diluído 1:5) ou padrão de cada citocina em diluições seriadas e adicionado 15µL de uma mistura das microesferas para IL-2, IFN-γ e IL-10, seguida da incubação no escuro por 3 horas a temperatura ambiente. Após a incubação as amostras e os padrões foram lavados com 500 µL de tampão de lavagem (BD Bioncience) e posteriormente centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Subseqüentemente foi adicionado 20µL do anticorpo de detecção nos tubos e re-incubado no escuro por 90 minutos a temperatura ambiente. Seguida a incubação as amostras e a curva foram lavadas com 500 µL de tampão de lavagem (BD Bioncience) e posteriormente centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação foi adicionado 300µL de tampão de lavagem (BD Bioncience) em cada tubo e procedeu-se a aquisição das amostras. Como controle positivo foi empregado esferas incubadas com anticorpo de detecção FITC (BD Bioncience) e PE (BD Bioncience) e como controle negativo esferas incubadas com tampão de lavagem. As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSsort (Becton-Dickinson) e foram analisadas usando BD CellQuest™ Software.

5.11. Detecção de citocinas intracelulares e Granzima B

A expressão de citocinas por células T CD8⁺ ou T CD4⁺, dos pacientes e dos controles saudáveis, foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se o kit Cytofix/Cytosperm Plus (BD PharMingen), seguindo as instruções dos fabricantes. As células mononucleares do sangue periférico foram obtidas por gradientes de ficoll, ajustadas para a concentração de 3×10^6 /ml e

foram distribuídas em placas de 24 poços (Corning). Em seguida elas foram estimuladas na presença de 3×10^6 /ml de *L. braziliensis* por 24 horas, a 37°C em 5% CO₂. A secreção das citocinas foi bloqueada pela adição de Brefeldin A (10µg/ml) (Sigma). Após 4 horas de incubação, a 37°C em 5% CO₂, as células foram coletadas, centrifugadas a 1000rpm por 10min. Após a centrifugação elas foram ressuspensas em 100 µL de tampão de FACS e bloqueada com 1% de Soro AB RH+ inativado (BD PharMingen). Posteriormente, as células foram marcadas simultaneamente com anticorpos específicos anti-CD4 anti-CD8 ambos BD PharMingen. Em seguida foram fixadas com 100 µL de Cytotfix/Cytosperm (BD Pharmingen, NJ, USA) por 20 minutos a temperatura ambiente. Sendo então lavadas com 500µL de PBS, por centrifugação a 1200 rpm, por 5 minutos, a 4°C. Posteriormente elas foram permeabilizadas em 100µL de Permwash 1X (BD Pharmingen, NJ, USA) e incubadas com anticorpos anti-IFN- γ (BD Pharmingen, NJ, USA), anti-IL-10 (BD Pharmingen, NJ, USA) e anti-Granzyme B (Caltag Laboratories), diluídos em Permwash 1X (BD Pharmingen, NJ, USA). Como controle negativo foi empregado os isotipos controle (BD PharMingen). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSort (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson).

5.12. Biópsia

Após assepsia do local um fragmento de tecido foi retirado da borda da lesão utilizando um “punch” diâmetro de 3,5mm (Baker Cummins; pharmaceuticals, Inc. Miami, FL.). O tecido da lesão foi dividido em três fragmentos, um foi congelado para posterior realização de microscopia confocal, o segundo fragmento foi colocado em meio RPMI 1640 (Invitrogen, São Paulo, Brasil) completo e o terceiro fragmento foi posto em formol e encaminhado para histopatologia para fins de diagnósticos.

O fragmento de pele normal utilizado no estudo foi obtido através de cirurgia estética e preservado em meio RPMI completo sendo utilizado como controle negativo.

5.13. Obtenção de células da Biópsia e da Pele Normal

O tecido obtido da lesão e da pele normal como descrito anteriormente foi colocado em RPMI completo e posteriormente foi fragmentado e pesado. Os fragmentos foram incubado na presença de meio RPMI 1640 (Invitrogen, São Paulo, Brasil) suplementado com liberase

(0.5mg/mL) (Sigma, São Paulo, Brasil) por 1 hora, a 37°C, 5% CO₂. Após 1 hora de incubação o tecido foi processado no Medicon (Consul^{TS}, NJ, USA) por 4 minutos, no Medimachine (Becton-Dickinson, NJ, USA) juntamente com 1.0 mL de RPMI completo. Esse procedimento foi repetido mais duas ou três vezes, para obtenção da maior quantidade de células. Após o processamento as células foram lavadas 2 vezes com PBS por centrifugação a 1500 rpm, 4°C por 10 min. Após a centrifugação as células foram ressuspensas em 300 µL de tampão de FACS e contadas em câmara de Neubauer.

5.14. Determinação do fenótipo das células obtidas das biópsias por Citometria de Fluxo

A expressão de marcadores de superfície foi determinada por citometria de fluxo nas células obtidas das biópsias e de tecido normal. Aproximadamente 2.5×10^5 células por 200µL de tampão de FACS foram colocadas em cada tubo cônico de polipropileno de 1.5mL e incubadas com anticorpos monoclonais anti-CD3 (PE), anti-CD4 (FITC ou Pe), anti-CD8 (PerCP-Cy5.5), anti-CD25 (PE), anti-CCR7(PE), anti-CLA (FITC) e anti CD45RO(PE) (Anexo B). Após a incubação, as células eram lavadas 1 vez por centrifugação a 1000rpm por 10 min e ressuspensas em 200µL de tampão de FACS. Como controle negativo foi utilizado os isotipos controles correspondentes (BD Pharmingen, NJ, USA). As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSort (Becton-Dickinson) e foram analisadas utilizando-se o programa Cell Quest (Becton-Dickinson). Os anticorpos utilizados foram provenientes das empresas BD Pharmingen (NJ, USA)

5.15. Microscopia Confocal

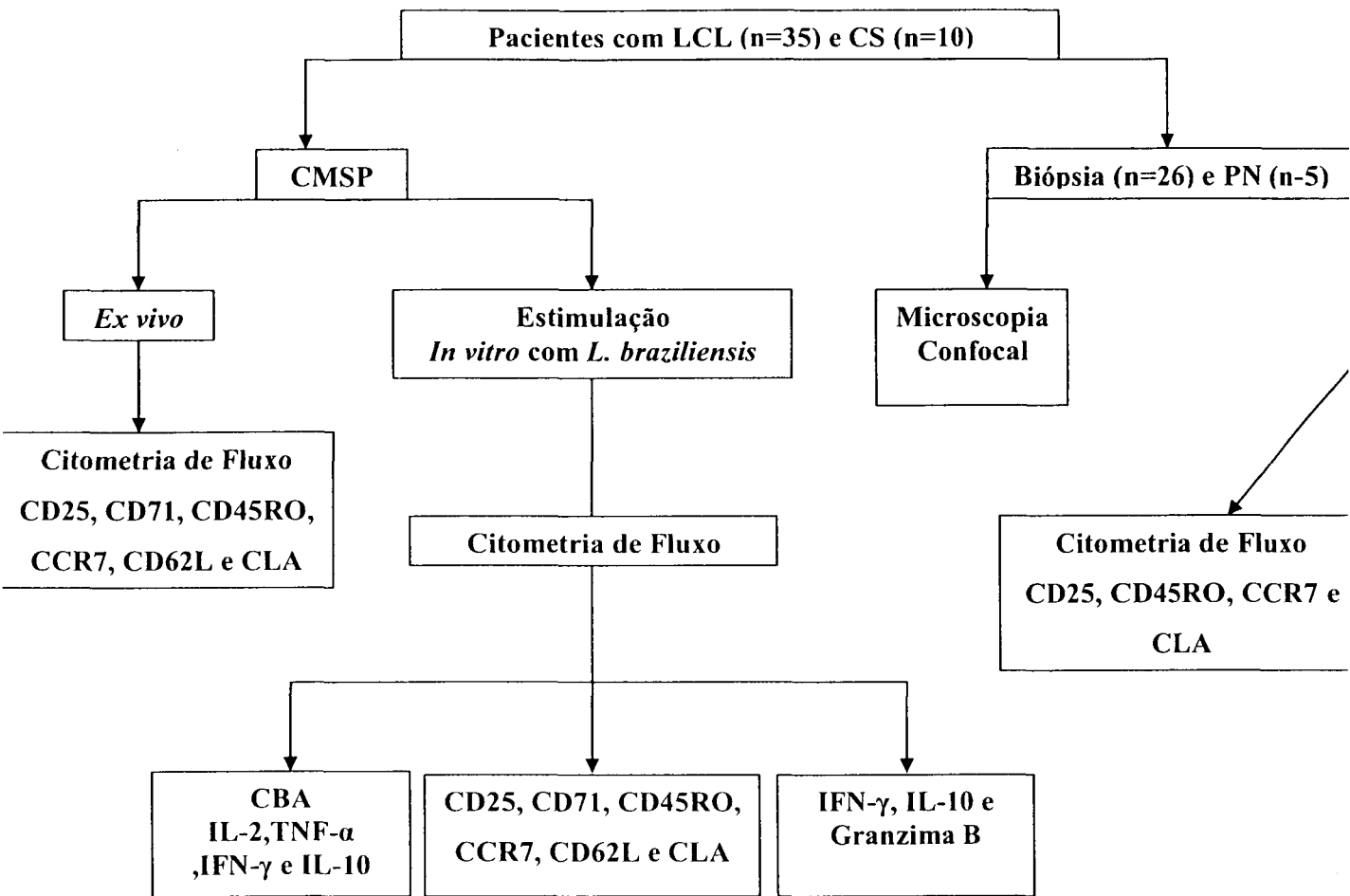
Análise confocal foi usada para identificar linfócitos T CD8⁺ produtores de Granzima B no infiltrado inflamatório da lesão. A dupla marcação foi realizada para detectar a expressão de CD8 e Granzima B. As secções de tecido foram fixadas com acetona e posteriormente foram bloqueadas por 30 minutos com o soro de cabra (1:50) diluído em PBS 1X. Após essa incubação foi adicionado o primeiro anticorpo primário: anti-CD8 (Santa Cruz biotechnoly, INC) feito em coelho, diluído 1:50 em PBS por 2 horas. Em seguida foi adicionado o anticorpo secundário anti-coelho (1:100, Vector Laboratories) por 40 minutos, seguida pela incubação com alexa 488 feito em cabra (1:800 Sigma, Molecular Probes, Eugene, Oregon) por 30 min. Em seguida os cortes foram lavados e incubados por 2 horas com anti-Granzima B (1:25, AbD Serotec) produzido em camundongo e posteriormente foi adicionado o segundo anticorpo

secundário anti-camundongo biotinilado feito em cabra (1:500 Vector) por 30 minutos. Após isso os cortes foram incubados por 30 minutos com estreptavidina Cy3 (1:400, Buchs, Switzerland). Posteriormente os cortes foram contra-corados e fixados com DAPI (Vector). Múltiplas imagens foram adquiridas usando o microscópio confocal (Leica TCS SP2 SE and SP5 AOB5) e processadas no Adobe Photoshop (version 4.0) Image pro plus.

5.16. Análise estatística

Para análise estatística utilizamos o programa GraphPad- Prism (GraphPad software, San Diego, Ca-USA). Os resultados estão representados com valores das medianas obtidas em cada condição. Após verificar que os valores de cada grupo não assumiam distribuição normal, as diferenças obtidas nas análises de citometria de fluxo e na dosagem de citocinas do sobrenadante das culturas foram comparadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6- DESENHO EXPERIMENTAL



7- RESULTADOS

7.1. Expressão de Marcadores de ativação nas células T CD8⁺ e T CD4⁺

Inicialmente, caracterizamos fenotipicamente o estado de ativação das células T. Para isso, foi coletado sangue periférico de pacientes (Anexo A) com leishmaniose cutânea localizada na fase inicial da infecção e de controles saudáveis (CS). O sangue coletado foi processado e após a realização de um gradiente de Ficoll as células *ex vivo* foram obtidas. Essas células foram analisadas em relação ao seu estado de ativação pela expressão do receptor de IL-2 (CD25) e do receptor de transferrina (CD71) por citometria de fluxo. A frequência de expressão do CD25 e do CD71 foi significativamente maior nas células T CD8⁺ ($p=0.049$ e $p=0.047$, respectivamente) obtidas na análise *ex vivo* dos pacientes em comparação aos voluntários normais (Fig. 2A e 2C). Essas diferenças também foram observadas para as células T CD4⁺CD25⁺ ($p=0,002$) e TCD4⁺ CD71⁺ ($p=0.048$), (Fig. 2B e 2D, respectivamente). Esses dados sugerem a existência de uma população de células T CD8⁺ e T CD4⁺ fenotipicamente ativas no sangue periférico dos pacientes com LCL.

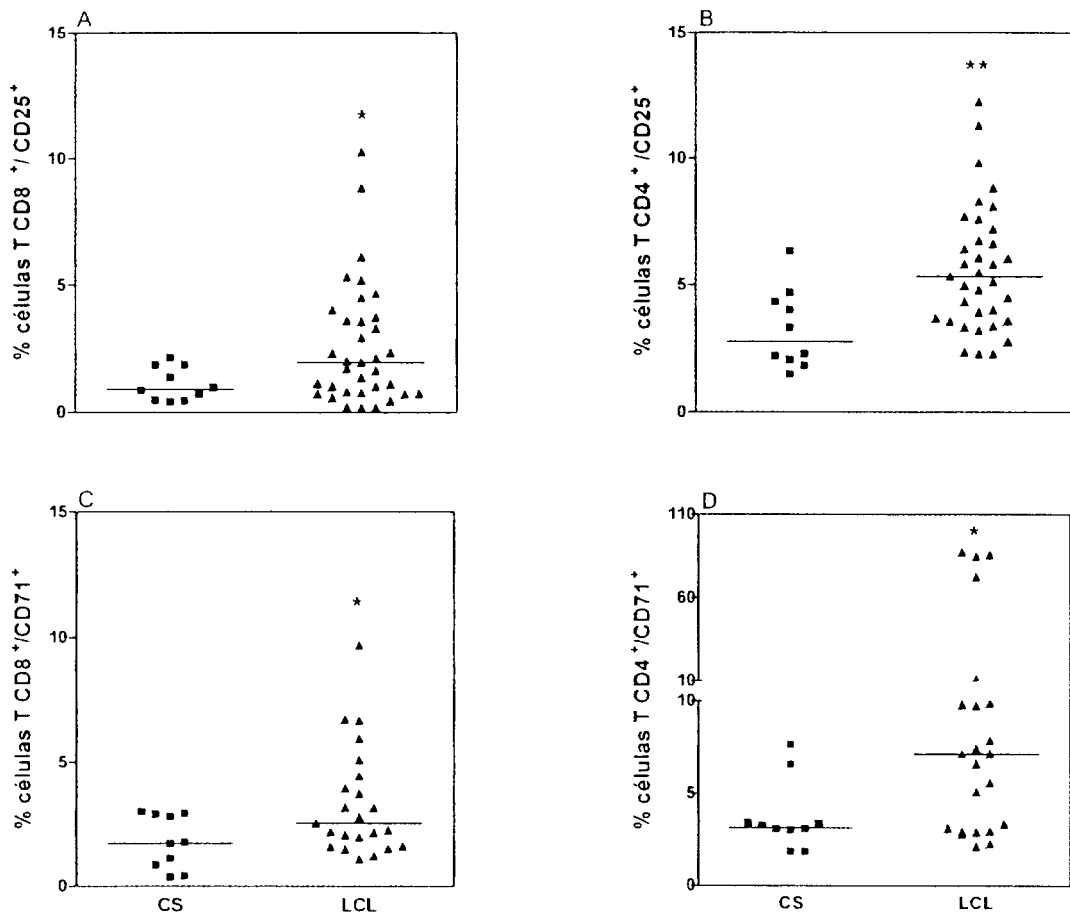


Figura 2: Expressão de marcadores de ativação nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ *ex vivo*. As células T CD8⁺ e T CD4⁺ *ex vivo* de 35 pacientes para as análises do CD25, 23 pacientes para as análises do CD71 e 10 controles saudáveis foram obtidas através de gradiente de Ficoll e posteriormente a expressão dos marcadores de ativação celular foi avaliada por citometria de fluxo. (A e B) A expressão do CD25 nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ respectivamente. (C e D) Expressão de CD71 nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ respectivamente. As barras representam a mediana, todas as diferenças foram estatisticamente significante com (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$, utilizando o teste de Mann Whitney.

Trabalhos anteriores têm demonstrado que a frequência da população de linfócitos T específicos à leishmânia no sangue periférico dos pacientes com LCL geralmente é baixa (Conceicao-Silva et al., 1990). Então, decidimos caracterizar fenotipicamente o estado de ativação dessas células *in vitro* após estimulação com *L. braziliensis*. Para isso, o sangue periférico de 23 pacientes com LCL e de 10 doadores sadios foi retirado como descrito anteriormente e as CMSP foram obtidas, contados e plaqueadas em placas de 24 poços com *L. braziliensis* na proporção de 1:1. As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂ e após 24 horas de estimulação avaliamos a expressão do receptor de IL-2 (CD25) e do receptor de transferrina (CD71) nas células T. Como observado nas análises *ex vivo*, as CMSP dos

pacientes quando estimuladas com *L. braziliensis* possuem uma maior frequência de células T CD8⁺ (p=0.009) e CD4⁺ (p=0.036) expressando CD25 em comparação aos voluntários normais estimulados (Fig. 3A e 3B, respectivamente). Em relação ao CD71, considerado um marcador de ativação tardia, observamos apenas uma frequência de expressão significativamente maior nas células T CD8⁺ (p=0.018) dos pacientes em comparação aos controles estimulados (Fig. 3C). Essa diferença não foi observada para as células T CD4⁺ (Fig. 3D). O aumento na frequência de expressão de marcadores associados com a ativação celular nas CMSP dos pacientes, após estimulação com *L. braziliensis*, sugere o reconhecimento e a posterior ativação de uma população de células específicas para leishmânia.

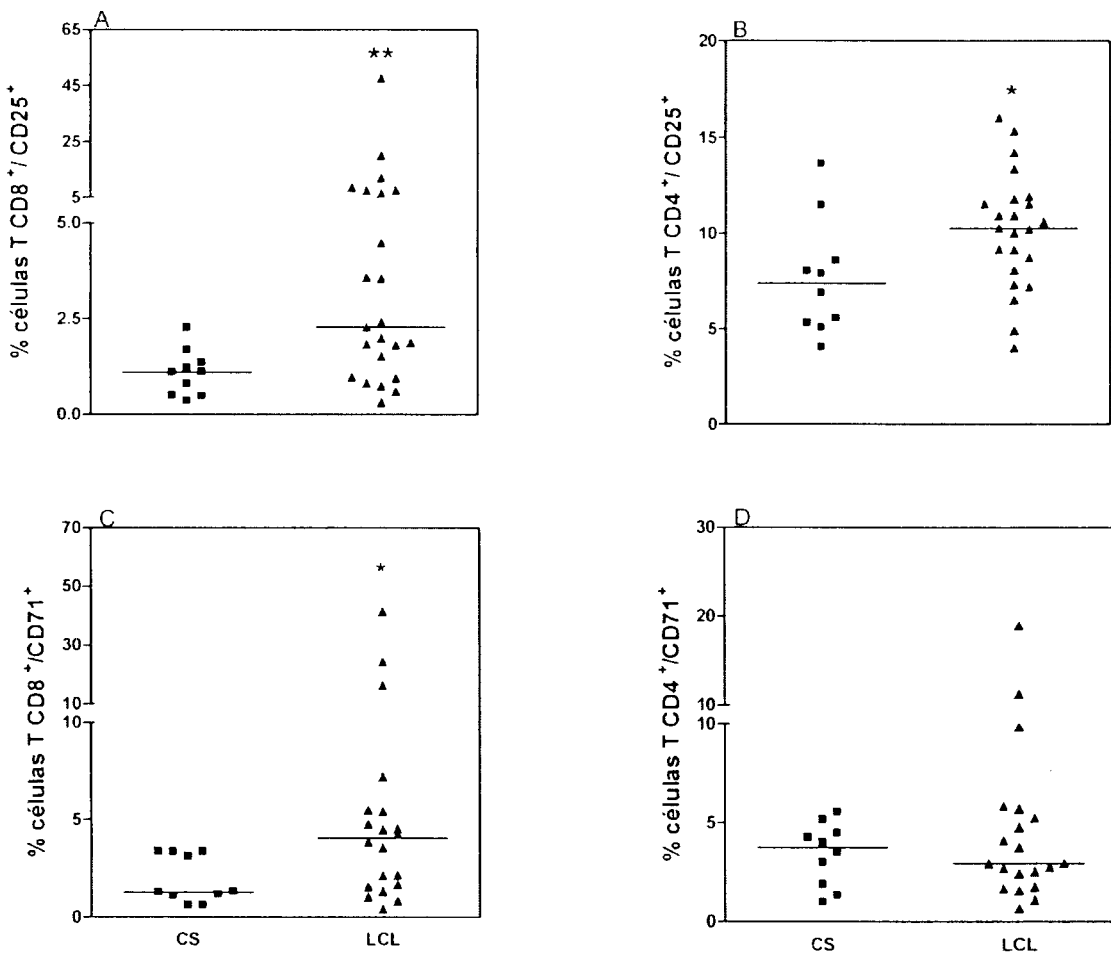


Figura 3: Expressão de marcadores de ativação nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ após estimulação com *L. braziliensis*. CMSP de 23 pacientes para as análises do CD25, 20 pacientes para as análises do CD71 e 10 controles saudáveis foram obtidas por gradiente de Ficcol e posteriormente foram estimuladas por 24 horas com *L. braziliensis* na proporção 1:1. Após a estimulação a expressão dos marcadores de ativação celular CD25 e CD71 foi avaliada por citometria de fluxo. (A e B) A expressão do CD25 nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ respectivamente. (C e D) Expressão de CD71 nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ respectivamente. As barras representam a mediana, com (*)p< 0.05 e (***)p< 0.01, utilizando o teste de Mann Whitney

Uma vez que, uma das características da LCL é a presença de uma resposta imune tecidual que se desenvolve no local de inoculação do parasita, avaliamos a expressão do receptor de IL-2 (CD25) nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ no sítio da lesão. Para isso as células mononucleares obtidas do tecido de 21 biópsias e de 4 peles normais foram marcadas e posteriormente a expressão do CD25 foi analisada por citometria de fluxo. Como mostrado na figura 4, houve uma aumento significativo na frequência de expressão do CD25 nas células T CD8⁺ ($p=0.0216$) e T CD4⁺ ($p=0.0495$) das biópsias dos pacientes quando comparado ao tecido normal (figuras 4A e 4B, respectivamente).

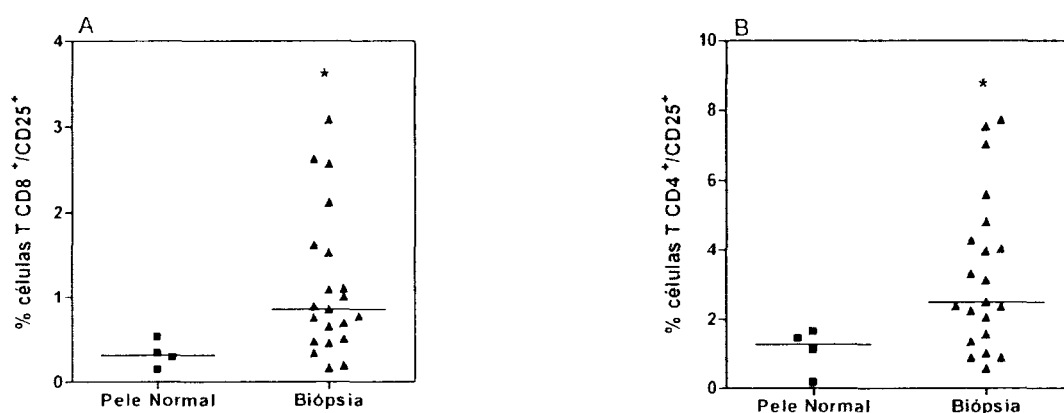


Figura 4: Expressão do receptor de IL-2 (CD25) nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ da biópsia. As células mononucleares foram obtidas de 21 biópsias e de 4 peles normais e posteriormente a expressão do CD25 foi avaliada por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD25 nas células T CD8⁺. (B) Expressão de CD25 nas células T CD4⁺. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$, utilizando o teste de Mann Whitney

7.2. Expressão do Marcador de Memória nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ no ex-vivo.

Em seguida, analisamos a expressão do CD45RO uma glicoproteína de membrana cuja expressão está associada com células T de memória. A expressão dessa molécula na análise *ex vivo* pode ser utilizado para prever a intensidade da resposta imune das células T à leishmânia (Antonelli et al., 2004). Para a realização dessa análise o sangue periférico de 35 pacientes com LCL na fase inicial da infecção e de 10 controles saudáveis foi coletado e após a realização de um gradiente de Ficoll as células foram obtidas e o seu perfil funcional foi avaliado por uma análise *ex vivo*. A frequência de expressão do CD45RO foi significativamente menor nas células T CD8⁺ dos pacientes ($p=0.032$) em comparação aos controles saudáveis (Fig. 5A). Essa diferença não pode ser vista para as células T CD4⁺ (Fig. 5B). A diminuição da frequência

de células T CD8⁺ CD45RO⁺ no sangue periférico sugere a migração ou retenção seletiva no tecido de infecção.

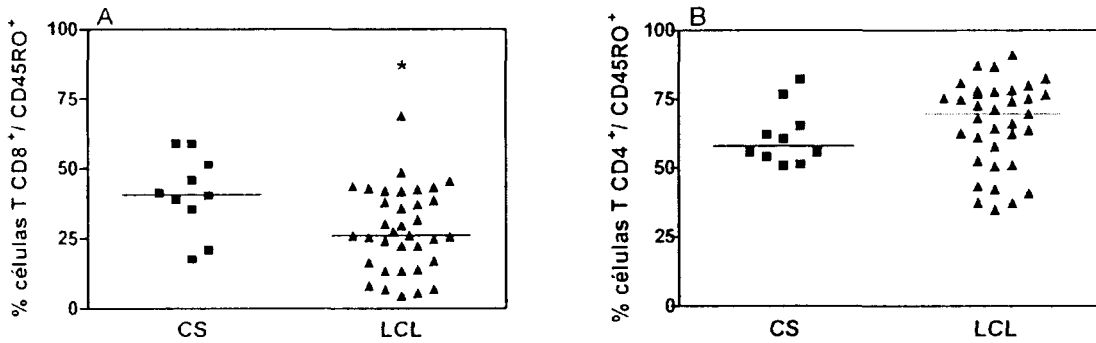


Figura 5: Expressão de marcador de memória nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ em uma análise *ex vivo*. As células de 35 pacientes e 10 doadores saudáveis foram obtidas por gradiente de Ficoll e posteriormente a expressão do marcador de memória celular CD45RO foi avaliada por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD45RO nas células T CD8⁺. (B) Expressão de CD45RO nas células T CD4⁺. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

O próximo passo foi avaliar a frequência de expressão do CD45RO nas células T específicas a leishmânia quando re-estimuladas. Para isso nos coletamos sangue periférico de 23 pacientes com LCL e de 10 doadores sadios e as CMSP obtidas foram re-estimuladas com *L. braziliensis*, após 24h de estimulação a expressão do CD45RO foi avaliada. Não houve nenhuma diferença na frequência de expressão do CD45RO nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ dos pacientes em comparação com os controles estimulados (Figura 6A e 6B).

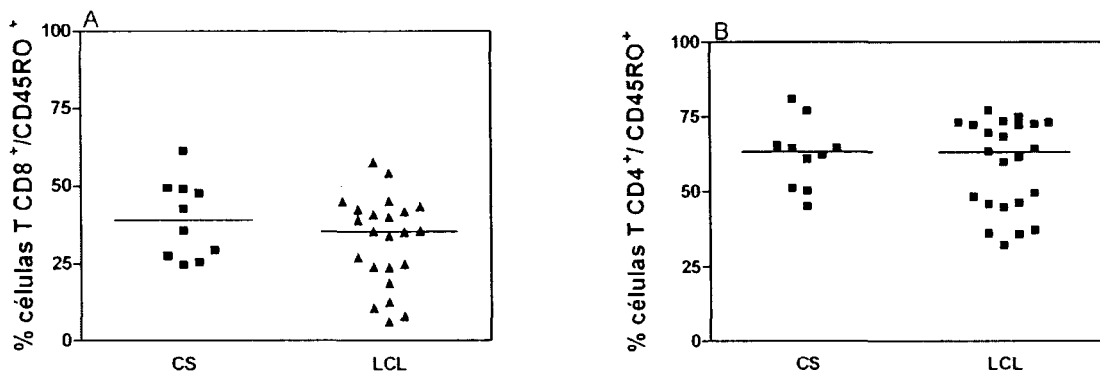


Figura 6: Expressão do CD45RO nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ após estimulação com *L. braziliensis*. CMSP de 23 pacientes e 10 doadores sadios foram obtidas por gradiente de Ficoll e posteriormente foram estimuladas por 24 horas com *L. braziliensis* na proporção 1:1. Após a estimulação a expressão do CD45RO foi avaliada por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD45RO nas células T CD8⁺. (B) Expressão de CD45RO nas células T CD4⁺. As barras representam a mediana.

Como foi observado na figura 5A, a menor frequência de células T $CD8^+CD45RO^+$ observado nas análises *ex vivo* pode sugerir a retenção ou migração dessas células para o tecido da lesão. A frequência de células T expressando o CD45RO no infiltrado inflamatório é de fundamental importância para uma resposta imune efetiva contra leishmânia. Para analisarmos a expressão desse marcador as células mononucleares do tecido da biópsia e da pele normal foram obtidas e posteriormente avaliadas. Como apresentado pela figura 7 houve uma diferença significativa na frequência de expressão do CD45RO tanto nas células T $CD8^+$ ($p=0.036$) quanto nas T $CD4^+$ ($p=0.009$) das biópsias dos pacientes quando comparado ao tecido normal. Esse resultado sugere a presença de células com características fenotípicas efetoras no infiltrado inflamatório dos pacientes com LCL.

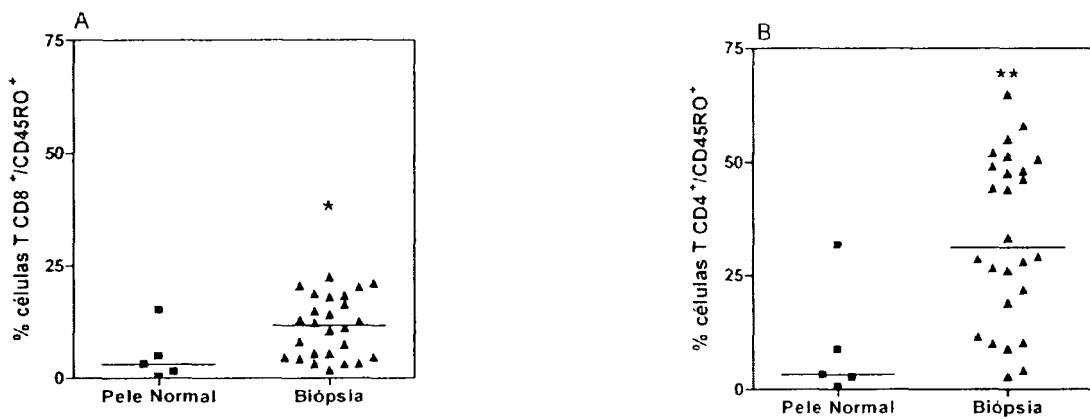


Figura 7: Expressão do CD45RO nas células T $CD8^+$ e T $CD4^+$ da biópsia. As células mononucleares foram obtidas de 26 biópsias e de 5 peles normais e posteriormente a expressão do CD45RO foi avaliada por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD45RO nas células T $CD8^+$. (B) Expressão de CD45RO nas células T $CD4^+$. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.01$, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

7.3. Expressão de Marcadores de Endereçamento nas células T $CD8^+$ e T $CD4^+$

A migração e o recrutamento celular são de fundamental importância em respostas inflamatórias. Assim, para avaliarmos esse processo, algumas moléculas associadas com o endereçamento celular foram analisadas. Para isso, análises das células *ex vivo* do sangue periférico de pacientes com LCL e de controles saudáveis foram obtidas por gradiente de Ficoll e posteriormente a expressão dos marcadores de endereçamento foi determinada. Como mostrado nas figuras 8A a frequência de expressão do CD62L foi significativamente menor nas células T $CD8^+$ dos pacientes ($p=0.007$) em comparação com os controles sadios. Uma menor frequência de expressão dessa molécula também foi observada nas células T $CD4^+$ (Figura 8B),

porém sem diferença estatística ($p=0.063$). Uma menor frequência de expressão do CCR7 foi encontrada nas células T CD4⁺ ($p=0.0002$) dos pacientes em comparação aos controles (figura 8D), porém essa diferença não foi observada para as células T CD8⁺ (figura 8C). A frequência de expressão do CLA foi significativamente maior nas células T CD8⁺ ($p=0.017$) dos pacientes em comparação com os indivíduos saudáveis (figura 8E), essa diferença não foi encontrada nas células T CD4⁺ (figura 8F). A diminuição na frequência de expressão dos marcadores CD62L e CCR7 nas células do sangue periférico dos pacientes sugere a predominância de células com endereçamento para os tecidos não linfóides. Essa diminuição nos foi vista para ambos os marcadores nas células T CD8⁺. Por outro lado, o aumento na frequência de células T CD8⁺ expressão o CLA sugere o recrutamento dessa população celular para o tecido da lesão.

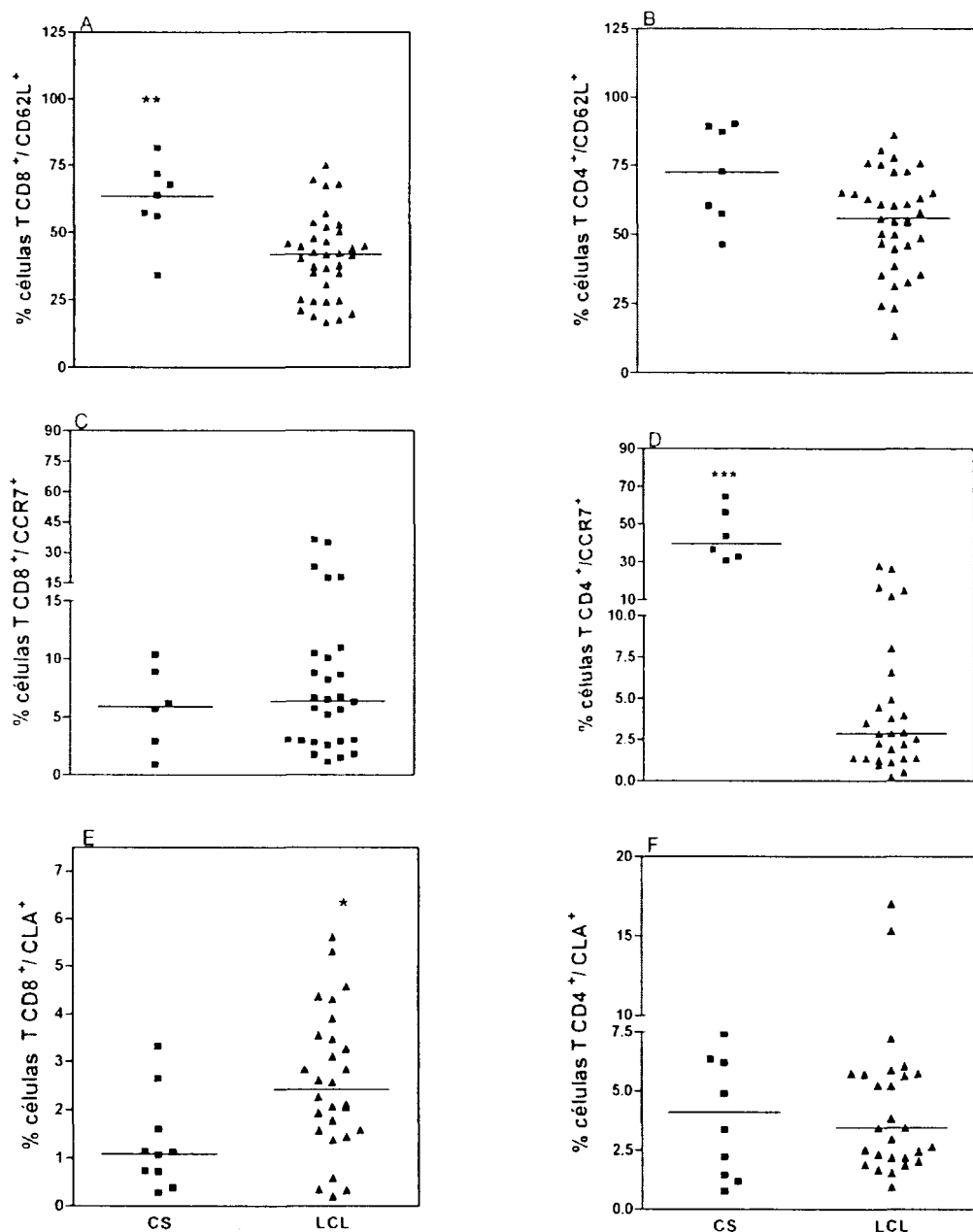


Figura 8: Expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ na análise de células obtidas *ex vivo*. As células *ex vivo* de 35 pacientes para as análises do CD62L e 28 pacientes para as análises do CCR7 e CLA e de 7 doadores normais para as análises do CD62L, 6 doadores para CCR7 e de 10 doadores para CLA foram obtidas por gradiente de Ficoll e posteriormente a expressão dos marcadores avaliados por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD62L nas células T CD8⁺. (B) A expressão do CD62L nas células T CD4⁺. (C) Expressão de CCR7 nas células T CD8⁺ (D) Expressão de CCR7 nas células T CD4⁺. (E) A expressão do CLA nas células T CD8⁺. (F) A expressão do CLA nas células T CD4⁺. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$ e (***) $p < 0.001$, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

Posteriormente, avaliaremos a frequência da expressão dos marcadores de endereçamento celular nas células T após estimulação. Para isso, CMSP dos pacientes com LCL e de controles saudáveis foram adquiridas e re-estimuladas por 24h com *L. braziliensis*. A expressão dos marcadores CD62L, CCR7 e CLA foi avaliada nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ das culturas. Como observado na figura 9B, houve um aumento significativo na frequência de expressão do CD62L nas células T CD4⁺ dos pacientes (p=0,016), fato que não foi observado para as células T CD8⁺ (Figura 9A). A expressão do CD62L pode apresentar variação na população humana, uma alta frequência dessa molécula pode ser encontrada em células T ativas. Podemos também notar uma frequência significativamente menor da expressão do CCR7 nas células T CD8⁺ (p=0,010) e T CD4⁺ (p=0,0009) (Figura 9C e 9D, respectivamente) dos pacientes em comparação com os controles estimulados. Um dado importante mostrado pela figura 9E foi o aumento significativo na frequência da expressão do CLA pelas células T CD8⁺ dos pacientes quando estimuladas com *L. braziliensis* em comparação com os controles estimulados (p=0,010), esse aumento já tinha sido observado nas células T CD8⁺ *ex vivo*, o que favorece a teoria de que essas células estariam se deslocando para o tecido da lesão. Esse aumento não foi observado para as células T CD4⁺ (Figura 9F). A expressão de CCR7 e de CD62L é regulada de forma negativa nas células T de memória efetora. Desta forma, os nossos dados apontam para a presença de uma população de células T CD8⁺ e T CD4⁺, que após o reconhecimento de antígenos de leishmânia modula negativamente a expressão desses marcadores, sugerindo um imunofenótipo de células efetoras. O aumento na frequência de células T CD8⁺ expressando o CLA após estimulação com leishmânia sugere uma regulação positiva dessa molécula, a qual esta associada com tropismo de células T específica para o tecido.

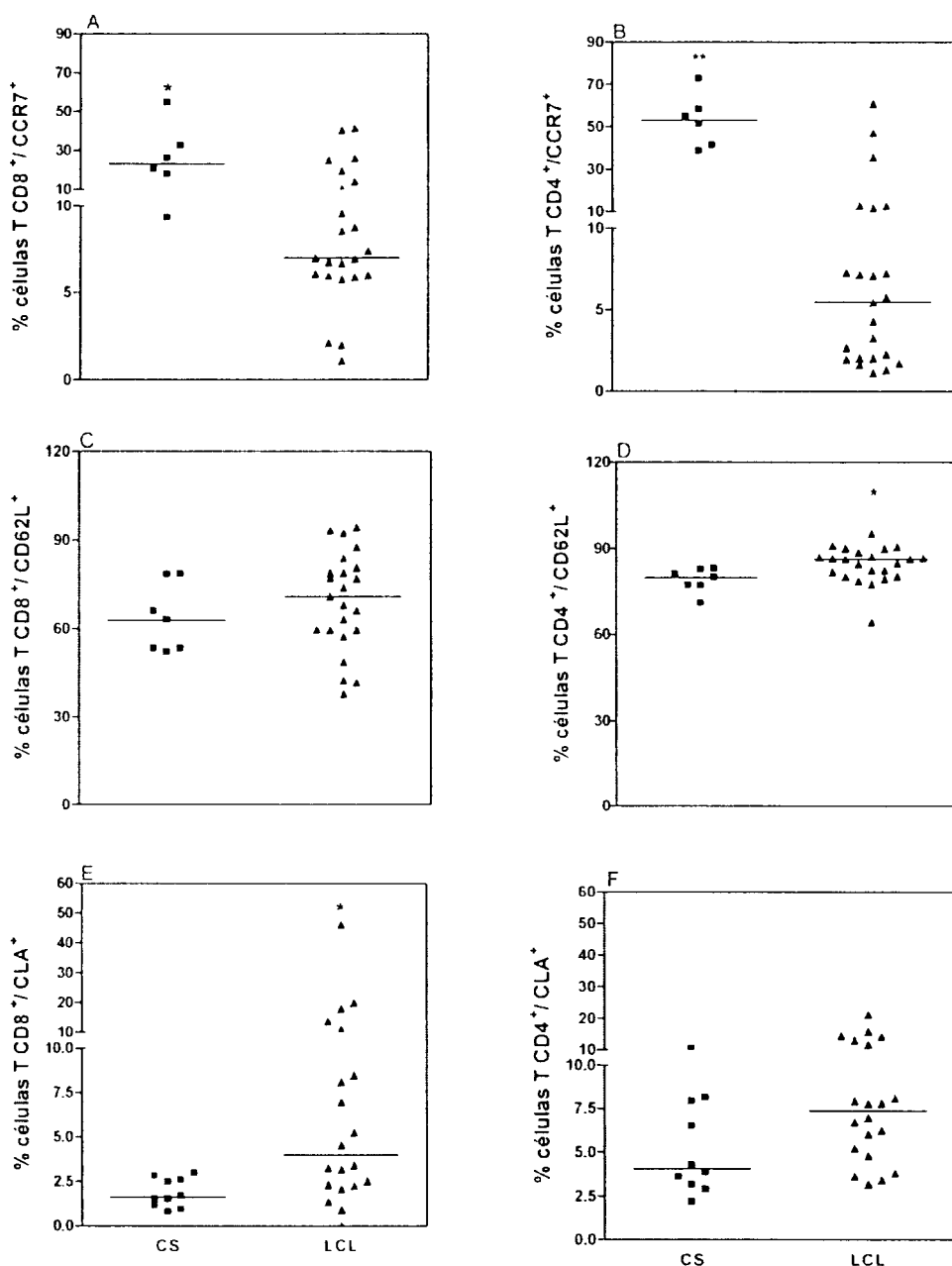


Figura 9: Expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ após estimulação com *L. braziliensis*. As CMSP de 23 pacientes para as análises do CD62L e CCR7, 20 pacientes para as análises do CLA e de 7 voluntários normais para as análises do CD62L, 6 voluntários para CCR7 e de 10 voluntários para CLA foram obtidas por gradiente de Ficoll e posteriormente a expressão dos marcadores de endereçamento foram avaliados por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD62L nas células T CD8⁺. (B) Expressão de CCR7 nas células T CD8⁺. (C) A expressão do CD62L nas células T CD4⁺. (D) Expressão de CCR7 nas células T CD4⁺. (E) A expressão do CLA nas células T CD8⁺. (F) A expressão do CLA nas células T CD4⁺. As barras representam a mediana, com (*) p < 0.05 e (**) p < 0.01, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

Em seguida, avaliamos o recrutamento das células do sangue periférico para o sítio da infecção, uma vez que, esse processo é de fundamental importância na composição do infiltrado inflamatório. Esse recrutamento se deve principalmente pela expressão de moléculas

de endereçamento na superfície das células. Com a finalidade de analisarmos a expressão de marcadores, as células T CD8⁺ e T CD4⁺ obtidas do tecido da biópsia e da pele normal foram analisadas para a expressão do CCR7 e do CLA por citometria de fluxo. Como mostrado na figura 10A e 10B, não houve diferença na frequência de expressão do CCR7 nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ dos pacientes quando comparados ao tecido normal. Um dado interessante encontrado foi o aumento significativo na frequência de expressão do CLA pelas células T CD8⁺ das biópsias com relação ao tecido normal ($p=0.026$) (Figura 10C), essa diferença não foi encontrada para as células T CD4⁺ (Figura 10D). O aumento na frequência de expressão do CLA tanto *ex vivo*, após estimulação com *L. braziliensis* e nas células obtidas das biópsias pode sugerir um maior recrutamento de células T CD8⁺ para o local da infecção.

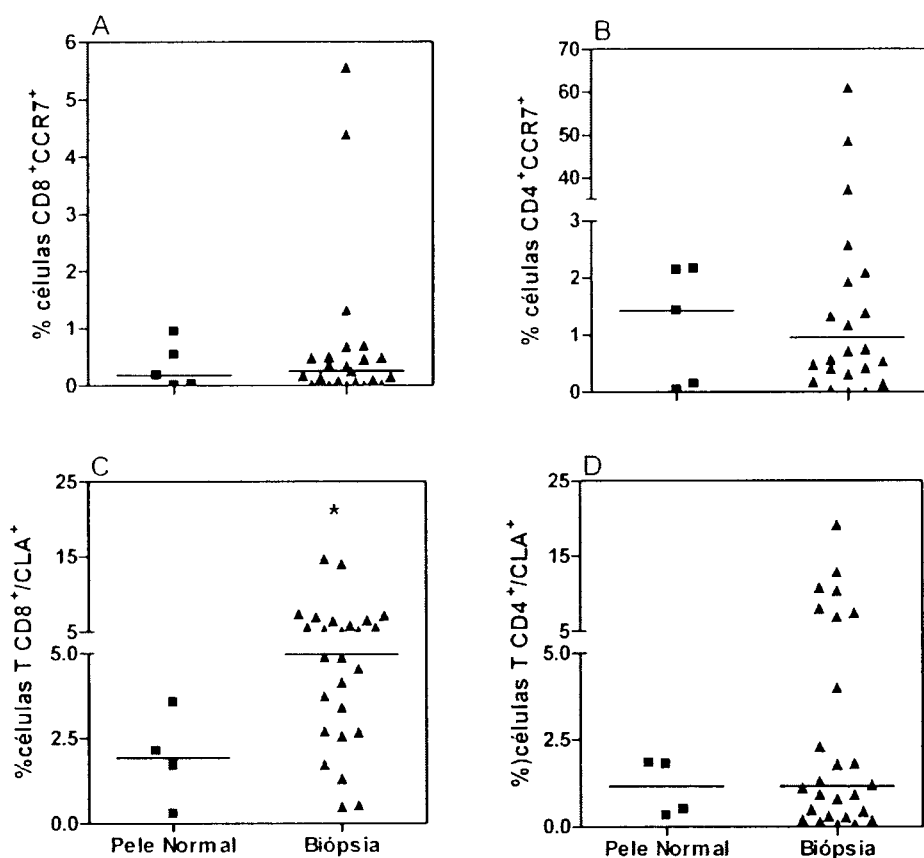


Figura 10: Expressão de marcadores de endereçamento nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ da biópsia. As células mononucleares foram obtidas de 26 biópsias e de 5 peles normais para as análises do CCR7 e 4 peles normais para CLA e posteriormente a expressão dos marcadores de endereçamento celular foram avaliados por citometria de fluxo. (A) A expressão do CCR7 nas células T CD8⁺. (B) Expressão de CCR7 nas células T CD4⁺. (C) A expressão do CLA nas células T CD8⁺. (D) Expressão de CLA nas células T CD4⁺. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$, foi utilizado o teste de Mann Whitney

7.4. Produção de citocinas pelas CMSP após 24h de estimulação com *L. braziliensis*

Uma vez que a resposta imune protetora nos pacientes com LCL é caracterizada pela produção de citocinas pró-inflamatórias, decidimos analisar a produção dessas citocinas pelas CMSP dos pacientes e dos voluntários normais após re-estimuladas na presença de *L. braziliensis*. Após 24h de estimulação a produção de citocinas foi analisada no sobrenadante da cultura por citometria de fluxo. Como mostrado pela figura 11, houve uma produção significativa de IFN- γ ($p=0.0001$), IL-2 ($p=0.0001$) e TNF- α ($p=0.0001$) no sobrenadante da cultura das CMSP dos pacientes após estimulação com leishmânia em relação aos controles estimulados. Não houve diferença na produção de IL-10. A maior produção das citocinas pró-inflamatórias sugere uma resposta imune associada com o controle dos parasitas.

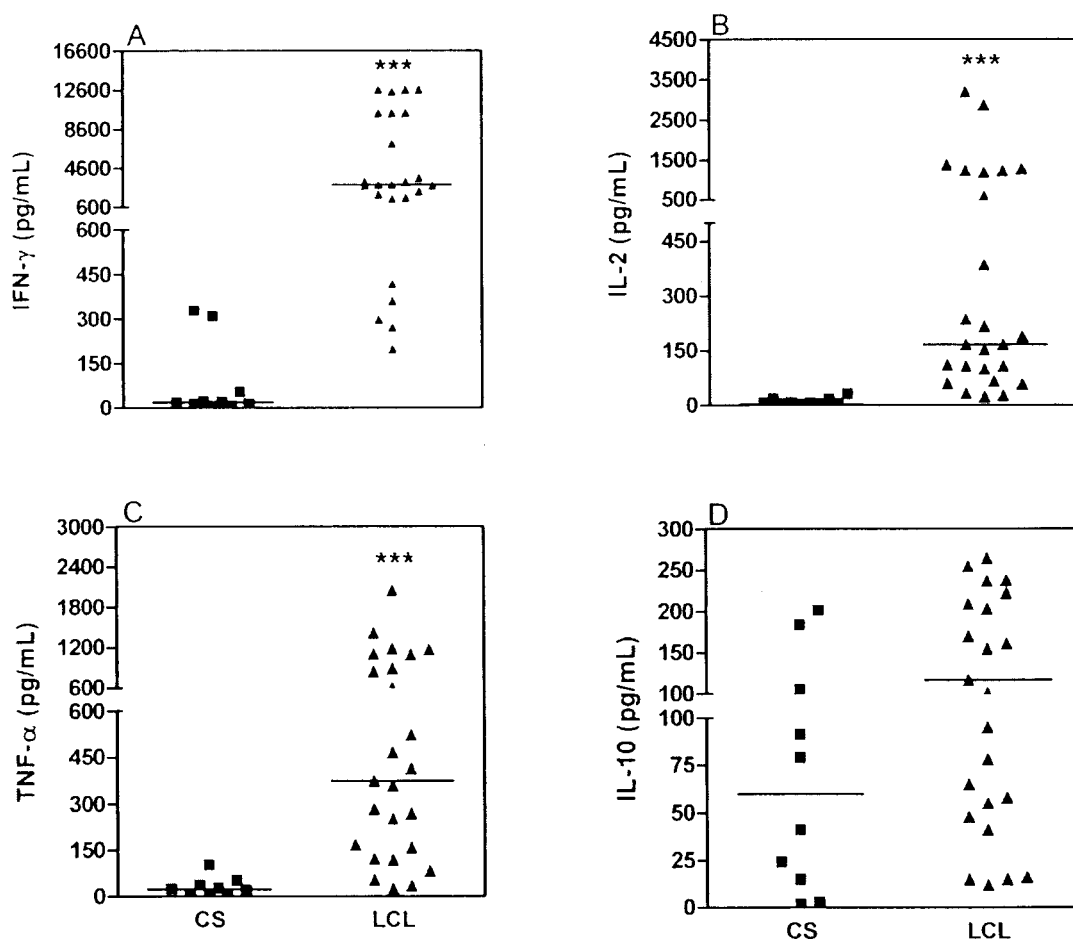


Figura 11: Produção de citocinas pelas CMSP após estimulação com *L. braziliensis*. As CMSP de 25 pacientes e 10 voluntários foram obtidas através de gradiente de Ficcoll e posteriormente estimuladas com *L. braziliensis*. Após 24 horas de cultura a produção de citocinas foi determinada no sobrenadante da cultura por citometria de fluxo. (A) Produção de IFN- γ . (B) Produção de IL-2. (C) produção de TNF- α . (D) produção de IL-10. As barras representam a mediana, com (***) $p < 0.001$, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

7.5. Expressão de citocinas nas células T após 24h de estimulação com *L. braziliensis*

Tendo como base a produção de citocinas observada na figura 11 e com a finalidade de determinar qual subpopulação linfocitária seria responsável por essa produção, as CMSP foram estimuladas com *L. braziliensis* e após 24 horas a produção de citocinas foi avaliada nas células T CD8⁺ e T CD4⁺. Observamos uma maior percentagem de produção de IFN- γ nas células T CD4⁺ (p=0.042) dos pacientes em relação aos voluntários normais estimulados (Figura 12B). Não houve diferença na expressão de IFN- γ nas células T CD8⁺ (Figura 12A). A frequência de células T CD8⁺ produzindo IL-10 foi significativamente maior nos pacientes do que nos voluntários estimulados (p=0.013), (Figura 12C). Não observamos diferença na frequência de células T CD4⁺ produzindo IL-10 (Figura 12D). A frequência de células T CD4⁺ produzindo IFN- γ sugere a participação dessas células na resposta imune contra a leishmânia. A produção de IL-10 pelas células T CD8⁺ pode estar associada com os mecanismos de geração da memória imunológica ou regulação da resposta imune (Lu and Cantor, 2008).

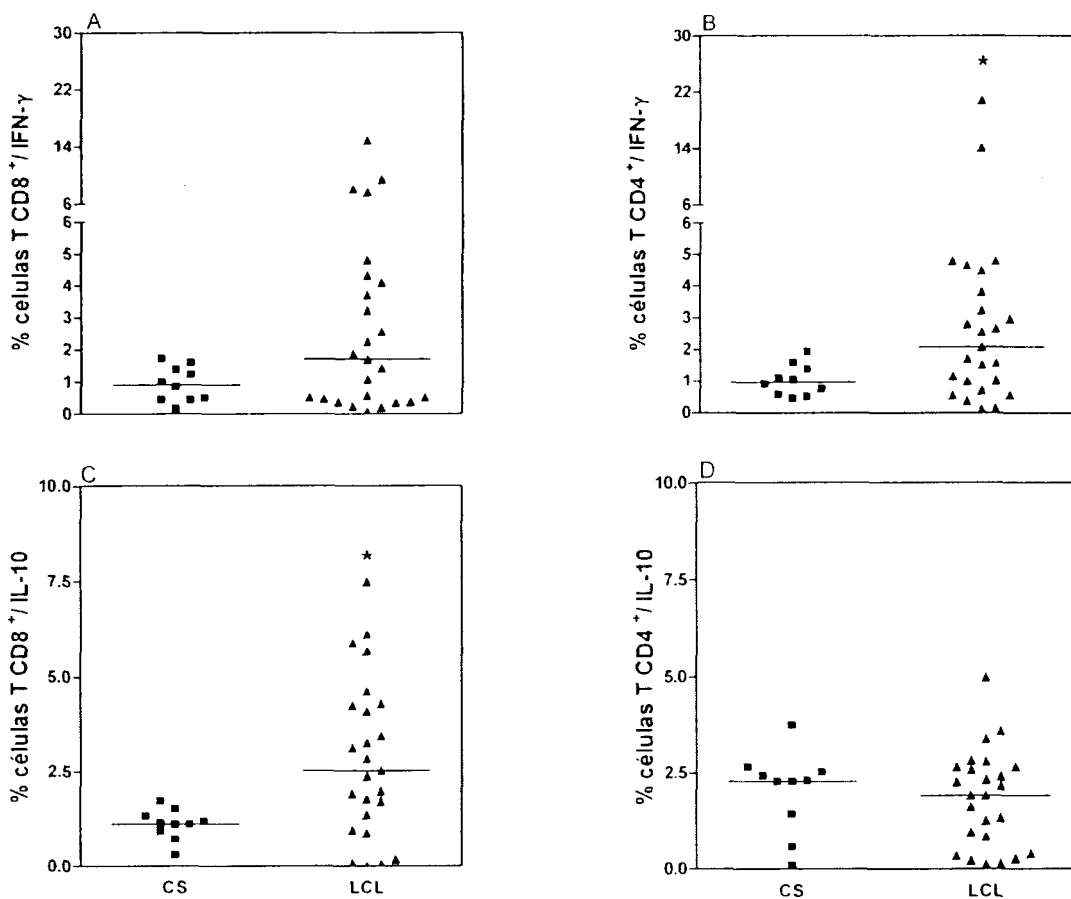


Figura 12: Porcentagem de células T CD8⁺ e T CD4⁺ produtoras de citocinas após estimulação com *L. braziliensis*. As CMSP de 25 pacientes e 10 controles foram obtidas através de gradiente de Ficcol e posteriormente estimuladas com *L. braziliensis*. Após 24 horas de cultura a frequência de células produtoras de citocinas foi determinada por citometria de fluxo. Os dados representam a porcentagem de células com sinal específico para cada citocina em relação ao sinal das células incubadas com o isotipo controle. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

7.6. Expressão de Granzima B nas células T CD8⁺ após estimulação com *L. braziliensis*

Uma vez que as células T CD8⁺ podem participar do controle da infecção por leishmânia por diferentes mecanismos (Gaafar et al., 1999; Muller et al., 1994), decidimos examinar a atividade citotóxica associada com a liberação de granzima B por essas células. Para examinarmos essa função, CMSP de 21 pacientes e 10 voluntários normais foram obtidas e estimuladas por 24 horas com *L. braziliensis*, posteriormente a produção de granzima B pelas células T CD8⁺ foi avaliada. Como observado na figura 13, houve uma frequência significativamente maior da produção desse grânulo nos pacientes em relação aos voluntários

normais estimulados ($p=0.036$). Esse dado sugere a participação de células T CD8⁺ citotóxicas específicas à leishmânia na fase inicial da infecção.

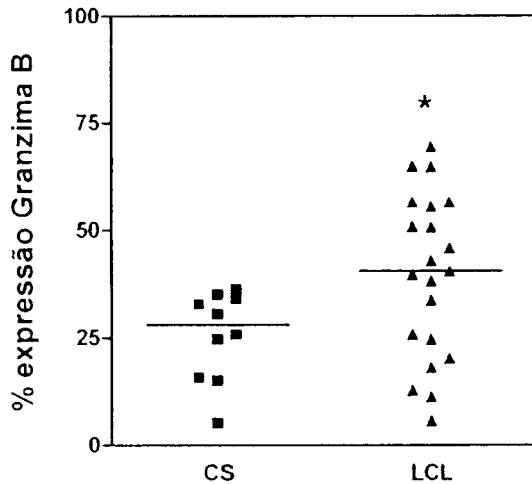


Figura 13: Porcentagem de células T CD8⁺ produtoras de granzima B após estimulação com *L. braziliensis*. As CMSP de 21 pacientes e 10 controles foram obtidas através de gradiente de Ficcol e posteriormente estimuladas com *L. braziliensis*. Os dados representam a porcentagem de células com sinal específico para cada citocina em relação ao sinal das células incubadas com o isotipo controle. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$, foi utilizado o teste de Mann Whitney.

7.7. Células T CD8⁺ expressando Granzima B na biópsia

Os dados obtidos das análises das CMSP dos pacientes mostraram uma elevada frequência de células T CD8⁺ expressando Granzima B (figura 13) e CLA (figura 9E) após estimulação com *L. braziliensis*, foi demonstrada também uma maior frequência na expressão do CLA pelas células T CD8⁺ que compõem o infiltrado inflamatório (figura 10C), sugerindo o recrutamento dessas células. Decidimos então, examinar uma possível função dessas células no tecido da lesão. Assim, secções de tecido foram usadas para identificar células T CD8⁺ expressando granzima B. A imagem mostra que existe uma co-localização entre células T CD8⁺ e os grânulos de granzima B no tecido da lesão. Esse dado sugere uma função citotóxica das células T CD8⁺ no infiltrado inflamatório de pacientes com leishmaniose cutânea localizada, não podendo, entretanto, se excluir outras funções como a produção diferencial de citocinas.

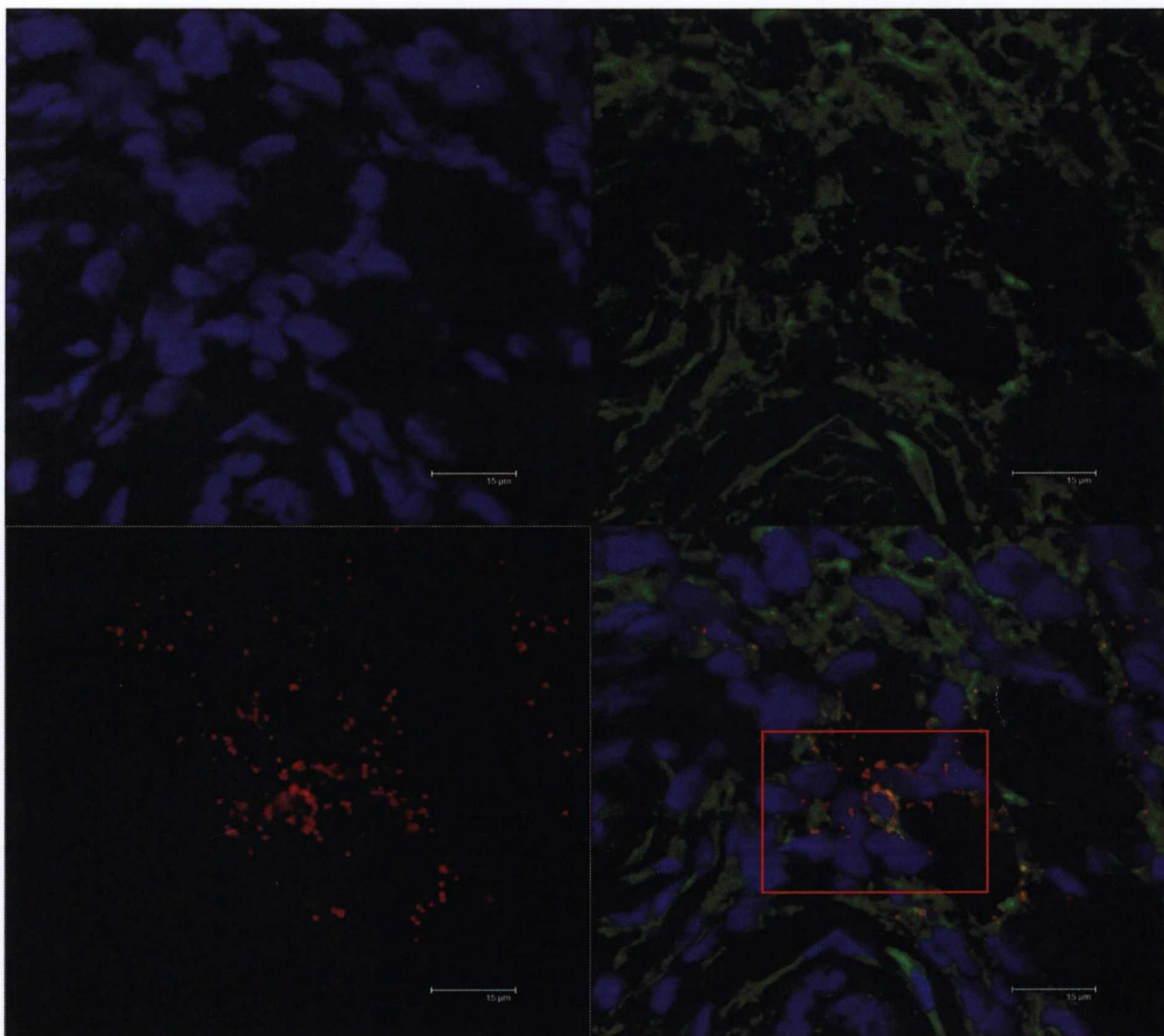


Figura 14: Expressão de granzima B pelas células T $CD8^+$ em lesões de pacientes com LCL. Secções de tecido da lesão de pacientes com LCL foram analisadas por microscopia de fluorescência para a expressão de CD8 e granzima B. A imagem mostra os núcleos das células (azul) e as regiões de co-localização (amarelo) entre células T $CD8^+$ (verde) com granzima B (vermelho). O destaque na imagem foi feito para enfatizar uma região de co-localização.

7.8. Caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório no tecido da lesão

Por último analisamos o perfil celular do infiltrado inflamatório na lesão. Trabalhos em leishmanioses e em outras doenças granulomatosas têm demonstrado que a distribuição de subtipos de células T no tecido é diferente do encontrado no sangue periférico (Pirmez et al., 1990). Com o objetivo de caracterizarmos as células que compõem o infiltrado inflamatório das lesões dos pacientes com LCL, analisamos a expressão de antígenos leucocitários nas células obtidas das biópsias e de tecido normal por citometria de fluxo. A figura 15 mostra que o tecido

da lesão dos pacientes é composto por um infiltrado inflamatório misto, com predominância de células T CD4⁺, T CD8⁺, células NK e células dendríticas (CD11c). Observamos uma maior frequência na expressão do CD3/CD4 (Figura 15B), mas sem diferença estatística quando comparado ao tecido normal ($p=0.063$) e que a frequência dessas células nas biopsias dos pacientes é cerca de duas vezes maior que a de CD3/CD8 (Figura 15A). Notamos ainda uma diferença estatística na expressão do CD11c ($p=0.011$), (Figura 15D) e um aumento, mas sem significância na expressão de CD11b (Figura 15C) e do CD56 ($p=0.059$), marcador para células NK (Figura 15E) quando comparado com o tecido normal.

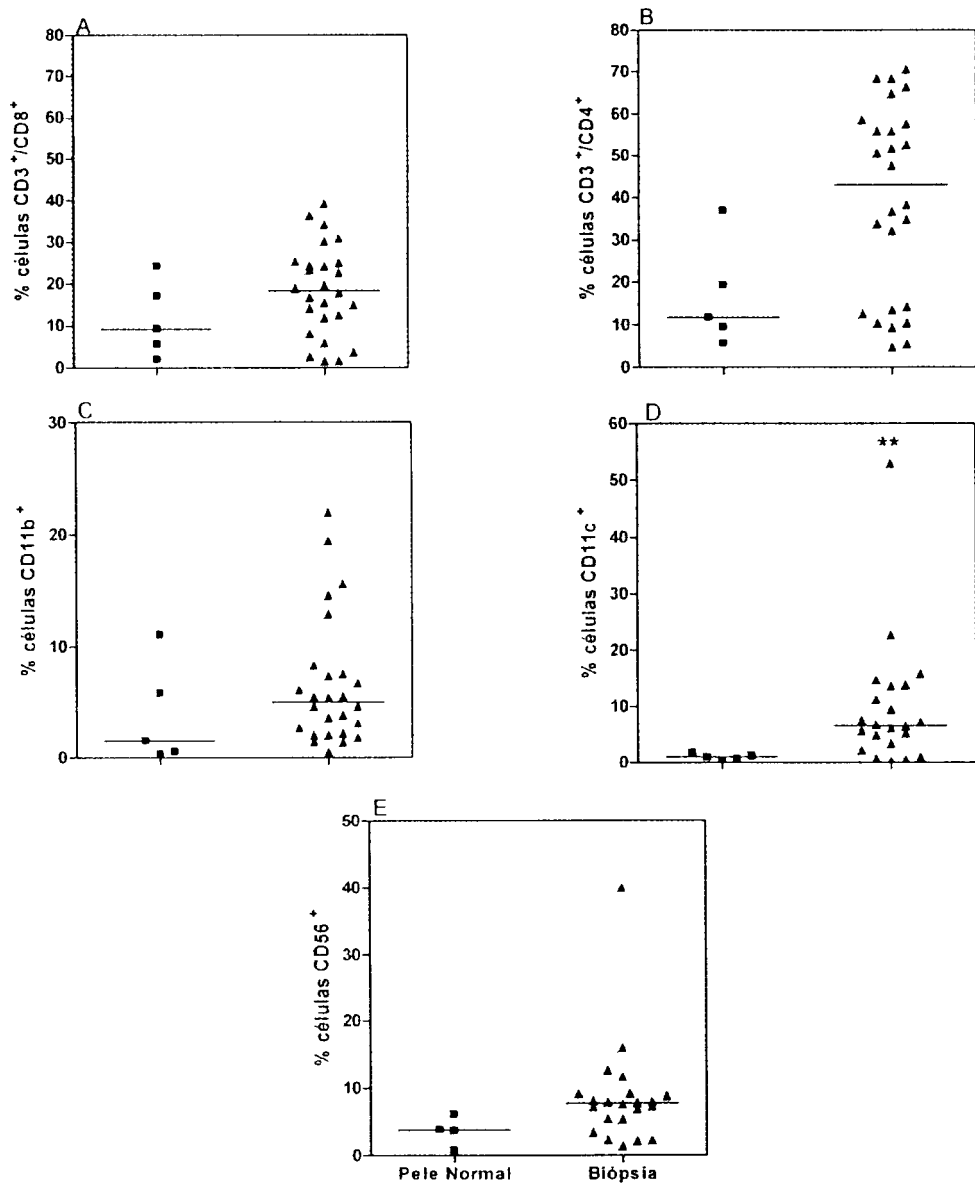


Figura 15: Caracterização fenotípica do infiltrado inflamatório no tecido da lesão. As células mononucleares foram obtidas de 26 biópsias da lesão e de 5 peles normais. Para a análise do CD56 forma utilizados 4 peles normais. Posteriormente a expressão dos antígenos leucocitários foi avaliada por citometria de fluxo. (A) A expressão do CD3/CD8. (B) Expressão de CD3/CD4. (C) A expressão do CD11b. (D) Expressão do CD11c. (E) Expressão do CD56. As barras representam a mediana, com (*) $p < 0.05$ e (**) $p < 0.00$, foi utilizado o teste de Mann Whitney

8- DISCUSSÃO

A leishmaniose Tegumentar Americana é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Na maior parte do Brasil a infecção é causada pela espécie *L. braziliensis*, sendo as duas principais manifestações clínicas: a leishmaniose cutânea localizada e a leishmaniose mucosa. A forma localizada é responsável por mais de 90% dos casos, e é caracterizada geralmente por uma única úlcera em alguns casos podem evoluir para a cura espontânea, contudo, a maioria requer tratamento com drogas leishmanicidas. Entretanto, formas mais graves podem ocorrer. A resposta imune celular tem desempenhado um papel importante tanto nos processos de cura como no agravamento das lesões (Diaz et al., 2006; Pirmez et al., 1993). Os linfócitos T CD8⁺ são importantes mediadores da resposta imune adaptativa contra vírus, protozoários e bactérias (Harty et al., 2000), mas pouco é conhecido sobre a função desempenhada por essas células na resposta imune primária (Ruiz and Becker, 2007). Em 2002, Belkaid et al, demonstraram que o controle da infecção primária em camundongos resistentes a leishmaniose causada por *L. major* estava associado a presença das células T CD8⁺ e aos mecanismos efetores dessas células. A ativação das células T é um evento determinante na fase inicial da resposta imune a diferentes patógenos. Esse processo leva a mudanças na expressão de moléculas de adesão na superfície das células, influenciando nos processos de migração e recrutamento das células para o sítio de infecção, um evento crucial na imunopatologia da leishmaniose. No presente estudo, nós demonstramos que as células T CD8⁺ estão presentes na fase inicial da infecção em pacientes com leishmaniose cutânea localizada infectados com *L. braziliensis* e sugerimos que essas células desempenham uma ação citotóxica através da expressão de granzima B e podem estar envolvidas nos processos de regulação da resposta imune mediada pela produção de IL-10.

Inicialmente, examinamos a expressão de receptores associados com a ativação e proliferação dos linfócitos T nas células do sangue periférico de pacientes com LCL e de controles saudáveis. Nós observamos uma maior frequência na expressão do receptor de IL-2 (CD25) nos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ no sangue periférico dos pacientes. CD25 é um marcador de ativação, sua expressão está associada com a proliferação das células T. De fato, quando estimulamos CMSP desses pacientes com *L. braziliensis* observamos uma maior frequência na expressão do CD25 em ambas as subpopulações linfocitárias específicas à leishmânia. Dessa forma, uma maior frequência da expressão dessa molécula estaria associada com a maior expansão clonal de células T específicas. No nosso estudo, células T expressando

o receptor de IL-2 foram também encontradas no sítio da infecção com uma maior frequência que no tecido normal. Trabalhos na literatura tem relatado há existência ou não de diferenças na expressão desse receptor em biópsias de pacientes com LCL (Esterre et al., 1992; Gaafar et al., 1999; Lima et al., 1994), fato que pode ser explicado pelos diferentes métodos empregados nas análises, às espécies do parasita e também a característica de cada população estudada. Outro marcador analisado foi o CD71, receptor de transferrina, ele é um marcador de ativação tardio e sua expressão está associada com a maior captação de ferro nas células em proliferação. Observamos uma maior frequência na expressão dessa molécula nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ no sangue periférico dos pacientes. No entanto, após estimulação das CMSP com *L. brazileinsis* foi observado uma maior frequência na expressão desse receptor apenas nas células T CD8⁺ em relação aos controles saudáveis estimulados, o que pode estar associado a diferentes estágios de ativação das subpopulações linfocitárias analisadas. A presença de células T expressando receptores associados com proliferação e ativação celular tem sido relatada em diferentes formas clínicas da leishmaniose. Trabalhos mostram que pacientes com LCL e LM apresentam uma maior expressão do CD25 que pacientes com LCD (Castes et al., 1988), o que estaria associado com a característica anérgica da resposta imune encontrada nessa forma clínica. Em 2001, Bottrel e colaboradores demonstraram que a estimulação de CMSP com SLA induzia o aumento na frequência de linfócitos T expressando o CD69, um marcador de ativação inicial. Em 2004, Antonelli e colaboradores mostraram que a frequência de linfócitos T CD4⁺CD69⁺ estava correlacionada com a intensidade do teste de Monte-negro em pacientes com LCL. Podemos especular, portanto, que o aumento na frequência de células T CD8⁺ e T CD4⁺ expressando receptores de proliferação e ativação celular no sangue periférico dos pacientes estaria relacionada com o papel efetor exercido por essas células na resposta imune contra a leishmânia.

As células T efetoras têm um papel importante durante a infecção, pois produzem vários fatores que estão envolvidos na supressão e controle da replicação do patógeno. As células T efetoras podem ser caracterizadas pela expressão do marcador CD45RO (Canto et al., 2005), essa molécula é associada também com células T memória (revisado em Dutton et al., 1998). No nosso estudo, observamos uma menor frequência da expressão dessa molécula nas células T CD8⁺ do *ex vivo* dos pacientes em relação aos controles saudáveis. De fato uma menor frequência na expressão desse marcador também tem sido demonstrado em pacientes com Leishmaniose Visceral ativa (Clarencio et al., 2009), a menor frequência na expressão dessa molécula nas células circulantes pode significar a migração ou retenção dessas células no tecido da lesão. Quando analisamos a expressão desse marcador nas células T que compõem o

infiltrado inflamatório observamos uma maior frequência da expressão dessa molécula tanto nas células T CD8⁺ quanto nas células T CD4⁺. De fato, a predominância de células T efectoras na lesão tem sido descrito na literatura (Gaafar et al., 1999; Lima et al., 1994) e sua presença é importante para o controle da infecção.

A ativação das células T leva a mudanças na expressão de moléculas de adesão na superfície das células, influenciando nos processos de circulação e recrutamento das células para o sítio de infecção, um evento crucial na imunopatologia da leishmaniose. Esse processo é de fundamental importância na composição do infiltrado inflamatório. CD62L medeia à entrada de leucócitos nos tecidos e tem uma importante função no endereçamento das células T para os órgãos linfóides (von Andrian and Mackay, 2000; Warnock et al., 1998), sendo expressa principalmente em células T virgens (Swain et al., 1996). No nosso trabalho encontramos uma menor frequência de células T CD8⁺ e T CD4⁺ expressando CD62L no *ex vivo* dos pacientes, o que pode estar associado com a ativação dos linfócitos e sua posterior migração para o sítio da lesão. Os linfócitos quando ativados tem níveis diminuídos de expressão do CD62L, e tendem a ter níveis aumentados de moléculas associadas com o endereçamento das células para o tecido de inflamação. Após estimulação das CMSP dos pacientes com leishmânia, nós observamos um significativo aumento na frequência de células T CD4⁺ expressando CD62L em relação aos controles estimulados, o que não foi observado nas células T CD8⁺. Esse fato foi também observado por Costa et al., em 2003, e segundo eles a estimulação de células T específicas à leishmânia pode ter favorecido a expansão clonal de células T CD4⁺CD62L⁺ previamente ativadas no *ex vivo*. A expressão do CD62L em células humanas não é tão bem esclarecida como em modelos experimentais, já foi demonstrado, por exemplo, que metade das células T humanas ativas expressam CD62L (Tedder et al., 1990) e que essa molécula pode estar associada com o endereçamento de células T para tecidos inflamados (Hodge et al., 2003; Keramidaris et al., 2001; Lukacs, 2000). Desta forma, células T expressando CD62L poderiam participar no estabelecimento das lesões em pacientes com leishmaniose cutânea.

Trabalhos mostram que a expressão do CCR7 é alta em células T virgens, como também em células T de memória central e que a regulação negativa dessa molécula está fortemente correlacionada com a ativação celular (Forster et al., 1999; Sallusto et al., 1999). No nosso trabalho, observamos uma baixa frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando CCR7 na análise *ex vivo* dos pacientes, porém somente para as células T CD4⁺ foi encontrada uma frequência significativamente menor na expressão dessa molécula em relação aos indivíduos controles. Diferentes níveis de expressão do CCR7 nas células T dos indivíduos saudáveis são observados na literatura, na maioria dos estudos o nível de expressão dessa

molécula esta em torno de 60% para ambas as populações celulares (Payne et al., 2009; Sokolowska-Wojdylo et al., 2005). No entanto, baixos níveis de expressão do CCR7 são também demonstrados (Pokkali and Das, 2009), no nosso trabalho nos observamos uma baixa frequência de expressão desse receptor nas células T CD8⁺ dos voluntários normais. No entanto, a estimulação das CMSP dos pacientes com leishmânia mostrou uma menor frequência tanto de células T CD8⁺ quanto T CD4⁺ expressando CCR7 em relação aos controles sadios estimulados. De fato, linfócitos T expressando baixos níveis de CCR7 têm sido demonstrados em outras patologias. Em infecções com o vírus da coriomeningite linfocítica células T citolíticas virgens expressam altos níveis de CCR7 tanto nos órgãos linfóides com nos órgãos não linfóides, já as células T específicas ao vírus regulam negativamente a expressão dessa molécula (Junt et al., 2004). Uma menor frequência de células T CD8⁺ expressando CCR7 tem sido observada em infecções do citomegalovírus (Appay et al., 2002). Da mesma forma analisamos a frequência da expressão do CCR7 nas células T CD8⁺ e T CD4⁺ do infiltrado inflamatório, apesar de não termos observado nenhuma diferença significativa na frequência da expressão desse receptor em relação ao tecido normal, nós podemos notar uma presença reduzida em ambas às populações linfocitárias no tecido da lesão. A reduzida frequência de células T expressando o receptor de quimiocinas associado com o endereçamento de células para o linfonodo e os órgãos linfóides secundários tanto no sangue periférico quanto no sitio da lesão dos pacientes sugere a presença de células T efetoras específicas a leishmânia nesses indivíduos.

Devido à importância da migração celular no processo de composição do infiltrado inflamatório, avaliamos a frequência de expressão do CLA, uma molécula associada com o deslocamento das células para o tecido, uma vez que a maioria das células T que compõem o infiltrado inflamatório cutâneo expressam essa molécula (Santamaria-Babi, 2004; Seneviratne et al., 2005). Observamos um aumento significativo na frequência de células T CD8⁺ expressando CLA no *ex vivo* dos pacientes. Uma maior frequência de expressão dessa molécula foi também observada nas células T CD8⁺, quando CMSP foram estimuladas com *L. braziliensis*. Provavelmente, a expressão dessa molécula está contribuindo para o deslocamento de células T CD8⁺ específicas a leishmânia para o sitio da lesão, favorecendo assim o controle do parasita. Células T expressando níveis aumentados de CLA têm sido observadas em indivíduos com diversas doenças inflamatórias cutâneas (revisado por Santamaria-Babi, 2004). Essas células podem estar contribuindo tanto com o controle quanto com a patogênese da doença. Na dermatite atópica, por exemplo, 50% das células T CD8⁺ específicas observados no sangue periféricos dos indivíduos expressam o CLA (Seneviratne et al., 2002), células T

CD4⁺CLA⁺ são também observadas nessa patologia (Teraki et al., 2000). Níveis elevados de células T CD8⁺CLA⁺ associadas com a destruição de melanócitos é observado em pacientes com vitiligo (Ogg et al., 1998). Já em pacientes com hanseníase a frequência de células T expressando CLA tem sido associada com o controle do parasita (Sieling, 2007). Não observamos aumento na frequência de células T CD4⁺ expressando CLA na análise *ex vivo* e nem após estimulação com leishmânia, no entanto não podemos descartar a possibilidade dessas células estarem expressando outras moléculas associadas com o deslocamento para o tecido, que não foram avaliadas como, por exemplo, CCR4 e CCR10 (Sokolowska-Wojdylo et al., 2005; Whittaker, 2006).

Posteriormente, avaliamos a frequência de expressão do CLA nas células T do infiltrado inflamatório. Observamos um aumento significativo na frequência de células T CD8⁺CLA⁺. De fato, biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea localizada mostram uma correlação positiva entre a expressão do CLA e células T CD4⁺ e T CD8⁺ (Morgado et al., 2008). Foi demonstrado também diferenças na proporção de células T expressando CLA em biópsias de pacientes com diferentes formas clínicas da leishmaniose cutânea. Em biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea difusa a expressão do CLA é reduzida, já em biópsias de pacientes com LC a expressão dessa molécula é aumentada, essas diferenças podem estar associadas com a capacidade efetora das células T em cada forma clinica (Diaz et al., 2002). Essa característica também tem sido correlacionada em outras patologias, em biópsias de pacientes com hanseníase tuberculoide, por exemplo, as células T expressam mais CLA que na hanseníase lepromatosa (Sieling, 2007). Por outro lado, foi demonstrado que células T expressando CLA podem mediar respostas inflamatórias não desejadas (Santamaria-Babi, 2004). Esses resultados sugerem que o recrutamento de células T CD8⁺ específicas à leishmânia para o sitio da lesão é um evento importante no controle da infecção, e que a falta do controle dessa resposta poderia contribuir com a lesão tecidual.

Uma vez que, a natureza das células que compõem o infiltrado inflamatório na lesão pode ter um importante papel no curso da infecção, caracterizamos o seu perfil celular. As lesões de pacientes com LCL são formadas basicamente por células mononucleares, com uma predominância de células T e macrófagos (Gaafar et al., 1999; Morgado et al., 2008). Observamos uma frequência elevada de células T CD4⁺ e T CD8⁺, porem a frequência das células T CD4⁺ foi cerca de duas vezes maior que a de células T CD8⁺, o que pode significar a expressão de outros receptores de deslocamento para o tecido que não o CLA, já que a expressão dessa molécula foi reduzida nessas células. A presença tanto das células T CD4⁺ quanto das células T CD8⁺ na eliminação do parasita tem sido sugerida em lesões recentes

(Morgado et al., 2008). Notamos também uma elevada frequência de células dendríticas. As células dendríticas são importantes na fagocitose e transporte dos antígenos para os órgãos linfóides (Moll et al., 1995; Ritter and Osterloh, 2007), onde os processos de apresentação de antígenos e ativação das células T acontecem. Além disso, notamos um aumento na presença de células NK, essas células são encontradas em menor frequência no infiltrado inflamatório (Maasho et al., 1998), entretanto elas têm sido associadas com os mecanismos de proteção, através da produção inicial de IFN- γ e também pela atividade citotóxica importante na destruição do parasita (Korbel et al., 2004; Liese et al., 2008; Maasho et al., 1998). Esses resultados sugerem a participação de diferentes populações celulares na resposta imune do infiltrado inflamatório, a presença dessas células estaria favorecendo os mecanismos leishmanicidas (Machado et al., 2002; Ritter and Osterloh, 2007; Ruiz and Becker, 2007).

A resposta imune protetora na leishmaniose é dependente da imunidade celular, as citocinas são importantes componentes dessa resposta. Observamos uma produção significativamente aumentada de IFN- γ , TNF- α e IL-2 no sobrenadante de cultura das CMSP estimuladas com leishmânia, assim como, podemos notar um discreto aumento de IL-10. A produção mista de citocinas na LCL ativa tem sido demonstrada na literatura (Bittar et al., 2007; Coutinho et al., 1996). Trabalhos anteriores demonstram que a estimulação de CMSP de pacientes infectados com *Leishmania braziliensis* e/ou com SLA induz a produção de altos níveis de IFN- γ , essa produção também pode ser vista em pacientes infectados com outras espécies de leishmânia. IFN- γ e o TNF- α são citocinas associadas com a resposta imune Th1 sendo determinante para ativação dos mecanismos leishmanicidas, favorecendo o controle do parasita. No nosso estudo, as células T CD4⁺ foram as principais células expressando o IFN- γ . De fato, pacientes com LCL na fase ativa da infecção apresentam uma maior produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ (Ajadary et al., 2000; Bottrel et al., 2001). Recentemente, foi demonstrado que linfócitos T duplo negativo (CD4⁻CD8⁻) são o segundo tipo celular mais prevalente produzindo IFN- γ na LCL (Bottrel et al., 2001), exercendo um importante papel na resposta imune inata. A frequência de células T CD8⁺ expressando IFN- γ geralmente é reduzida. A importância de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ na infecção primária por leishmânia foi demonstrada em 2002, por Belkaid e colaboradores. Assim, as células T CD8⁺ podem utilizar diferentes mecanismos citotóxicos durante a resposta imune e a produção de IFN- γ tanto pelas células T CD4⁺ quanto pelas células T CD8⁺ são importantes no controle da infecção. No nosso trabalho, observamos uma produção aumentada, mas não estatisticamente significativa na frequência de células T CD8⁺ expressando IFN- γ . Esse dado nos sugere que as

células T CD8⁺ podem estar atuando no controle da infecção através de outros mecanismos citotóxicos.

Surpreendentemente, as células T CD8⁺ dos pacientes com LCL mostraram produção aumentada de IL-10. IL-10 é uma importante citocina antiinflamatória, sua função tem sido demonstrada em infecções com diferentes parasitas (revisado em Couper et al., 2008). O aumento na frequência de células T produzindo essa citocina tem sido demonstrado em CMSP estimuladas com SLA (Bottrel et al., 2001; Bourreau et al., 2007). Da mesma forma, uma elevada produção de IL-10 pode ser encontrada em indivíduos que apresentam cura espontânea (Gomes-Silva et al., 2007) e também nos indivíduos assintomáticos infectados com *L. braziliensis* (Bittar et al., 2007). Além disso, na LM foi demonstrado que os pacientes produzem níveis reduzidos de IL-10 (Bacellar et al., 2002) e também do seu receptor (Faria et al., 2005), o que estaria correlacionado com a exacerbação da resposta inflamatória. Por outro lado, IL-10 regula negativamente a produção de IFN- γ em pacientes infectados com *L. braziliensis* (Rocha et al., 1999), e tem sido encontrado no sítio das lesões de pacientes infectados com *L. major* (Louzir et al., 1998) e *L. mexicana* (Melby, P.C., 1996). Na leishmaniose tegumentar, a principal célula produtora de IL-10 ainda não foi determinada, já foi demonstrada a produção desta citocinas por monócitos e células T CD4⁺ (Anderson et al., 2007; Bottrel et al., 2001), no nosso estudo, observamos uma elevada frequência de células T CD8⁺ produzindo IL-10. Esse fato foi também observado em pacientes com leishmaniose cutânea infectados com *L. guyanensis* (Bourreau et al., 2007). Células T CD8⁺ supressoras têm sido descritas na literatura (revisado em Lu and Cantor, 2008), os mecanismos utilizados por essas células para suprimir a resposta imune incluem a destruição das células alvo e a secreção de citocinas imunossupressoras como IL-10. Em infecções com o vírus influenza a presença de células T CD8⁺ secretando IL-10 reduz a inflamação pulmonar (Sun et al., 2009). A produção do IL-10 pode ser um fator chave, para regular a produção exacerbada de IFN- γ , exercendo uma função importante na regulação da resposta inflamatória necessária para o controle da infecção (Bacellar et al., 2002; Belkaid et al., 2001; Gomes-Silva et al., 2007). O balanço entre a produção de IFN- γ e IL-10 é de fundamental importância no curso da resposta imune (Antonelli et al., 2004), e provavelmente as células T CD8⁺ produtoras de IL-10 poderiam estar exercendo uma função regulatória da resposta imune celular durante a infecção.

Devido a importância da citotoxicidade na proteção imune em infecções virais, e a alguns dados na literatura sugerindo que esse mecanismo pode contribuir na proteção contra alguns patógenos intracelulares como *Trypanosoma cruzi* e *Mycobacterium tuberculosis* (Cho et al.,

2000; Stenger and Modlin, 1998), tornou-se necessário avaliar a participação dessa via na resposta imune contra leishmânia. As células citotóxicas destroem as células alvo através de dois mecanismos principais: expressão de Fas/FasL e perforina-granzima B, e nesse estudo, avaliamos apenas a citotoxicidade mediada pela expressão de grânulos. Observamos uma elevada produção de granzima B nas células T CD8⁺ dos pacientes quando estimuladas com *L. braziliensis*. Em 2004, Bussoffara e colaboradores, demonstraram uma maior atividade de granzima B em pacientes infectados com *L. major*, a presença de células T CD8⁺ citotóxicas foi também demonstrada em infecções com *L. amazonensis* (Russo et al., 1999). Granzima B é uma serina protease expressa pelas células T CD8⁺ citotóxicas, células NK e células NKT, a expressão dessa serina protease foi também demonstrada em níveis reduzidos nas células T CD4⁺ (Grossman et al., 2004), porém o mecanismo pelo qual as células T CD4⁺ reconhecem e destroem as células alvo ainda não está definido. Já foi demonstrado que IL-2 pode regular a expressão de granzima B nas células T CD8⁺ ativadas (Janas et al., 2005). A elevada expressão dessa citocina, poderia estar favorecendo a produção de granzima B observada.

Sabendo que na resposta imune efetiva contra a leishmânia as células T devem migrar do sangue periférico para o sítio da lesão, e tendo como base a elevada expressão de CLA pelas células T CD8⁺ do sangue periférico demonstrada nos nossos dados, avaliamos a produção de granzima B pelas células T CD8⁺ no sítio da lesão. Notamos a presença de células T CD8⁺ co-expressando granzima B, sugerindo a participação dessas células no controle da infecção. A resposta imune contra a leishmânia é um mecanismo complexo que tem a participação de diversas populações celulares, a presença de células NK na imune protetora a leishmânia tem sido evidenciada, essas células produzem IFN- γ e secretam grânulos citotóxicos (Akuffo and Britton, 1992; Nylén et al., 2003). De fato, apesar de não termos avaliado a função dessas células, não se deve descartar a sua contribuição no controle da infecção. Entretanto, não observamos diferença na presença dessas células no infiltrado inflamatório.

O mecanismo de citotoxicidade mediado pela expressão dos receptores Fas/FasL, não foi avaliado, no entanto essa é uma importante via de indução de apoptose de células alvo já demonstrado em infecções com leishmânia e tem sido sugerido ser importante no controle da infecção (Eidsmo et al., 2005). Entretanto, a resposta citotóxica tem sido associada com a cronicidade da infecção e dano tecidual observado em pacientes com LM (Barral-Netto et al., 1995; Brodskyn et al., 1997). Assim, podemos sugerir que uma possível perda nos mecanismos regulatórios da resposta imune poderia favorecer a resposta exacerbada encontrada nessas pacientes. Desta forma podemos concluir que o controle da infecção por leishmânia é um evento múltiplo, com a participação de diferentes mecanismos, e sugerimos que as células T

CD8⁺ são importante nos eventos iniciais da infecção com *L. braziliensis*, e que essas células participam tanto dos mecanismos de citotoxicidade, expressando Granzima B, quanto das vias de regulação da resposta imune por meio da expressão de IL-10. Ambos achados devem ser mais profundamente investigados, pois seriam importantes para o entendimento do curso da infecção e também poderiam contribuir com o desenvolvimento de estratégias terapêuticas.

9- CONCLUSÕES

O desenvolvimento desse trabalho permitiu avaliar a função das células T CD8⁺ na fase inicial da infecção por *L. braziliensis* em pacientes com leishmaniose cutânea localizada.

Permitindo concluir que:

1. Células T CD8⁺ de pacientes com LCL apresentam perfil de ativação, efector e migratório para o sitio da infecção.
2. Células T CD8⁺ de pacientes com LCL são funcionalmente citotóxica o que sugere um papel relevante no controle da infecção.
3. Além da atividade citotóxica essas células podem estar regulando a inflamação através da produção da IL-10.

10-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adamthwaite, D., and Cooley, M.A. (1994). CD8+ T-cell subsets defined by expression of CD45 isoforms differ in their capacity to produce IL-2, IFN-gamma and TNF-beta. *Immunology* 81, 253-260.
- Ajdary, S., Alimohammadian, M.H., Eslami, M.B., Kemp, K., and Kharazmi, A. (2000). Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous Leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. *Infect Immun* 68, 1760-1764.
- Akbar, A.N., Amlot, P.L., Timms, A., Lombardi, G., Lechler, R., and Janossy, G. (1990). The development of primed/memory CD8+ lymphocytes in vitro and in rejecting kidneys after transplantation. *Clinical and experimental immunology* 81, 225-231.
- Akdis, M., Simon, H.U., Weigl, L., Kreyden, O., Blaser, K., and Akdis, C.A. (1999). Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8+ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. *J Immunol* 163, 466-475.
- Akuffo, H.O., and Britton, S.F. (1992). Contribution of non-Leishmania-specific immunity to resistance to Leishmania infection in humans. *Clinical and experimental immunology* 87, 58-64.
- Alexander, J., Satoskar, A.R., and Russell, D.G. (1999). Leishmania species: models of intracellular parasitism. *Journal of cell science* 112 Pt 18, 2993-3002.
- Anderson, C.F., Oukka, M., Kuchroo, V.J., and Sacks, D. (2007). CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 204, 285-297.
- Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., and Gollob, K.J. (2005). Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology letters* 101, 226-230.
- Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., and Gollob, K.J. (2004). Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clinical and experimental immunology* 136, 341-348.
- Appay, V., Dunbar, P.R., Callan, M., Klenerman, P., Gillespie, G.M., Papagno, L., Ogg, G.S., King, A., Lechner, F., Spina, C.A., *et al.* (2002). Memory CD8+ T cells vary in differentiation phenotype in different persistent virus infections. *Nat Med* 8, 379-385.
- Babu, S., and Nutman, T.B. (2003). Proinflammatory cytokines dominate the early immune response to filarial parasites. *J Immunol* 171, 6723-6732.

Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., and Carvalho, E.M. (2002). Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70, 6734-6740.

Bajorath, J., and Aruffo, A. (1994). Molecular model of the extracellular lectin-like domain in CD69. *The Journal of biological chemistry* 269, 32457-32463.

Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., Carvalho, E.M., and Reed, S.G. (1995). Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 17, 21-28.

Barral, A., Barral-Netto, M., Almeida, R., de Jesus, A.R., Grimaldi Junior, G., Netto, E.M., Santos, I., Bacellar, O., and Carvalho, E.M. (1992). Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 47, 587-592.

Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A.L., Barral-Netto, M., and Carvalho, E.M. (1995). Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *International journal of dermatology* 34, 474-479.

Bayer, A.L., Baliga, P., and Woodward, J.E. (1998). Transferrin receptor in T cell activation and transplantation. *Journal of leukocyte biology* 64, 19-24.

Bayer, A.L., Yu, A., and Malek, T.R. (2007). Function of the IL-2R for thymic and peripheral CD4+CD25+ Foxp3+ T regulatory cells. *J Immunol* 178, 4062-4071.

Belkaid, Y. (2003). The role of CD4(+)CD25(+) regulatory T cells in *Leishmania* infection. *Expert opinion on biological therapy* 3, 875-885.

Belkaid, Y., Hoffmann, K.F., Mendez, S., Kamhawi, S., Udey, M.C., Wynn, T.A., and Sacks, D.L. (2001). The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *The Journal of experimental medicine* 194, 1497-1506.

Belkaid, Y., Piccirillo, C.A., Mendez, S., Shevach, E.M., and Sacks, D.L. (2002a). CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420, 502-507.

Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M.C., and Sacks, D. (2002b). CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168, 3992-4000.

Belosevic, M., Finbloom, D.S., Van Der Meide, P.H., Slayter, M.V., and Nacy, C.A. (1989). Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies in vivo abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol* 143, 266-274.

Beverley, P.C., Merkenschlager, M., and Terry, L. (1988). Phenotypic diversity of the CD45 antigen and its relationship to function. *Immunol Suppl* 1, 3-5.

- Bittar, R.C., Nogueira, R.S., Vieira-Goncalves, R., Pinho-Ribeiro, V., Mattos, M.S., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G., and Da-Cruz, A.M. (2007). T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 625-630.
- Bittencourt, A.L., and Barral-Netto, M. (1995). Leishmaniasis. In DOERR, W. & SEIFERT, G. *Tropical Pathology* 8, 2ed. *Berlin: Springer Verlag*, p. 597-650.
- Bogdan, C., Donhauser, N., Doring, R., Rollinghoff, M., Diefenbach, A., and Rittig, M.G. (2000). Fibroblasts as host cells in latent leishmaniasis. *The Journal of experimental medicine* 191, 2121-2130.
- Bomfim, G., Nascimento, C., Costa, J., Carvalho, E.M., Barral-Netto, M., and Barral, A. (1996). Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Experimental parasitology* 84, 188-194.
- Bottrel, R.L., Dutra, W.O., Martins, F.A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R.P., Mayrink, W., Locksley, R., *et al.* (2001). Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 69, 3232-3239.
- Bourreau, E., Collet, M., Prevot, G., Milon, G., Ashimoff, D., Hasagewa, H., Parra-Lopez, C., and Launois, P. (2002b). IFN-gamma-producing CD45RA+CD8+ and IL-10-producing CD45RA-CD4+ T cells generated in response to LACK in naive subjects never exposed to *Leishmania*. *European journal of immunology* 32, 510-520.
- Bourreau, E., Gardon, J., Pradinaud, R., Pascalis, H., Prevot-Linguet, G., Kariminia, A., and Pascal, L. (2003). Th2 responses predominate during the early phases of infection in patients with localized cutaneous leishmaniasis and precede the development of Th1 responses. *Infect Immun* 71, 2244-2246.
- Bourreau, E., Prevot, G., Gardon, J., Pradinaud, R., Hasagewa, H., Milon, G., and Launois, P. (2002a). LACK-specific CD4(+) T cells that induce gamma interferon production in patients with localized cutaneous leishmaniasis during an early stage of infection. *Infect Immun* 70, 3122-3129.
- Bourreau, E., Ronet, C., Couppie, P., Sainte-Marie, D., Tacchini-Cottier, F., and Launois, P. (2007). IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 9, 1034-1041.
- Bousoffara, T., Louzir, H., Ben Salah, A., and Dellagi, K. (2004). Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 189, 1265-1273.

Brodskyn, C.I., Barral, A., Boaventura, V., Carvalho, E., and Barral-Netto, M. (1997). Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* *159*, 4467-4473.

Brodskyn, C.I., Barral, A., Bulhoes, M.A., Souto, T., Machado, W.C., and Barral-Netto, M. (1996). Cytotoxicity in patients with different clinical forms of Chagas' disease. *Clinical and experimental immunology* *105*, 450-455.

Browne, K.A., Blink, E., Sutton, V.R., Froelich, C.J., Jans, D.A., and Trapani, J.A. (1999). Cytosolic delivery of granzyme B by bacterial toxins: evidence that endosomal disruption, in addition to transmembrane pore formation, is an important function of perforin. *Molecular and cellular biology* *19*, 8604-8615.

Bryceson, A.D. (1970). Immunological aspects of clinical leishmaniasis. *Proceedings of the Royal Society of Medicine* *63*, 1056-1060.

Byth, K.F., Conroy, L.A., Howlett, S., Smith, A.J., May, J., Alexander, D.R., and Holmes, N. (1996). CD45-null transgenic mice reveal a positive regulatory role for CD45 in early thymocyte development, in the selection of CD4+CD8+ thymocytes, and B cell maturation. *The Journal of experimental medicine* *183*, 1707-1718.

Campanelli, A.P., Roselino, A.M., Cavassani, K.A., Pereira, M.S., Mortara, R.A., Brodskyn, C.I., Goncalves, H.S., Belkaid, Y., Barral-Netto, M., Barral, A., *et al.* (2006). CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. *The Journal of infectious diseases* *193*, 1313-1322.

Canto, E., Rodriguez-Sanchez, J.L., and Vidal, S. (2005). Naive CD4+ cells from cord blood can generate competent Th effector cells. *Transplantation* *80*, 850-858.

Carvalho, E.M., Barral, A., Costa, J.M., Bittencourt, A., and Marsden, P. (1994). Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta tropica* *56*, 315-325.

Carvalho, E.M., Johnson, W.D., Barreto, E., Marsden, P.D., Costa, J.L., Reed, S., and Rocha, H. (1985). Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol* *135*, 4144-4148.

Cascino, I., Fiucci, G., Papoff, G., and Ruberti, G. (1995). Three functional soluble forms of the human apoptosis-inducing Fas molecule are produced by alternative splicing. *J Immunol* *154*, 2706-2713.

Castes, M., Agnelli, A., and Rondon, A.J. (1984). Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology* *57*, 279-286.

Castes, M., Blackwell, J., Trujillo, D., Formica, S., Cabrera, M., Zorrilla, G., Rodas, A., Castellanos, P.L., and Convit, J. (1994). Immune response in healthy volunteers vaccinated

with killed leishmanial promastigotes plus BCG. I: Skin-test reactivity, T-cell proliferation and interferon-gamma production. *Vaccine* 12, 1041-1051.

Castes, M., Cabrera, M., Trujillo, D., and Convit, J. (1988). T-cell subpopulations, expression of interleukin-2 receptor, and production of interleukin-2 and gamma interferon in human American cutaneous leishmaniasis. *Journal of clinical microbiology* 26, 1207-1213.

Castilho, T.M., Shaw, J.J., and Floeter-Winter, L.M. (2003). New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of *Leishmania* species. *Journal of clinical microbiology* 41, 540-546.

Cebrian, M., Yague, E., Rincon, M., Lopez-Botet, M., de Landazuri, M.O., and Sanchez-Madrid, F. (1988). Triggering of T cell proliferation through AIM, an activation inducer molecule expressed on activated human lymphocytes. *The Journal of experimental medicine* 168, 1621-1637.

Channon, J.Y., Roberts, M.B., and Blackwell, J.M. (1984). A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. *Immunology* 53, 345-355.

Cho, S., Mehra, V., Thoma-Uszynski, S., Stenger, S., Serbina, N., Mazzaccaro, R.J., Flynn, J.L., Barnes, P.F., Southwood, S., Celis, E., *et al.* (2000). Antimicrobial activity of MHC class I-restricted CD8+ T cells in human tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12210-12215.

Clarencio, J., de Oliveira, C.I., Favali, C., Medina, O., Caldas, A., Costa, C.H., Costa, D.L., Brodskyn, C., Barral, A., and Barral-Netto, M. (2009). Could the lower frequency of CD8+CD18+CD45RO+ lymphocytes be biomarkers of human VL? *International immunology* 21, 137-144.

Conceicao-Silva, F., Dorea, R.C., Pirmez, C., Schubach, A., and Coutinho, S.G. (1990). Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology* 79, 221-226.

Convit, J., and Kerdel-Vegas, F. (1965). Disseminated Cutaneous Leishmaniasis; Inoculation to Laboratory Animals, Electron Microscopy and Fluorescent Antibodies Studies. *Archives of dermatology* 91, 439-447.

Convit, J., Ulrich, M., Fernandez, C.T., Tapia, F.J., Caceres-Dittmar, G., Castes, M., and Rondon, A.J. (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 87, 444-448.

Costa, J.M., Marsden, P.D., Llanos-Cuentas, E.A., Netto, E.M., Carvalho, E.M., Barral, A., Rosa, A.C., Cuba, C.C., Magalhaes, A.V., and Barreto, A.C. (1986). Disseminated cutaneous

leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *The Journal of tropical medicine and hygiene* 89, 319-323.

Costa, J.M., Saldanha, A.C., Silva, C.M., Branco Mdos, R., Barral, A., Carvalho, E.M., and Bittencourt, A.L. (1995). Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous Leishmaniasis (DCL). *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 28, 45-47.

Costa, J.M., Vale, K.C., Franca, F., Saldanha, A.C., da Silva, J.O., Lago, E.L., Marsden, P.D., Magalhaes, A.V., e Silva, C.M., Serra Neto, A., *et al.* (1990). [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 23, 205-208.

Costa, R.P., Gollob, K.J., Machado, P.R., Bacellar, O.A., Almeida, R.P., Barral, A., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., and Dutra, W.O. (2003). Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4+ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. *Immunology letters* 90, 155-159.

Couper, K.N., Blount, D.G., and Riley, E.M. (2008). IL-10: the master regulator of immunity to infection. *J Immunol* 180, 5771-5777.

Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Santiago, M.A., and De-Luca, P. (1998). Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al 31, 139-142.

Coutinho, S.G., Oliveira, M.P., Da-Cruz, A.M., De Luca, P.M., Mendonca, S.C., Bertho, A.L., Soong, L., and McMahon-Pratt, D. (1996). T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Experimental parasitology* 84, 144-155.

Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Oliveira-Neto, M.P., and Coutinho, S.G. (2005). Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *The British journal of dermatology* 153, 537-543.

Da-Cruz, A.M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Nogueira, R., Pinho-Ribeiro, V., Azeredo-Coutinho, R.B., and Coutinho, S.G. (2002). T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and diagnostic laboratory immunology* 9, 251-256.

Da-Cruz, A.M., Conceicao-Silva, F., Bertho, A.L., and Coutinho, S.G. (1994). *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62, 2614-2618.

Da Silva, D.B. (1982). [Hansenoid anergic leishmaniasis]. *Medicina cutanea ibero-latino-americana* 10, 143-150.

- De Maria, R., Cifone, M.G., Trotta, R., Rippo, M.R., Festuccia, C., Santoni, A., and Testi, R. (1994). Triggering of human monocyte activation through CD69, a member of the natural killer cell gene complex family of signal transducing receptors. *The Journal of experimental medicine* *180*, 1999-2004.
- Diaz, N.L., Arvelaez, F.A., Zerpa, O., and Tapia, F.J. (2006). Inducible nitric oxide synthase and cytokine pattern in lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental dermatology* *31*, 114-117.
- Diaz, N.L., Zerpa, O., Ponce, L.V., Convit, J., Rondon, A.J., and Tapia, F.J. (2002). Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. *Experimental dermatology* *11*, 34-41.
- Dlugonska, H. (2000). [Immunity in *Toxoplasma gondii* infections]. *Postepy higieny i medycyny doswiadczalnej* *54*, 53-65.
- Dutton, R.W., Bradley, L.M., and Swain, S.L. (1998). T cell memory. *Annual review of immunology* *16*, 201-223.
- Earl, L.A., and Baum, L.G. (2008). CD45 glycosylation controls T-cell life and death. *Immunology and cell biology* *86*, 608-615.
- Eidsmo, L., Nysten, S., Khamesipour, A., Hedblad, M.A., Chiodi, F., and Akuffo, H. (2005). The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania* major-induced cutaneous Leishmaniasis. *The American journal of pathology* *166*, 1099-1108.
- Esterre, P., Dedet, J.P., Frenay, C., Chevallier, M., and Grimaud, J.A. (1992). Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Archiv* *421*, 239-247.
- Faria, D.R., Gollob, K.J., Barbosa, J., Jr., Schriefer, A., Machado, P.R., Lessa, H., Carvalho, L.P., Romano-Silva, M.A., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., *et al.* (2005). Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* *73*, 7853-7859.
- Fehervari, Z., and Sakaguchi, S. (2004). CD4+ Tregs and immune control. *J Clin Invest* *114*, 1209-1217.
- Fehniger, T.A., Cooper, M.A., Nuovo, G.J., Cella, M., Facchetti, F., Colonna, M., and Caligiuri, M.A. (2003). CD56bright natural killer cells are present in human lymph nodes and are activated by T cell-derived IL-2: a potential new link between adaptive and innate immunity. *Blood* *101*, 3052-3057.
- Forster, R., Schubel, A., Breitfeld, D., Kremmer, E., Renner-Muller, I., Wolf, E., and Lipp, M. (1999). CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs. *Cell* *99*, 23-33.

Gaafar, A., Veress, B., Permin, H., Kharazmi, A., Theander, T.G., and el Hassan, A.M. (1999). Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* *91*, 314-320.

Genaro, O., Silva, A.L.F., Michalick, M.S.M., Costa, C.A., Mayrink, W., and Dias, M. (2000). Leishmaniose Tegumentar Americana. IN: NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. 10 ed. São Paulo: Atheneu. p. 36-53.

Giri, J.G., Anderson, D.M., Kumaki, S., Park, L.S., Grabstein, K.H., and Cosman, D. (1995). IL-15, a novel T cell growth factor that shares activities and receptor components with IL-2. *Journal of leukocyte biology* *57*, 763-766.

Gomes-Silva, A., de Cassia Bittar, R., Dos Santos Nogueira, R., Amato, V.S., da Silva Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G., and Da-Cruz, A.M. (2007). Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and experimental immunology* *149*, 440-444.

Grossman, W.J., Verbsky, J.W., Tollefsen, B.L., Kemper, C., Atkinson, J.P., and Ley, T.J. (2004). Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* *104*, 2840-2848.

Gumy, A., Louis, J.A., and Launois, P. (2004). The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *International journal for parasitology* *34*, 433-444.

Han, Y., Guo, Q., Zhang, M., Chen, Z., and Cao, X. (2009). CD69+ CD4+ CD25- T cells, a new subset of regulatory T cells, suppress T cell proliferation through membrane-bound TGF-beta 1. *J Immunol* *182*, 111-120.

Harty, J.T., Tvinnereim, A.R., and White, D.W. (2000). CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annual review of immunology* *18*, 275-308.

Heinzel, F.P., Rerko, R.M., Ahmed, F., and Pearlman, E. (1995). Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating leishmaniasis in normally resistant mice. *J Immunol* *155*, 730-739.

Heusel, J.W., Wesselschmidt, R.L., Shresta, S., Russell, J.H., and Ley, T.J. (1994). Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. *Cell* *76*, 977-987.

Ho, P.K., and Hawkins, C.J. (2005). Mammalian initiator apoptotic caspases. *The FEBS journal* *272*, 5436-5453.

Hodge, G., Hodge, S., Markus, C., Lawrence, A., and Han, P. (2003). A marked decrease in L-selectin expression by leucocytes in infants with *Bordetella pertussis* infection: leucocytosis explained? *Respirology (Carlton, Vic)* *8*, 157-162.

- Hondowicz, B., and Scott, P. (1999). Influence of host and parasite factors on the innate immune response and Th2 stability following infection with *Leishmania major*. *Microbes and infection / Institut Pasteur 1*, 65-71.
- Imlach, S., McBreen, S., Shirafuji, T., Leen, C., Bell, J.E., and Simmonds, P. (2001). Activated peripheral CD8 lymphocytes express CD4 in vivo and are targets for infection by human immunodeficiency virus type 1. *Journal of virology 75*, 11555-11564.
- Isaza, D.M., Restrepo, M., Restrepo, R., Caceres-Dittmar, G., and Tapia, F.J. (1996). Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. *The American journal of tropical medicine and hygiene 55*, 365-369.
- Janas, M.L., Groves, P., Kienzle, N., and Kelso, A. (2005). IL-2 regulates perforin and granzyme gene expression in CD8+ T cells independently of its effects on survival and proliferation. *J Immunol 175*, 8003-8010.
- Jankovic, D., Kullberg, M.C., Feng, C.G., Goldszmid, R.S., Collazo, C.M., Wilson, M., Wynn, T.A., Kamanaka, M., Flavell, R.A., and Sher, A. (2007). Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection. *The Journal of experimental medicine 204*, 273-283.
- Johnson, B.J., Costelloe, E.O., Fitzpatrick, D.R., Haanen, J.B., Schumacher, T.N., Brown, L.E., and Kelso, A. (2003). Single-cell perforin and granzyme expression reveals the anatomical localization of effector CD8+ T cells in influenza virus-infected mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100*, 2657-2662.
- Junt, T., Scandella, E., Forster, R., Krebs, P., Krautwald, S., Lipp, M., Hengartner, H., and Ludewig, B. (2004). Impact of CCR7 on priming and distribution of antiviral effector and memory CTL. *J Immunol 173*, 6684-6693.
- Kahawita, I.P., and Lockwood, D.N. (2008). Towards understanding the pathology of erythema nodosum leprosum. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene 102*, 329-337.
- Keramidas, E., Merson, T.D., Steeber, D.A., Tedder, T.F., and Tang, M.L. (2001). L-selectin and intercellular adhesion molecule 1 mediate lymphocyte migration to the inflamed airway/lung during an allergic inflammatory response in an animal model of asthma. *The Journal of allergy and clinical immunology 107*, 734-738.
- Kolde, G., Luger, T., Sorg, C., and Sunderkotter, C. (1996). Successful treatment of cutaneous leishmaniasis using systemic interferon-gamma. *Dermatology (Basel, Switzerland) 192*, 56-60.
- Korbel, D.S., Finney, O.C., and Riley, E.M. (2004). Natural killer cells and innate immunity to protozoan pathogens. *International journal for parasitology 34*, 1517-1528.

Krensky, A.M. (2000). Granulysin: a novel antimicrobial peptide of cytolytic T lymphocytes and natural killer cells. *Biochemical pharmacology* 59, 317-320.

Kuhn, A., Beissert, S., and Krammer, P.H. (2009). CD4(+)CD25 (+) regulatory T cells in human lupus erythematosus. *Archives of dermatological research* 301, 71-81.

Lainson, R., Shaw, J.J., and Silveira, F.T. (1987). Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 81, 702-703.

Launois, P., Swihart, K.G., Milon, G., and Louis, J.A. (1997). Early production of IL-4 in susceptible mice infected with *Leishmania major* rapidly induces IL-12 unresponsiveness. *J Immunol* 158, 3317-3324.

Leopoldo, P.T., Machado, P.R., Almeida, R.P., Schriefer, A., Giudice, A., de Jesus, A.R., Ho, J.L., Guimaraes, L.H., Bacellar, O., and Carvalho, E.M. (2006). Differential effects of antigens from *L. braziliensis* isolates from disseminated and cutaneous leishmaniasis on in vitro cytokine production. *BMC infectious diseases* 6, 75.

Li, J.H., Rosen, D., Ronen, D., Behrens, C.K., Krammer, P.H., Clark, W.R., and Berke, G. (1998). The regulation of CD95 ligand expression and function in CTL. *J Immunol* 161, 3943-3949.

Liese, J., Schleicher, U., and Bogdan, C. (2008). The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology* 213, 377-387.

Liew, F.Y., Li, Y., and Millott, S. (1990). Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol* 145, 4306-4310.

Lima, H.C., Vasconcelos, A.W., David, J.R., and Lerner, E.A. (1994). American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 50, 743-747.

Louzir, H., Melby, P.C., Ben Salah, A., Marrakchi, H., Aoun, K., Ben Ismail, R., and Dellagi, K. (1998). Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *The Journal of infectious diseases* 177, 1687-1695.

Lu, L., and Cantor, H. (2008). Generation and regulation of CD8(+) regulatory T cells. *Cellular & molecular immunology* 5, 401-406.

Lukacs, N.W. (2000). Migration of helper T-lymphocyte subsets into inflamed tissues. *The Journal of allergy and clinical immunology* 106, S264-269.

Luther, S.A., Tang, H.L., Hyman, P.L., Farr, A.G., and Cyster, J.G. (2000). Coexpression of the chemokines ELC and SLC by T zone stromal cells and deletion of the ELC gene in the *plt/plt*

- mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 12694-12699.
- Maasho, K., Sanchez, F., Schurr, E., Hailu, A., and Akuffo, H. (1998). Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun* 66, 2698-2704.
- Machado, P., Kanitakis, J., Almeida, R., Chalon, A., Araujo, C., and Carvalho, E.M. (2002). Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 12, 449-451.
- Maggi, E., Giudizi, M.G., Biagiotti, R., Annunziato, F., Manetti, R., Piccinni, M.P., Parronchi, P., Sampognaro, S., Giannarini, L., Zuccati, G., *et al.* (1994). Th2-like CD8+ T cells showing B cell helper function and reduced cytolytic activity in human immunodeficiency virus type 1 infection. *The Journal of experimental medicine* 180, 489-495.
- Marovich, M.A., McDowell, M.A., Thomas, E.K., and Nutman, T.B. (2000). IL-12p70 production by *Leishmania major*-harboring human dendritic cells is a CD40/CD40 ligand-dependent process. *J Immunol* 164, 5858-5865.
- Marsden, P.D. (1986). Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 80, 859-876.
- Marsden, P.D. (1990). Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ (Clinical research ed)* 301, 656-657.
- Marsden, P.D., Tada, M.S., Barreto, A.C., and Cuba, C.C. (1984). Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 78, 561-562.
- Maruyama, S., Shen, H., Kanoh, M., Matsumoto, A., and Asano, Y. (2007). Differential effect of *Listeria monocytogenes* infection on cytokine production and cytotoxicity of CD8 T cells. *Microbiology and immunology* 51, 893-901.
- McMahon-Pratt, D., Bennett, E., and David, J.R. (1982). Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of *Leishmania braziliensis*. *J Immunol* 129, 926-927.
- Mendonca, S.C., De Luca, P.M., Mayrink, W., Restom, T.G., Conceicao-Silva, F., Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Da Costa, C.A., Genaro, O., Toledo, V.P., *et al.* (1995). Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 53, 195-201.
- Minami, Y., Kono, T., Miyazaki, T., and Taniguchi, T. (1993). The IL-2 receptor complex: its structure, function, and target genes. *Annual review of immunology* 11, 245-268.

Modlin, R.L., Tapia, F.J., Bloom, B.R., Gallinoto, M.E., Castes, M., Rondon, A.J., Rea, T.H., and Convit, J. (1985). In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental immunology* 60, 241-248.

Moll, H., Flohe, S., and Rollinghoff, M. (1995). Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response. *European journal of immunology* 25, 693-699.

Morgado, F.N., Schubach, A., Rosalino, C.M., Quintella, L.P., Santos, G., Salgueiro, M., and Conceicao-Silva, F. (2008). Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *The British journal of dermatology* 158, 50-58.

Muller, I., Kropf, P., Louis, J.A., and Milon, G. (1994). Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect Immun* 62, 2575-2581.

Muller, I., Pedrazzini, T., Kropf, P., Louis, J., and Milon, G. (1991). Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. *International immunology* 3, 587-597.

Muraro, P.A., Pette, M., Bielekova, B., McFarland, H.F., and Martin, R. (2000). Human autoreactive CD4+ T cells from naive CD45RA+ and memory CD45RO+ subsets differ with respect to epitope specificity and functional antigen avidity. *J Immunol* 164, 5474-5481.

Murray, H.W. (1981). Interaction of *Leishmania* with a macrophage cell line. Correlation between intracellular killing and the generation of oxygen intermediates. *The Journal of experimental medicine* 153, 1690-1695.

Murray, H.W., and Cartelli, D.M. (1983). Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 72, 32-44.

Nacy, C.A., Fortier, A.H., Meltzer, M.S., Buchmeier, N.A., and Schreiber, R.D. (1985). Macrophage activation to kill *Leishmania major*: activation of macrophages for intracellular destruction of amastigotes can be induced by both recombinant interferon-gamma and non-interferon lymphokines. *J Immunol* 135, 3505-3511.

Naderer, T., and McConville, M.J. (2008). The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cellular microbiology* 10, 301-308.

Natarajan, K., Sawicki, M.W., Margulies, D.H., and Mariuzza, R.A. (2000). Crystal structure of human CD69: a C-type lectin-like activation marker of hematopoietic cells. *Biochemistry* 39, 14779-14786.

Nelson, B.H., and Willerford, D.M. (1998). Biology of the interleukin-2 receptor. *Advances in immunology* 70, 1-81.

Netto, E.M., Marsden, P.D., Llanos-Cuentas, E.A., Costa, J.M., Cuba, C.C., Barreto, A.C., Badaro, R., Johnson, W.D., and Jones, T.C. (1990). Long-term follow-up of patients with *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection and treated with Glucantime. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 84, 367-370.

Nylen, S., Maasho, K., Soderstrom, K., Ilg, T., and Akuffo, H. (2003). Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clinical and experimental immunology* 131, 457-467.

Ogg, G.S., Rod Dunbar, P., Romero, P., Chen, J.L., and Cerundolo, V. (1998). High frequency of skin-homing melanocyte-specific cytotoxic T lymphocytes in autoimmune vitiligo. *The Journal of experimental medicine* 188, 1203-1208.

Paliard, X., de Waal Malefijt, R., Yssel, H., Blanchard, D., Chretien, I., Abrams, J., de Vries, J., and Spits, H. (1988). Simultaneous production of IL-2, IL-4, and IFN-gamma by activated human CD4+ and CD8+ T cell clones. *J Immunol* 141, 849-855.

Pamer, E.G. (2004). Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature reviews* 4, 812-823.

Passwell, J.H., Shor, R., Smolen, J., and Jaffe, C.L. (1994). Infection of human monocytes by *Leishmania* results in a defective oxidative burst. *International journal of experimental pathology* 75, 277-284.

Payne, D., Drinkwater, S., Baretto, R., Duddridge, M., and Browning, M.J. (2009). Expression of chemokine receptors CXCR4, CXCR5 and CCR7 on B and T lymphocytes from patients with primary antibody deficiency. *Clinical and experimental immunology*.

Pearson, R.D., and Sousa, A.Q. (1996). Clinical spectrum of Leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 22, 1-13.

Pirmez, C., Cooper, C., Paes-Oliveira, M., Schubach, A., Torigian, V.K., and Modlin, R.L. (1990). Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J Immunol* 145, 3100-3104.

Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceicao-Silva, F., and Modlin, R.L. (1993). Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest* 91, 1390-1395.

Pokkali, S., and Das, S.D. (2009). Augmented chemokine levels and chemokine receptor expression on immune cells during pulmonary tuberculosis. *Human immunology* 70, 110-115.

Reddy, M., Eirikis, E., Davis, C., Davis, H.M., and Prabhakar, U. (2004). Comparative analysis of lymphocyte activation marker expression and cytokine secretion profile in stimulated human peripheral blood mononuclear cell cultures: an in vitro model to monitor cellular immune function. *Journal of immunological methods* 293, 127-142.

Reed, S.G., Coler, R.N., and Campos-Neto, A. (2003). Development of a leishmaniasis vaccine: the importance of MPL. *Expert review of vaccines* 2, 239-252.

Reiner, S.L., and Locksley, R.M. (1995). The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annual review of immunology* 13, 151-177.

Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O., and Carvalho, E.M. (1998). Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica* [et al 31, 143-148.

Ritter, U., and Osterloh, A. (2007). A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental leishmaniasis. *Medical microbiology and immunology* 196, 51-59.

Rocha, P.N., Almeida, R.P., Bacellar, O., de Jesus, A.R., Filho, D.C., Filho, A.C., Barral, A., Coffman, R.L., and Carvalho, E.M. (1999). Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of infectious diseases* 180, 1731-1734.

Ruiz, J.H., and Becker, I. (2007). CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite immunology* 29, 671-678.

Russo, D.M., Chakrabarti, P., and Higgins, A.Y. (1999). *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8(+) cytotoxic effectors. *Experimental parasitology* 93, 161-170.

Sakaguchi, S. (2004). Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annual review of immunology* 22, 531-562.

Salgame, P., Abrams, J.S., Clayberger, C., Goldstein, H., Convit, J., Modlin, R.L., and Bloom, B.R. (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science (New York, NY)* 254, 279-282.

Sallusto, F., Kremmer, E., Palermo, B., Hoy, A., Ponath, P., Qin, S., Forster, R., Lipp, M., and Lanzavecchia, A. (1999). Switch in chemokine receptor expression upon TCR stimulation reveals novel homing potential for recently activated T cells. *European journal of immunology* 29, 2037-2045.

Salmeron, A., Borroto, A., Fresno, M., Crumpton, M.J., Ley, S.C., and Alarcon, B. (1995). Transferrin receptor induces tyrosine phosphorylation in T cells and is physically associated with the TCR zeta-chain. *J Immunol* 154, 1675-1683.

Sancho, D., Gomez, M., and Sanchez-Madrid, F. (2005). CD69 is an immunoregulatory molecule induced following activation. *Trends in immunology* 26, 136-140.

Santamaria-Babi, L.F. (2004). CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol* 14, 13-18.

- Santis, A.G., Campanero, M.R., Alonso, J.L., Tugores, A., Alonso, M.A., Yague, E., Pivel, J.P., and Sanchez-Madrid, F. (1992). Tumor necrosis factor-alpha production induced in T lymphocytes through the AIM/CD69 activation pathway. *European journal of immunology* 22, 1253-1259.
- Schlein, Y. (1993). Leishmania and Sandflies: interactions in the life cycle and transmission. *Parasitology today (Personal ed* 9, 255-258.
- Seneviratne, S.L., Black, A.P., Jones, L., di Gleria, K., Bailey, A.S., and Ogg, G.S. (2007). Interleukin-4 promotes human CD8 T cell expression of CCR7. *Immunology* 120, 66-72.
- Seneviratne, S.L., Jones, L., Bailey, A.S., Samuel, R.V., Black, A.P., and Ogg, G.S. (2005). Interleukin-4 induced down-regulation of skin homing receptor expression by human viral-specific CD8 T cells may contribute to atopic risk of cutaneous infection. *Clinical and experimental immunology* 141, 107-115.
- Seneviratne, S.L., Jones, L., King, A.S., Black, A., Powell, S., McMichael, A.J., and Ogg, G.S. (2002). Allergen-specific CD8(+) T cells and atopic disease. *J Clin Invest* 110, 1283-1291.
- Shi, L., Mai, S., Israels, S., Browne, K., Trapani, J.A., and Greenberg, A.H. (1997). Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. *The Journal of experimental medicine* 185, 855-866.
- Sieling, P.A. (2007). Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. *Immunology* 120, 518-525.
- Sigmundsdottir, H., Gudjonsson, J.E., Jonsdottir, I., Ludviksson, B.R., and Valdimarsson, H. (2001). The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clinical and experimental immunology* 126, 365-369.
- Smyth, M.J., Kelly, J.M., Sutton, V.R., Davis, J.E., Browne, K.A., Sayers, T.J., and Trapani, J.A. (2001). Unlocking the secrets of cytotoxic granule proteins. *Journal of leukocyte biology* 70, 18-29.
- Sokolowska-Wojdylo, M., Wenzel, J., Gaffal, E., Lenz, J., Speuser, P., Erdmann, S., Abuzahra, F., Bowman, E., Roszkiewicz, J., Bieber, T., *et al.* (2005). Circulating clonal CLA(+) and CD4(+) T cells in Sezary syndrome express the skin-homing chemokine receptors CCR4 and CCR10 as well as the lymph node-homing chemokine receptor CCR7. *The British journal of dermatology* 152, 258-264.
- Sprent, J. (1997). Immunological memory. *Curr Opin Immunol* 9, 371-379.
- Stenger, S., and Modlin, R.L. (1998). Cytotoxic T cell responses to intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol* 10, 471-477.
- Sun, J., Madan, R., Karp, C.L., and Braciale, T.J. (2009). Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat Med* 15, 277-284.

Sutterwala, F.S., and Mosser, D.M. (1999). The taming of IL-12: suppressing the production of proinflammatory cytokines. *Journal of leukocyte biology* 65, 543-551.

Swain, S.L., Croft, M., Dubey, C., Haynes, L., Rogers, P., Zhang, X., and Bradley, L.M. (1996). From naive to memory T cells. *Immunological reviews* 150, 143-167.

Tedder, T.F., Matsuyama, T., Rothstein, D., Schlossman, S.F., and Morimoto, C. (1990). Human antigen-specific memory T cells express the homing receptor (LAM-1) necessary for lymphocyte recirculation. *European journal of immunology* 20, 1351-1355.

Teraki, Y., Hotta, T., and Shiohara, T. (2000). Increased circulating skin-homing cutaneous lymphocyte-associated antigen (CLA)+ type 2 cytokine-producing cells, and decreased CLA+ type 1 cytokine-producing cells in atopic dermatitis. *The British journal of dermatology* 143, 373-378.

Testi, R., Pulcinelli, F., Frati, L., Gazzaniga, P.P., and Santoni, A. (1990). CD69 is expressed on platelets and mediates platelet activation and aggregation. *The Journal of experimental medicine* 172, 701-707.

Theodos, C.M., Povinelli, L., Molina, R., Sherry, B., and Titus, R.G. (1991). Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. *Infect Immun* 59, 2839-2842.

Trapani, J.A. (2001). Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome biology* 2, REVIEWS3014.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nature reviews* 2, 735-747.

Tuon, F.F., Gomes-Silva, A., Da-Cruz, A.M., Duarte, M.I., Neto, V.A., and Amato, V.S. (2008). Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clinical immunology (Orlando, Fla)* 128, 442-446.

Urban, B.C., and Roberts, D.J. (2003). Inhibition of T cell function during malaria: implications for immunology and vaccinology. *The Journal of experimental medicine* 197, 137-141.

Velten, F.W., Rambow, F., Metharom, P., and Goerdts, S. (2007). Enhanced T-cell activation and T-cell-dependent IL-2 production by CD83+, CD25high, CD43high human monocyte-derived dendritic cells. *Molecular immunology* 44, 1544-1550.

von Andrian, U.H., and Mackay, C.R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *The New England journal of medicine* 343, 1020-1034.

Vukmanovic-Stejic, M., Vyas, B., Gorak-Stolinska, P., Noble, A., and Kemeny, D.M. (2000). Human Tc1 and Tc2/Tc0 CD8 T-cell clones display distinct cell surface and functional phenotypes. *Blood* 95, 231-240.

Waldmann, T.A., Goldman, C.K., Robb, R.J., Depper, J.M., Leonard, W.J., Sharrow, S.O., Bongiovanni, K.F., Korsmeyer, S.J., and Greene, W.C. (1984). Expression of interleukin 2 receptors on activated human B cells. *The Journal of experimental medicine* 160, 1450-1466.

Warnock, R.A., Askari, S., Butcher, E.C., and von Andrian, U.H. (1998). Molecular mechanisms of lymphocyte homing to peripheral lymph nodes. *The Journal of experimental medicine* 187, 205-216.

Whittaker, S. (2006). Biological insights into the pathogenesis of cutaneous T-cell lymphomas (CTCL). *Seminars in oncology* 33, S3-6.

Zerpa, O., Ulrich, M., Blanco, B., Polegre, M., Avila, A., Matos, N., Mendoza, I., Pratlong, F., Ravel, C., and Convit, J. (2007). Diffuse cutaneous leishmaniasis responds to miltefosine but then relapses. *The British journal of dermatology* 156, 1328-1335.

Ziegler, E., Oberbarnscheidt, M., Bulfone-Paus, S., Forster, R., Kunzendorf, U., and Krautwald, S. (2007). CCR7 signaling inhibits T cell proliferation. *J Immunol* 179, 6485-6493.

ANEXO A: DADOS CLÍNICOS DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA ESTUDADOS

Pacientes	Sexo	Idade	N. Lesão	Tm. da Lesão	T. da Lesão (dias)	T. Monte Negro	Biópsia
1	F	44	1	1,5 X 1,5	30	Positivo	
2	M	79	4	VARIOS	30	Positivo	
3	F	42	1	1,5 X 2,0	30	Positivo	
4	M	62	1	0,5 X 0,7	30	Positivo	
5	M	9	3	0,7 X 0,7	30	Positivo	
6	F	27	1	0,7 X 0,7	30	Positivo	
7	M	24	1	1 X 1	30	Positivo	
8	M	37	1	1,5 X 0,5	30	Positivo	Sim
9	F	12	13	0,5 X 1,0	30	Positivo	Sim
10	M	49	3	2 X 1	60	Positivo	Sim
11	M	35	1	4,0 X 3,0	30	Positivo	Sim
12	M	19	2	1 X 1,5	30	Positivo	Sim
13	M	25	1	1,0 X 2,0	30	Positivo	
14	M	21	1	1,5 X 1,5	60	Positivo	Sim
15	M	15	2	3,0 X 2,5	60	Positivo	Sim
16	M	44	1	5,0 X 1,0	30	Positivo	Sim
17	M	50	1	3,0 X 2,0	60	Positivo	Sim
18	F	40	4	1,0 X 1,0	30	Positivo	Sim
19	M	33	2	NSI	30	Positivo	Sim
20	M	16	1	1,5 X 1,8	60	Positivo	Sim
21	M	26	2	3,5 X 1,72	90	Positivo	Sim
22	M	16	1	1,0 X 1,0	30	Positivo	Sim
23	M	34	4	1,0 X 1,0	30	Positivo	
24	M	17	1	4,3 X 3,5	30	Positivo	
25	M	27	2	0,5 X 1	30	Positivo	
26	M	41	1	1,0 X 1,0	60	Positivo	Sim
27	F	50	1	0,5 X 0,5	90	Positivo	
28	F	33	2	1,5 X 1,0	30	Positivo	Sim
29	M	56	1	2,0 X 3,0	30	Positivo	
30	M	19	1	2,0 X 2,5	60	Positivo	
31	F	14	2	2,2 X 1,5	30	Positivo	
32	M	24	1	1,0 X 1,3	30	Positivo	
33	M	24	1	3,0x1,0	30	Positivo	
34	M	14	10	4,0 X 1,5	30	Positivo	
35	M	42	1	3,0 X 3,5	30	Positivo	Sim
36	M	43	1	2 X 0,5	60	Positivo	Sim
37	M	7	1	NSI	90	Positivo	Sim
38	M	15	5	4 X 2	30	Positivo	Sim
39	M	21	NSI	NSI	15	Positivo	Sim
40	F	24	1	2,0 X 2,0	30	Positivo	Sim
41	M	19	3	NSI	30	Positivo	Sim
42	M	59	2	5,5 X 3,0	60	Positivo	Sim
43	M	7	1	2 X 2,5	60	Positivo	Sim

ANEXO B: ANTICORPOS UTILIZADOS NAS ANÁLISES DE CITOMETRIA DE FLUXO

ANTICORPO	CLONE	CROMÓGENO
CD4- PE	RPA-T4	Phicoeritrina
CD4-FITC	RPA-T4	Isoticianiano de fluoresceína
CD3-PE	UCHT1	Phicoeritrina
CD8-PE-Cy TM 5	RPA-T8	Phicoeritrina- Cy5
CD25-FITC	M-A251	Isoticianiano de fluoresceína
CD71-FITC	M-A712	Isoticianiano de fluoresceína
CD45RO-PE	UCHL1	Phicoeritrina
CD62L-FITC	Dreg 56	Isoticianiano de fluoresceína
CCR7-PE	3D12	Phicoeritrina
CLA- FITC	HECA-452	Isoticianiano de fluoresceína
CD19-FITC	HIB19	Isoticianiano de fluoresceína
CD56-PE	B159	Phicoeritrina
CD11b/Mac-1 -PE-Cy TM 5	ICRF44	Phicoeritrina- Cy5
CD11c-PE	S-HCL-3	Phicoeritrina
IFN- γ - PE	4S.B3	Phicoeritrina
IL-10 -PE	JES3-19F1	Phicoeritrina
GRANZIMA B	GB11	Phicoeritrina

ANEXO C: FICHA CLÍNICO- EPIDEMIOLÓGICA



PROGRAMA DE CONTROLE DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
 LT Jequiçá
 FICHA CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICA

DATA DE PREENCHIMENTO: ___/___/___

N^o DE REGISTRO: _____**1. IDENTIFICAÇÃO:**

Nome: _____ Apelido: _____

Data Nascimento: ___/___/___ Sexo: ___ Cor: ___ Ocupação: _____ Peso: _____

Local de Nascimento: _____

Local Provável de contágio: _____

Residência atual: _____

Tempo de moradia: _____ Residência(s) anterior(es): (1) Sim (2) Não (9) NSI

Onde: _____ Há quanto tempo: _____ meses

Local onde reside (ou de contágio) tem alguém com LT: (1) Sim (2) Não (9) NSI

2. ANTECEDENTES MÉDICOS

Já teve LT (1) Sim (2) Não (9) NSI

Foi tratado (1) Sim (2) Não (9) NSI

Natureza do tt^o (1) Tópico (2) Sistêmico (9) NSI

Droga Usada: _____ Dose: _____

Ano de tt^o: _____ Onde foi tratado: _____**3. ANTECEDENTES FAMILIARES**

Número de familiares em casa (Excluir paciente): _____

Número de familiares que tiveram LT: _____

Nome: _____ Idade: _____

Ano da doença: _____ Localidade: _____

Grau de parentesco com o caso index: _____

Nome: _____ Idade: _____

Ano da doença: _____ Local: _____

Grau de parentesco com o caso index: _____

4. SITUAÇÃO EPIDEMIOLÓGICA

Localização do domicílio: (1) área urbana (2) área rural (3) Peri-urbana (9) NSI

Quantas pessoas residem no domicílio: _____ N^o de cômodos: _____

Instalações sanitárias: (1) Sim (2) Não (9) NSI

Caso sim:

(1) Dentro domicílio (2) Fora do domicílio (3) Fora domicílio/ comum vários domicílios (9) NSI

Cria animais no quintal (1) Sim (2) Não (9) NSI

Caso sim, qual (is):

Galinha (1) Sim (2) Não (9) NSI

Cavalo (1) Sim (2) Não (9) NSI

Porcos (1) Sim (2) Não (9) NSI

Cabras (1) Sim (2) Não (9) NSI

Carneiros (1) Sim (2) Não (9) NSI

Jumentos (1) Sim (2) Não (9) NSI

Cães (1) Sim (2) Não (9) NSI

Outros (1) Sim (2) Não (9) NSI

Qual (is):

Renda familiar mensal () < 1 () 1 a 2 () 3 a 4

5. HISTÓRIA CLÍNICA

6. EXAME FÍSICO**a) Presença de Linfonomegalia:** (1) Sim (2) NãoCaso sim, localização: (1) EpitrocLEAR (2) Tibial posterior (3) Axilar (4) Crural (5) Cervical
(6) Suboccipital (7) Submandibular (8) Inguinal (9) Outros

Tamanho do gânglio (cm) _____

b) Lesão de Pele: (1) Sim (2) NãoN^o total de lesão(ões): _____ Localização(ões): *marcar na figura abaixo*N^o lesão(ões) ulceradas: _____ Tamanho (cm): *marcar na figura abaixo*

Duração: _____ (meses)

Característica(s): (1) úmida (2) vegetante (3) mínima (4) seca (5) disseminada (6) verrucoíde (7) outras

N^o de lesão(ões) não ulcerada(s): _____ Duração: _____ (meses)

Localização(ões): _____ Tamanho (cm): _____

Cicatriz antiga: (1) Sim (2) Não (9) NSI N^o total: _____ Duração _____ (meses)

Localização(ões): _____ Tamanho (cm): _____

7. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL**a) EXAMES IMUNOLÓGICOS**

IDRM		SOROLOGIA: ANO(S)			
Data	Leitura	I.F.I./Data	Título	ELISA/Data	N. Absorbância

b) BIÓPSIA: (1) Sim (2) Não

Laudo Anexo: (1) Sim (2) Não

8. TRATAMENTO

Terapêutica _____

atual:

Droga Empregada: _____

Dosagem Diária: _____

Data Início: _____

Data Término: _____

9. EFEITOS COLATERAIS

EFEITOS ADVERSOS	DIAS DE TRATAMENTO				
	Dia 10	Dia 20	Dia 30	Dia 40	1 mês pós-tto
ARTRALGIA					
MIALGIA					
DOR ABDOMINAL					
ANOREXIA					
NAUSEAS					
VÔMITOS					
PALPITAÇÕES					
FEBRE					
OUTROS					

ANEXO D: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, fui informado que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é avaliar o papel das células T CD8 na leishmaniose cutânea localizada. A parte neste estudo prece a doação de sangue e biópsia tecidual, a que serei submetido.

Os resultados deste estudo serão discutidos comigo e considerados confidenciais. Os resultados divulgados na forma de comunicação científica, não permitindo a identificação individual dos participantes.

Dr. _____ discutiu comigo esta informação e se colocou a disposição para responder. Se eu tiver novas perguntas poderei contatá-lo pelo telefone _____.

Minha participação nesse estudo é inteiramente voluntária e sou livre para me recusar a participar do estudo, sem afetar os cuidados médicos que devo receber. Recebi uma copia deste formulário e tive oportunidade de ler com cuidado.

Pelo presente, consisto em voluntariamente em participar deste estudo, permitindo que os procedimentos descritos acima sejam realizados em mim.

Ass. Voluntário

Data: ___/___/___