

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO DE PESQUISA EVANDRO CHAGAS
MESTRADO EM PESQUISA CLÍNICA EM DOENÇAS
INFECCIOSAS

REGINA PEREIRA CARVALHO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS T
REATIVOS À *LEISHMANIA* NA RESPOSTA IMUNE
DURADOURA EM PACIENTES CURADOS DE
LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

Rio de Janeiro
2010

**Caracterização fenotípica de linfócitos T reativos à
Leishmania na resposta imune duradoura em pacientes
curados de leishmaniose cutânea**

REGINA PEREIRA CARVALHO

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do Instituto de Pesquisa Evandro Chagas para obtenção do grau de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Dr. Manoel Paes Oliveira Neto e Dra. Alda Maria da Cruz.

Rio de Janeiro
2010

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

C331

Carvalho, Regina Pereira.

Caracterização fenotípica de linfócitos T reativos à *Leishmania* na resposta imune duradoura em pacientes curados de leishmaniose cutânea / Regina Pereira Carvalho. – Rio de Janeiro, 2010.

xii, 81f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas, Pós-graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, 2010.

Bibliografia: f. 62-72

1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Resposta imune celular. 3. Ativação celular. 4. Memória imunológica. I. Título.

CDD 616.9364

REGINA PEREIRA CARVALHO

**Caracterização fenotípica de linfócitos T reativos à *Leishmania*
na resposta imune duradoura em pacientes curados de
leishmaniose cutânea**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação do
Instituto de Pesquisa Evandro Chagas para obtenção do grau
de Mestre em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas.

Orientadores: Dr. Manoel Paes Oliveira Neto.

Dra. Alda Maria da Cruz.

Aprovada em 25 / 02 / 2010.

BANCA EXAMINADORA:

Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto (Presidente)

Doutora em Imunologia

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Dra. Roberta Olmo Pinheiro

Doutora em Ciências Biológicas (Biofísica)

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

Dr. Kenneth John Gollob

Doutor em Imunologia e Microbiologia

Instituto de Ciências Biológicas – UFMG

SUPLENTE E REVISOR:

Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos

Doutor em Biologia Parasitária

Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz

AGRADECIMENTOS:

Agradeço à Deus por ter me iluminado e ter possibilitado as oportunidades que surgiram na minha vida até hoje. Agradeço também por Ele ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho como a minha família e os meus amigos.

Aos meus pais João e Vera por todo o amor incondicional e apoio emocional e financeiro. Se eu cheguei até aqui, foi porque vocês fizeram tudo que podiam para eu ter sempre o melhor. Como diz a música: “you were always there for me, pushing me and guiding me always to succeed (...) Because mom (and dad) you always were the perfect fan”.

Aos meus avós Hermínia e Antônio que mesmo não entendendo o que eu faço, são duas pessoas maravilhosas que estão sempre dispostos a me apoiar em tudo que faço. Ao meu avô Bento que vai estar lá no céu torcendo muito por mim na defesa da dissertação.

À Dra. Alda Maria Da-Cruz pela orientação e amizade ao longo de todos esses anos. Agradeço-lhe pela inspiração na minha escolha profissional e pela companhia em momentos muito agradáveis e divertidos. Desde o início, o seu carisma e profissionalismo me conquistaram.

Ao Dr. Manoel Paes Oliveira por aceitar ser meu orientador, pela confiança e por toda ajuda na parte clínica e no atendimento aos pacientes.

Ao Dr. Álvaro Bertho por ter aceitado ser o revisor da minha dissertação, pela disponibilidade e pela ajuda na parte das análises citofluorimétricas durante o trabalho.

Ao doutorando Adriano Gomes que foi praticamente um co-orientador nessa minha caminhada, auxiliando-me em todos os momentos em que fiquei desesperada. Sem esse “anjinho da guarda” na minha vida, esse trabalho não teria sido possível.

À minha “irmãzinha” Giselle Fagundes por toda amizade e por tudo que já dividimos nessa vida: pacientes, armário, comida, viagens, etc... Espero que ainda tenhamos muitos momentos “diferentes” pela nossa frente.

Ao estudante de Iniciação Científica Francisco Dias pela ajuda nos trabalhos de campo e na busca e leitura de prontuários dos pacientes.

À doutoranda Joanna Reis por ser uma amiga incrível e companheira para todas as horas, nos momentos tristes e felizes. Obrigada por toda a ajuda e discussões científicas sobre o meu trabalho.

Ao técnico Alessandro Marins da Plataforma de Citometria/FIOCRUZ por toda a ajuda na parte de aquisição das amostras. Sempre muito prestativo, ele foi essencial em muitas partes do meu trabalho.

À Rosa Plácido e Léa Cysne pela ajuda na parte das culturas de *Leishmania*.

À secretária Rosângela Pelegrino pela ajuda nos assuntos burocráticos. Tenho certeza de que ela me salvou várias vezes.

A todos do LIPMED que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho: Carolina Mendes Aguiar, Raquel Peralva, Joanna Valverde, Ricardo Nogueira, Eduardo Pinto, Luzinei Couto, Nathalia Domingues e Cláudia Covas. Vocês fazem desse laboratório um ótimo e alegre ambiente de trabalho.

À Dra. Suse Dayse Barbosa por ter participado com sugestões durante o desenvolvimento do trabalho, sempre com boas críticas.

Às minhas amigas do mestrado por terem passado o ano intenso de disciplinas ao meu lado. No final, graças a Deus, todo o esforço valeu a pena e nós sobrevivemos à “Estatística” e à “Epidemiologia”.

Ao meu namorado por ter aturado o meu mau-humor e pelas vezes que reclamei de meu cansaço. Além disso, por todas as vezes que o obriguei a ler as coisas que escrevia para que ele corrigisse os erros de português ou de digitação.

Aos pacientes que aceitaram participar do estudo e confiaram na minha pesquisa.

À Suse e ao Marcelo da secretaria da pós-graduação do IPEC pelo suporte e disposição em todas as vezes que precisei.

À FIOCRUZ pelo financiamento durante esses dois últimos anos.

ÍNDICE:

Introdução	1
Justificativa	17
Objetivos gerais e específicos	18
Metodologia	19
Resultados	26
Discussão	52
Conclusões	61
Referências bibliográficas	62
Anexo	73

ÍNDICE DE TABELA/QUADRO:

Quadro 1: Combinação de monoclonais utilizados na fenotipagem de linfócitos T.	23
Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes curados de leishmaniose cutânea avaliados.	27

ÍNDICE DE ESQUEMAS:

Esquema 1: Representação de gráfico em “dot plot” constituídos pelas variáveis tamanho da célula (FSC) e granulosidade da célula (SSC).	24
Esquema 2: Histogramas representativos da análise fenotípica de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ dentro da população de células CD3 ⁺ .	29
Esquema 3: Histogramas representativos da análise fenotípica das moléculas relacionadas à ativação (CD25 e CD69) em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ .	31
Esquema 4: Histogramas utilizados para análise fenotípica da molécula C1.7 (CD244) dentro das subpopulações de células CD8 ⁺ total, CD8 ^{high} e CD8 ^{low} .	43
Esquema 5: Histogramas para análise fenotípica da molécula CD45RO dentro da subpopulação de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ .	45
Esquema 6: Análise citofluorimétrica em gráfico de <i>dot plot</i> da população de células de memória central (T _{MC}) CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ e de memória efetora (T _{ME}) CD45RO ⁺ CCR7 ⁻ nas subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ .	48
Esquema 7: Histogramas para análise fenotípica da molécula antígeno leucocitário cutâneo dentro das subpopulações de linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺ .	50

ÍNDICE DE FIGURAS:

Figura 1: Ciclo da <i>Leishmania sp.</i>	3
Figura 2: Índice de estimulação da resposta proliferativa de linfócitos em pacientes curados de leishmaniose cutânea, após o estímulo <i>in vitro</i> com antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> .	28
Figura 3: Razão entre as células T CD4 ⁺ / T CD8 ⁺ na população de células mononucleares do sangue periférico analisadas <i>ex vivo</i> e após o estímulo <i>in vitro</i> com antígeno de <i>Leishmania</i> .	30
Figura 4: Avaliação do grau de ativação de linfócitos T CD4 ⁺ em resposta ao estímulo por <i>Leishmania</i> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	33
Figura 5: Análise da influência do cultivo <i>in vitro</i> na expressão de CD25 em membrana de linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea.	34
Figura 6: Avaliação do grau de ativação de linfócitos T CD8 ⁺ em resposta ao estímulo por <i>Leishmania</i> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	35
Figura 7: Análise da influência do cultivo <i>in vitro</i> na expressão de CD25 em membrana de linfócitos T CD8 ⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea.	36
Figura 8: Percentagem de células T CD4 ⁺ com a molécula CD69 em células mononucleares do sangue periférico <i>ex vivo</i> e em células estimuladas <i>in vitro</i> com antígeno de <i>Leishmania</i> .	38
Figura 9: Análise da influência do cultivo <i>in vitro</i> na expressão de CD69 em membrana de linfócitos T CD4 ⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea.	39
Figura 10: Percentagem de células T CD8 ⁺ com a molécula CD69 em células mononucleares do sangue periférico <i>ex vivo</i> e em células estimuladas <i>in vitro</i> com antígeno de <i>Leishmania</i> .	41
Figura 11: Análise da influência do cultivo <i>in vitro</i> na expressão de CD69 em membrana de linfócitos T CD8 ⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea.	42
Figura 12: Avaliação da indução da molécula C1.7 (CD244) associada à citotoxicidade por antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> em pacientes curados de leishmaniose de leishmaniose cutânea.	44
Figura 13: Análise do perfil de memória de linfócitos T estimulados com antígeno de <i>Leishmania braziliensis</i> em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	47
Figura 14: Percentual de células de memória central CD45RO ⁺ CCR7 ⁺ e memória efetora CD45RO ⁺ CCR7 ⁻ dentro de células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ em pacientes curados de leishmaniose cutânea.	49
Figura 15: Avaliação da molécula CLA associada à migração celular por antígenos de <i>Leishmania braziliensis</i> em pacientes curados de leishmaniose de leishmaniose cutânea.	51

LISTA DE ABREVIATURAS:

AG-LB: Antígeno de *Leishmania braziliensis*.

AIDS: Síndrome da imunodeficiência adquirida (da sigla em inglês *acquired immune deficiency syndrome*).

APC: Célula apresentadora de antígeno.

BG: Controle negativo (da sigla em inglês *background*).

CD: do inglês *cluster of differentiation*.

CE: Cura espontânea.

CTLA-4: da sigla em inglês *cytotoxic T-lymphocyte antigen 4*.

CD62-L: L-selectina.

CMSP: Célula mononuclear do sangue periférico.

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa.

CLA: Antígeno cutâneo associado à linfócitos (da sigla em inglês *cutaneous leucocyte antigen*).

CONA: Concanavalina A.

CPM: Contagem por minuto.

CTL: Linfócito T citotóxico (da sigla em inglês *cytotoxic T lymphocyte*).

DN: Duplo negativas.

FSC: Dispersão de luz frontal (da sigla em inglês *forward scatter*).

FITC: Isotiocianato de fluoresceína (da sigla em inglês *fluorescein isothiocyanate*).

IDRM: Intradermorreação de Montenegro.

IL-2: Interleucina-2.

IL-4: Interleucina-4.

IL-5: Interleucina-5.

IL-10: Interleucina-10.

IL-12: Interleucina-12.

IL-2R: Receptor de interleucina-2.

IFN- γ : Interferon-gama.

IPEC: Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

IE: Índice de estimulação.

IS: Indivíduos sadios.

LB OU L.BRAZILIENSIS: *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

LC: Leishmaniose cutânea.

LCC: Pacientes curados de leishmaniose cutânea.

LCD: Leishmaniose cutânea-difusa.

LDISS: Leishmaniose disseminada.

LM: Leishmaniose mucosa.

LMC: Leishmaniose mucocutânea.

LPG: Lipofosfoglicano.

LTA: Leishmaniose tegumentar americana.

MHC: Complexo de histocompatibilidade principal (da sigla em inglês *major histocompatibility complex*).

NK: do inglês *natural killer*.

OMS / WHO: Organização Mundial da Saúde / *World Health Organization*

ON: Óxido nítrico (da sigla em inglês *nitric oxide*).

PBS: Solução salina fosfatada tamponada (da sigla em inglês *phosphate buffer solution*).

PCR: Reação em cadeia da polimerase (da sigla em inglês *polymerase chain reaction*).

RPL: Resposta proliferativa de linfócitos.

PE: Ficoeritrina (da sigla em inglês *phycoerythrin*).

PC-5: Ficoeritrina-cianina 5 (da sigla em inglês *phycoerythrin-cyanine 5*).

PC-7: Ficoeritrina-cianina 7 (da sigla em inglês *phycoerythrin-cyanine 7*).

RPL: Resposta proliferativa de linfócitos.

SFB: Soro fetal bovino.

SSC: Dispersão de luz lateral (da sigla em inglês *side scatter*).

TCR: Receptor de células T (da sigla em inglês *T cell receptor*).

T_{MC}: Célula T de memória central.

T_{ME}: Célula T de memória efetora.

TH1: Linfócito T CD4⁺ do tipo 1.

TH2: Linfócitos T CD4⁺ do tipo 2.

TNF- α : Fator de necrose tumoral-alfa (da sigla em inglês *tumor necrosis factor-alfa*).

VLA-4: do inglês *very late antigen*.

Carvalho, R. P. **Caracterização fenotípica de linfócitos T reativos à *Leishmania* na resposta imune duradoura em pacientes curados de leishmaniose cutânea.** Rio de Janeiro, 2010. 81 f. Dissertação [Mestrado em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

RESUMO:

Introdução: A imunidade mediada por células tem um papel importante na resposta imune do hospedeiro à *Leishmania*. Em pacientes com leishmaniose cutânea, a presença de células ativadas tem sido correlacionada positivamente com o tamanho das lesões. Já a atividade citolítica de células T CD8⁺ vem sendo associada ao dano tecidual e à gravidade da forma mucosa. No entanto, não se sabe o perfil fenotípico induzido nas células de indivíduos clinicamente curados quando estes reencontram os antígenos de *Leishmania*. **Objetivo:** Identificar perfis imunológicos associados à cura clínica na leishmaniose cutânea, com foco na análise das características fenotípicas e funcionais de linfócitos T específicos para a *Leishmania*. **Materiais e Métodos:** Foram estudados 26 indivíduos curados de leishmaniose cutânea (LCC) divididos em dois grupos de acordo com o tempo de cura: (i) menor que 2 anos (<2 anos, n=13) e (ii) 2 a 5 anos (2-5 anos, n=13). Como grupo controle, foram utilizados 12 indivíduos saudáveis (IS) sem histórico prévio de leishmaniose. As células mononucleares do sangue periférico foram analisadas *ex vivo* e após cultivo *in vitro* na presença de antígenos de *Leishmania* (Ag-Lb). Foi analisada a expressão de moléculas de superfície relacionadas ao fenótipo dos linfócitos (CD3, CD4 e CD8), ao fenótipo funcional dos linfócitos de memória central (T_{MC}) ou de memória efetora (T_{ME}) - (CCR7 e CD45RO), à ativação (CD69 e CD25), à citotoxicidade (C1.7) e à migração linfocitária (CLA). Essas moléculas foram avaliadas dentro da subpopulação de células T CD4⁺ e T CD8⁺. **Resultados:** A média da razão TCD4⁺/TCD8⁺ nos pacientes LCC foi similar nas células *ex vivo* e nas células estimuladas por Ag-Lb. Nos LCC, houve um aumento significativo do percentual de células CD25⁺ e CD69⁺ em T CD4⁺ e em T CD8⁺ após o estímulo com Ag-Lb. Houve uma correlação negativa entre o tempo de cura e o percentual de células T ativadas pelo antígeno (CD25⁺ e CD69⁺). Nos pacientes LCC, o percentual de linfócitos T_{ME} em CD4⁺ e CD8⁺ aumentou após o estímulo com Ag-Lb, quando comparado com as células *ex vivo*. Já o percentual de células T_{MC} não se modificou. O percentual de células C1.7⁺ dentro de T CD8⁺ e de células CLA⁺ em T CD4⁺ e T CD8⁺ foi similar na análise de células *ex vivo* e após estímulo com Ag-Lb, em pacientes LCC. Nos IS, não foi observado aumento do percentual de células T para nenhuma das moléculas avaliadas, quando comparadas às células *ex vivo* e estimuladas com Ag-Lb. **Conclusão:** À medida que aumenta o tempo de cura clínica, há uma redução de moléculas associadas à ativação tanto em linfócitos T CD4⁺ quanto em T CD8⁺. Esses indivíduos apresentam um aumento de células de ME que poderiam participar no controle dos parasitos caso ocorra uma reinfecção. Além disso, as células expandidas não apresentaram moléculas de superfície relacionadas à citotoxicidade ou migração para a pele. Considerando que os pacientes curados possuem um padrão de resposta imunoprotetor, tal padrão pode ser considerado um parâmetro importante para a seleção de antígenos candidatos para uma vacina.

Palavras-chave: 1. Leishmaniose tegumentar americana. 2. Resposta imune celular. 3. Ativação celular. 4. Memória imunológica.

Carvalho, R. P. **Phenotypic characterization of *Leishmania*-reactive T lymphocytes in immune response of long term cured patients of cutaneous leishmaniasis.** Rio de Janeiro, 2010. 81 f. Master [Science Dissertation in Clinic Research in Infectious Disease] - Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas.

ABSTRACT:

Introduction: The cell-mediated immunity plays an important role in the immune response of the host to *Leishmania*. In cutaneous leishmaniasis patients, the presence of activated cells has been positively correlated with lesion size. The cytolytic activity of T CD8⁺ cells has been associated with tissue damage and the severity of mucosal form. However, the phenotypic profile induced in cells of clinical cured individuals, when they are exposed to *Leishmania* antigens again, is not known. **Objective:** Identify immunological profiles associated with clinical cure in cutaneous leishmaniasis, with emphasis on phenotypical and functional characteristics of *Leishmania*-specific T cells. **Materials and Methods:** In the study, 26 individuals cured from cutaneous leishmaniasis (CCL) were divided in two groups according to the time of cure: (i) less than 2 years (<2 years, n=13) and (ii) from 2 to 5 years (2-5 years, n=13). As the control group, 12 healthy subjects (HS) without previous history of leishmaniasis were used. Peripheral blood mononuclear cells were evaluated *ex vivo* and after *in vitro* culture in the presence of *Leishmania* antigens (Lb-Ag). It was analysed the expression of surface molecules related with lymphocytes phenotype (CD3, CD4 and CD8), functional phenotype of central memory (T_{CM}) or effector memory lymphocytes (T_{EM}) - (CCR7 and CD45RO), activation (CD69 and CD25), cytotoxicity (C1.7) and lymphocyte migration (CLA). These molecules were evaluated within subpopulations of CD4⁺ and CD8⁺ T cells. **Results:** The mean ratio T CD4⁺/T CD8⁺ in CCL patients was similar in *ex vivo* cells and in Lb-Ag stimulated cells. In CCL, there was a significant increase in the percentage of CD25⁺ and CD69⁺ in CD4⁺ and in CD8⁺ T cells after Lb-Ag stimulus. There was a negative correlation between the time of cure and the percentage of T cells activated by the antigen (CD25⁺ and CD69⁺). In CCL patients, the percentage of T_{EM} lymphocytes in CD4⁺ and in CD8⁺ increased after Lb-Ag stimulus, when compared to *ex vivo* cells. The percentage of T_{MC} cells has not altered. The percentage of C1.7⁺ cells within CD8⁺ T cells and CLA⁺ in CD4⁺ and in CD8⁺ T cells was similar to the analysis of *ex vivo* cells and after Lb-Ag stimulus, in CCL patients. In the HS, it was not observed an increase in the percentage of T cells in any of the molecules analysed, when comparing *ex vivo* to Lb-Ag stimulated cells. **Conclusions:** As the time of cure increases, there is a decrease of molecules related to activation in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells. These individuals present an increase in EM cells that could take part in the parasite control in case of reinfection. Moreover, expanded cells have not presented surface molecules related to cytotoxicity or migration to skin. Considering that cured patients have an immunoprotective response profile, such profile should be considered as an important parameter for selection of antigen candidates for the development of a vaccine.

Keywords: 1. American tegumentary leishmaniasis. 2. Cellular immune response. 3. Cellular activation. 4. Immunological memory.

1. INTRODUÇÃO

1.1. EPIDEMIOLOGIA:

As leishmanioses são antropozoonoses que representam um complexo de doenças de importante espectro clínico e diversidade epidemiológica, sendo consideradas um grande problema de saúde pública.

Há cerca de 20 anos, estima-se que as leishmanioses acometeram cerca de 12 milhões de pessoas em todo o mundo. Mais de 350 milhões de pessoas vivem em áreas que apresentam risco iminente de infecção. A distribuição geográfica da leishmaniose é ampla, ocorrendo em 88 países localizados em quatro continentes. Dentre os países considerados endêmicos, 72 deles são países em desenvolvimento. A Organização Mundial da Saúde (OMS/WHO) estima que a incidência anual da doença possa variar de 1,5 a 2 milhões de casos por ano (WHO, 2004).

No Brasil, as regiões com o maior número de casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) são: a região Norte, seguida da região Nordeste e Centro-Oeste. Somente no ano de 2008, 19.542 casos novos foram notificados no Brasil. Levando-se em conta a subestimada notificação dos casos, pode-se admitir que esse número seja ainda maior (SVS/MS, 2007).

Historicamente, as leishmanioses afetavam trabalhadores rurais ou militares em serviço em áreas florestais, principalmente do sexo masculino. Porém, com o fenômeno de urbanização, a epidemiologia da doença vem sendo alterada, ocorrendo nas zonas rurais e urbanas. Quando o homem fixa residência em locais onde há mata residual/remanescente ou em encostas de serras, mantém muitas vezes o hábito de frequentar a floresta adjacente. Neste caso, a adaptação do vetor ao ambiente peridomiciliar ou até mesmo domiciliar propicia a transmissão da *Leishmania* a animais domésticos e ao homem (Pirmez et al, 1988; Falqueto et al, 1991). Adicionalmente, a epidemiologia atual vem mostrando que não há uma diferença de incidência da LTA entre os gêneros e a doença pode estar presente em todas as faixas etárias (Oliveira-Neto et al, 2000).

Em todo o mundo, além da urbanização da doença e do desmatamento de florestas, tem sido observado um agravamento dos casos de leishmanioses devido a vários outros fatores, dentre eles resistência aos medicamentos e imunossupressão do hospedeiro, seja por fatores como subnutrição ou por associação a outras doenças, principalmente a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) (Da-Cruz et al, 2000).

1.2. AGENTE ETIOLÓGICO:

Os agentes etiológicos da leishmaniose pertencem ao Filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Rey, 2008).

Existem várias espécies de *Leishmania*, das quais pelo menos 13 estão associadas à doença humana (Grimaldi, Tesh & McMahon-Pratt, 1989). Na classificação taxonômica das espécies dermatópicas, a proposta por Lainson & Shaw (1987) é atualmente a mais aceita. Nela, as espécies de *Leishmania* são divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*. No Brasil, os parasitos que mais frequentemente produzem lesão tegumentar são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis*.

A *Leishmania* é um parasito intracelular digenético cujo ciclo vital se passa no hospedeiro vertebrado (homem e animais reservatórios) assumindo a forma amastigota e no hospedeiro invertebrado (vetor) sob a forma promastigota. As amastigotas são formas arredondadas ou ovais, com flagelo rudimentar não exteriorizado, que se localizam nos vacúolos parasitóforos de células fagocíticas, principalmente macrófagos. Já as formas promastigotas são alongadas, providas de um longo flagelo livre no pólo anterior da célula e se desenvolvem no tubo digestivo do flebotomíneo (Rey, 2008).

1.3. CICLO DE VIDA DA *LEISHMANIA*:

A transmissão do parasito é mediada pelo flebotomíneo do gênero *Phlebotomus* (no Velho Mundo) e *Lutzomyia* (no Novo Mundo). Estes insetos são pequenos (2 a 3 mm), de coloração acastanhada, pousam com asas elevadas, têm hábitos vespertinos a noturnos e seus vôos são curtos.

Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo alimenta-se de sangue contendo monócitos/macrófagos infectados por amastigotas (**Figura 1**). As amastigotas liberadas dentro do intestino do inseto transformam-se em promastigotas procíclicas e aderem-se ao epitélio. Essas promastigotas procíclicas são pequenas células em forma de elipse, geralmente de 6-8µm de comprimento do corpo, flagelo pequeno e móvel. Tais formas são um estágio multiplicativo responsável pela expansão inicial da população de parasitos no flebotomíneo (Bates & Rogers, 2004).

As promastigotas procíclicas expressam na sua superfície o lipofosfoglicano (LPG) e a metaloprotease de superfície gp63. Ambos os glicoconjugados parecem proteger as promastigotas de enzimas hidrolíticas do intestino do inseto e o LPG também facilita a fixação ao epitélio do intestino do inseto, evitando que as promastigotas sejam excretadas após a digestão do sangue (Descoteaux & Turco, 1999). A virulência é adquirida durante o processo de metaciclo-gênese, no qual as

promastigotas procíclicas transformam-se em promastigotas metacíclicas. Nesse processo, o LPG sofre mudanças em sua estrutura e assim as promastigotas soltam-se do intestino e migram para a porção anterior do trato digestivo (Bates, 2007).

No próximo repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita as promastigotas no hospedeiro vertebrado juntamente com a saliva, que tem sido muito estudada por sua função de suprimir a produção de óxido nítrico por macrófagos e possibilitar assim o desenvolvimento mais rápido da lesão de leishmaniose (Alexander, Satoskar & Russel, 1999). As promastigotas inoculadas no hospedeiro vertebrado invadem, preferencialmente, as células do sistema fagocítico mononuclear e, ao infectar os macrófagos, se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos. Essas formas amastigotas são capazes de sobreviver ao baixo pH e se multiplicar dentro do vacúolo no macrófago, denominado vacúolo parasitóforo (Antoine et al, 1990). Após sucessivas multiplicações do parasito, a célula se rompe liberando as amastigotas no interstício, onde então infectarão macrófagos vizinhos. O ciclo da *Leishmania* se completa quando o hospedeiro infectado é novamente picado por um flebotomíneo e este ingere as formas amastigotas que irão se transformar novamente em promastigotas no intestino do inseto.

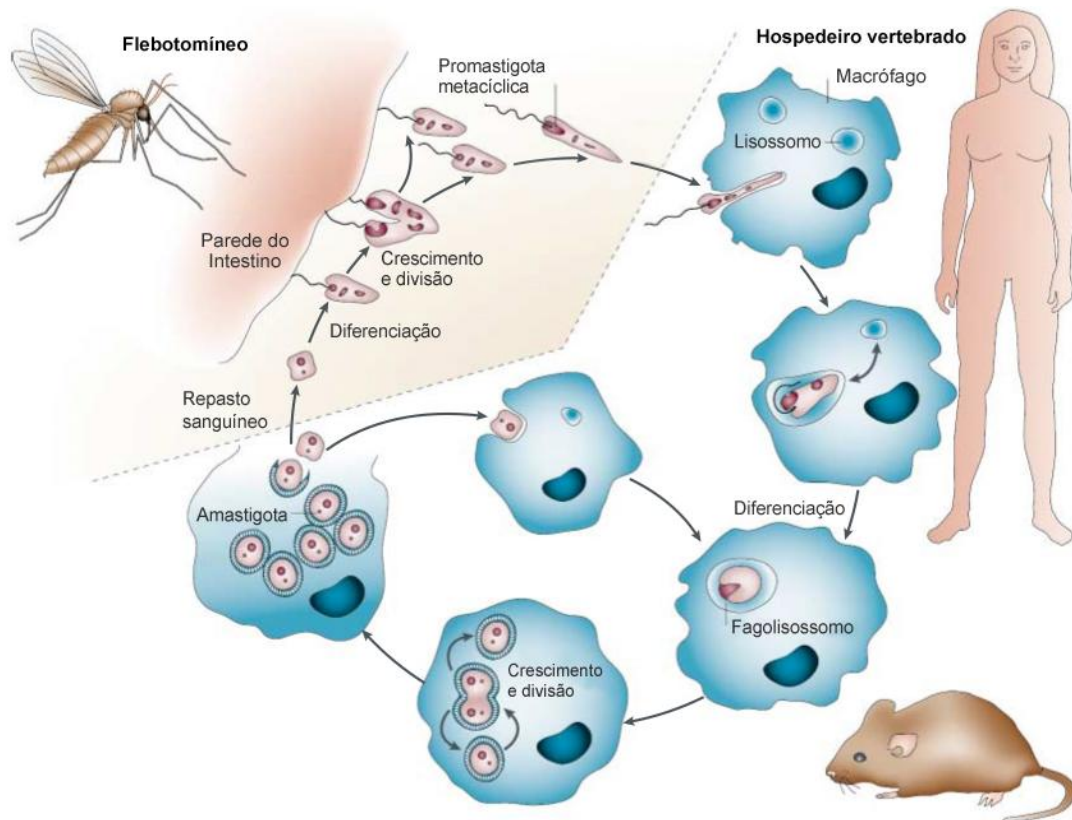


Figura 1- Ciclo da *Leishmania* sp. Traduzido de Sacks & Noben-Trauth, 2002.

1.4. FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA):

As leishmanioses apresentam um amplo espectro de manifestações clínicas, que vão desde infecções assintomáticas ou lesões cutâneas, geralmente benignas e auto-resolutivas, às lesões destrutivas e desfigurantes da forma mucosa. A evolução para as diferentes formas clínicas da leishmaniose vai depender não só da espécie de *Leishmania* que iniciou a infecção, mas também da genética e da resposta imune do indivíduo infectado.

A LTA pode ser dividida em diferentes formas clínicas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM), leishmaniose mucocutânea (LMC), leishmaniose cutânea-difusa (LCD) e leishmaniose disseminada (LDiss) (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

A LC é a forma mais frequente, podendo ser causada por qualquer uma das espécies dermatrópicas de *Leishmania*. O período de incubação é variável, em geral de um a três meses, podendo se estender a até um ano. As lesões localizam-se preferencialmente em áreas descobertas do corpo, como membros superiores e inferiores. A lesão inicial surge no local da picada do inseto vetor e o curso dessa lesão pode ser abortivo ou evoluir com destruição do tecido e formação de úlcera. A lesão cutânea ulcerada única é o tipo de apresentação mais comum. A úlcera cutânea típica é indolor, arredondada ou ovóide, de tamanho variável, com bordas bem delimitadas, elevadas e eritromatosas, fundo granuloso e que sangra facilmente (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

O curso dessas lesões cutâneas tende a ser benigno, curando-se espontaneamente num período de meses/anos ou após uma terapêutica específica. Mais raramente, as lesões cutâneas podem ter um curso progressivo, atingindo dimensões consideráveis e se tornarem casos graves e de difícil tratamento. As infecções secundárias bacterianas ou fúngicas são comuns. Essas lesões, ao regredirem, deixam cicatrizes em geral lisas, brilhantes, finas e sedosas. No entanto, a ocorrência de traumatismo no local da cicatriz pode propiciar a reativação da infecção e isso ocorre provavelmente devido à manutenção de parasitos nestes locais (Schubach et al, 1998; Da-Cruz & Pirmez, 2005).

Cerca de 3% dos casos de LC causados por *L. braziliensis* desenvolvem a forma mucosa (Jones et al, 1987). A LM pode resultar em desfiguração devido ao envolvimento de mucosas da cavidade nasal e oral, causando degeneração da cartilagem e dos tecidos moles. Os pacientes, em geral, não tendem a evoluir para uma cura espontânea e a presença de parasitos é escassa. Esta forma clínica é mais resistente ao tratamento e os pacientes tendem a reativar com maior frequência (Da-Cruz & Pirmez, 2005). Essa reativação pode ser resultado da retomada da replicação dos parasitos remanescentes da infecção primária ou de uma nova infecção (Coutinho, Pirmez & Da-Cruz, 2002).

A LMC ocorre quando as lesões mucosas são concomitantes às cutâneas. Neste caso, os parasitos são encontrados com mais facilidade nas lesões mucosas do que na LM, sendo uma forma

com tratamento ocasionalmente difícil (Da-Cruz & Pirmez, 2005). O tempo de duração da doença normalmente é maior do que a LC e menor do que a LM. Enquanto na LC a forma mais frequente é a úlcera única, na LMC, é mais comum o aparecimento de mais de uma lesão cutânea (Oliveira-Neto et al, 2000).

A LCD é causada pela *L. amazonensis* e é caracterizada pela presença de numerosos nódulos não-ulcerados repletos de parasitos. Esses pacientes geralmente são resistentes ao tratamento e a reativação é um episódio frequente. Adicionalmente, essa forma normalmente tem uma longa duração e progressão incontrolável devido à intensa depressão da resposta imunológica específica mediada por células (Da-Cruz & Pirmez, 2005; Convit 1993). Esta forma clínica é um evento muito raro e o primeiro caso autóctone registrado no estado do Rio de Janeiro só foi relatado no ano de 2007, na região de Paraty - RJ (Azeredo-Coutinho et al, 2007).

A LDiss é caracterizada pelo aparecimento de lesões pleomórficas múltiplas papulares, nodulares e/ou acneiformes, com poucos ou nenhum parasito nas lesões. A lesão normalmente inicia-se na forma de uma ou poucas pápulas e rapidamente há o aparecimento de diversas lesões espalhadas por toda a superfície do corpo. Ela difere da forma LCD, pois há a presença de uma resposta imune mediada por células antígeno-específicas, embora ainda seja uma forma de difícil tratamento. O envolvimento dos sítios da mucosa do trato respiratório superior também é bastante comum (Turetz et al, 2002).

Em todas essas formas clínicas, é de extrema importância a realização do diagnóstico precocemente. Em geral, a resposta terapêutica é melhor e mais estável quando as lesões se apresentam em menor tamanho, ou seja, em uma fase inicial da doença (Convit et al, 1993).

1.5. DIAGNÓSTICO DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:

O diagnóstico da leishmaniose deve associar dados clínicos com dados epidemiológicos. O diagnóstico clínico-epidemiológico pode ser complementado por um teste intradérmico de Montenegro (IDRM) positivo, entretanto, a confirmação desse diagnóstico é realizada pela detecção de parasitos nas lesões através de métodos parasitológicos, tendo em vista o número de doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA (SVS/MS, 2007).

A IDRM é um exame imunológico que se fundamenta na visualização de uma resposta de hipersensibilidade celular tardia. Esse teste utiliza proteínas extraídas de formas promastigotas e é realizado através da aplicação subcutânea de 0,1mL desses antígenos de *Leishmania* na face anterior do antebraço. A leitura do teste deve ser feita após 48 horas, sendo considerados positivos aqueles que apresentam diâmetro de endurecimento igual ou superior a cinco milímetros (mm). Esse teste pode auxiliar

no diagnóstico da doença, mas o seu resultado deve ser interpretado com cuidado. Em áreas endêmicas, a IDRM positiva pode ser interpretada como leishmaniose anterior ou mesmo aplicação anterior de antígeno de IDRM, exposição ao parasito sem doença (infecção), alergia ao diluente do teste ou reação cruzada com outras doenças (doença de Chagas, esporotricose, hanseníase virchowiana, tuberculose, cromomicose, entre outras) (Zajtchuk et al, 1989; SVS/MS, 2007).

O diagnóstico da LTA é confirmado quando o parasito é evidenciado nas lesões. Para realização dos testes diagnósticos, deve-se retirar um fragmento de tecido da borda da úlcera. Este fragmento é dividido e há pelo menos quatro procedimentos que podem ser realizados para a demonstração do parasito: (1) Isolamento do parasito em cultura em meio de cultivo bifásico NNN (Neal, Novy e Nicolle), para evidenciar as formas promastigotas; (2) Impressão por aposição (*imprint*) em uma lâmina para posterior coloração pelo Giemsa, para evidenciar as formas amastigotas; (3) Fixação em formol tamponado a 10% para exame histopatológico, para evidenciar as formas amastigotas; (4) Detecção do DNA parasitário por reação em cadeia de polimerase - PCR (Da-Cruz & Pirmez, 2005; Pirmez et al, 1999).

1.6. TRATAMENTO DA LTA E CURA CLÍNICA:

Existem relatos de indivíduos que têm a capacidade de curar espontaneamente as lesões de LTA e esse evento pode demorar de poucos meses até anos (Marsden et al, 1984b). No entanto, estudos sugerem que pacientes que não foram tratados ou que tiveram uma falha terapêutica devido ao abandono ou tratamento irregular apresentam um risco maior de desenvolver a forma mucosa quando comparado com os pacientes que curaram após um tratamento adequado (Marsden et al, 1984a). Desse modo, o tratamento na LTA é uma importante medida de controle para prevenir um posterior desenvolvimento da forma mucosa e uma forma eficaz de curar as lesões cutâneas em um curto período de tempo.

O tratamento para a leishmaniose no Brasil é baseado primariamente na administração do antimonial pentavalente N-metilglucamina (Glucantime® – Rhodia) via intramuscular ou intravenosa. O esquema terapêutico recomendado pela OMS corresponde à administração de 10-20mg/kg/dia (no caso da LC) durante 20 dias e 20mg/kg/dia (no caso da LM) durante o período de 30 dias. Caso haja necessidade, essa série pode ser repetida novamente. Se mesmo assim não houver uma resposta satisfatória ao final do tratamento, utiliza-se uma droga de segunda escolha como a anfotericina B ou pentamidina (Amato et al, 2008; SVS/MS, 2007).

O tratamento com antimonial apesar de ter se mostrado eficaz, apresenta diversas desvantagens. A necessidade de várias aplicações sob administração supervisionada por um longo período de tempo

leva muitas vezes ao abandono do tratamento pelo paciente. Além disso, o antimonial apresenta um alto custo e uma alta toxicidade levando a vários efeitos adversos já conhecidos como: artralgia, náusea, alterações renais e cardíacas, dentre outros (Oliveira-Neto et al, 1997a).

Um estudo realizado em região endêmica para a *L.(V.) braziliensis* no Estado do Rio de Janeiro investigou a possibilidade da redução da dosagem da droga com o objetivo de minimizar os potenciais efeitos adversos. Um estudo comparativo foi realizado utilizando dois regimes diferentes para o tratamento da LC. Os pacientes de LC foram divididos em dois grupos, onde um grupo foi tratado com o regime convencional de antimônio (20mg/kg/dia) e outro, com baixa dose (5mg/kg/dia). Curiosamente, os dois regimes de tratamento foram igualmente eficazes, sendo que o grupo de pacientes que recebeu a baixa dose do antimonial, apresentou um número menor de efeitos adversos (Oliveira-Neto et al, 1997a).

Outro tratamento alternativo que já foi estudado é o tratamento intralesional, onde é realizada a injeção do antimonial diretamente nas lesões. Dos 74 pacientes estudados, 59 (79,7%) tiveram a cura das lesões. Na maioria dos pacientes onde ocorreu a falha terapêutica, as lesões eram localizadas nas extremidades inferiores do corpo. Normalmente, as lesões em membros inferiores possuem uma característica de cura mais difícil, pois estas normalmente são maiores e frequentemente apresentam sinais de infecção bacteriana. Os efeitos adversos relatados neste estudo foram mínimos e a quantidade de antimonial utilizado foi bem inferior quando comparado com a dosagem da droga injetada por via intramuscular, resultando também em uma diminuição do custo da terapia (Oliveira-Neto et al, 1997b).

A avaliação da resposta ao tratamento é baseada em critérios clínicos. O paciente é considerado curado quando ocorre uma epitelização completa no local da lesão, sem sinais de eritemas residuais (Amato et al, 2008; Mattos, 2006). Além disso, deve-se fazer o acompanhamento clínico desses indivíduos curados pelo menos uma vez ao ano durante o período de cinco anos, pois este parece ser o período em que ocorre o maior número de casos de reativação da doença (Zajtchuk et al, 1989; Oliveira et al, 1995). Uma realização constante do exame clínico após a cura ainda é considerada o melhor método para a detecção da reativação da doença ou de desenvolvimento para a forma mucosa (Netto et al, 1990).

1.7. DIFERENCIAÇÃO E ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T:

O controle dos processos de injúria ao organismo do hospedeiro é mediado por uma imunidade inata inicial e pela imunidade adaptativa.

A imunidade inata consiste de mecanismos celulares e bioquímicos que são capazes de serem rapidamente acionados durante as infecções por microrganismos, dada a baixa especificidade. Os principais componentes da resposta imune inata são: (i) barreiras físicas e químicas, como o epitélio e substâncias antimicrobianas produzidas por superfícies epiteliais; (ii) células fagocíticas (neutrófilos e macrófagos) e células NK; (iii) proteínas do sangue, incluindo membros do sistema complemento e outros mediadores da inflamação; (iv) citocinas que regulam e coordenam muitas atividades da imunidade inata (Abbas & Lichtman, 2003).

Os neutrófilos e macrófagos são as principais células presentes na fase inicial da infecção. Os neutrófilos são dominantes nos três primeiros dias de infecção e têm uma vida muito curta de aproximadamente 6-10 horas na circulação. Os macrófagos residentes do tecido também desempenham um papel fundamental na resposta inicial contra os parasitos, através da fagocitose (Von Stebut, 2007). Os macrófagos ativados fundem seus lisossomos aos fagossomas, expondo os microrganismos intracelulares a uma variedade de enzimas lisossômicas. Além disso, eles produzem radicais de oxigênio e óxido nítrico (NO) que auxiliam na eliminação do parasito (Liew, Xu & Chan, 1999). Além dos macrófagos residentes do tecido, existem os macrófagos derivados dos monócitos do sangue periférico que é a segunda população celular a chegar ao sítio inflamatório.

Estudos realizados com *L.major* têm mostrado que este parasito pode ser fagocitado pelo neutrófilo retardando a apoptose desta célula em aproximadamente três dias, de modo que os monócitos/macrófagos possam ser recrutados por quimiocinas. Estes, por sua vez, fagocitam os neutrófilos apoptóticos infectados, que no interior das principais células hospedeiras, impedem a ativação de mecanismos microbicidas do sistema imune (Laskay, Zandbergen & Solbach, 2003; Zandbergen et al, 2004).

Quando a imunidade inata não consegue controlar a infecção e a multiplicação do parasito, o desenvolvimento de uma resposta imune específica passa a desempenhar esse papel. No entanto, esses dois tipos de resposta imune celular não devem ser vistos separadamente. Durante a fase aguda da infecção pelo HIV, por exemplo, as células predominantes nas fases iniciais são as células NK. Posteriormente, pode-se observar uma expansão da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ específicos ao HIV-1. Porém, durante a fase crônica dessa infecção, podem ser encontradas tanto células efectoras NK quanto células T CD8⁺ específicas, mostrando uma co-evolução entre as populações de células efectoras da resposta inata e adaptativa (Alter et al, 2007).

A resposta imune adaptativa pode ser dividida em diferentes fases: reconhecimento do antígeno, ativação dos linfócitos específicos, fase efetora e retorno à homeostase com apoptose de clones efetores e manutenção de células de memória imunológica (Abbas & Lichtman, 2003).

Após a fagocitose dos antígenos por células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente células dendríticas, os mesmos são processados e apresentados via MHC (complexo de histocompatibilidade principal). Estas células os transportam para órgãos linfóides secundários onde as células T virgens encontram-se em maior número, o que facilita o reconhecimento do antígeno pelo clone de linfócito T capaz de reconhecê-lo com alta afinidade. As células T estimuladas pelo antígeno tornam-se ativadas e sofrem modificações que as permitem proliferar e se diferenciar em células efetoras capazes de produzir citocinas e substâncias citotóxicas. Essas células efetoras, saem dos órgãos linfóides e entram na circulação podendo migrar para o sítio de infecção ou inflamação para exercerem suas funções (Abbas & Lichtman, 2003).

A ativação dos linfócitos requer dois sinais distintos. O primeiro sinal para ativação de linfócitos T é promovido pela ligação do receptor de células T (TCR) mais o co-receptor CD4 ou CD8, ao complexo de MHC-II ou MHC-I, respectivamente, da APC. O segundo sinal é promovido por moléculas denominadas co-estimulatórias. Os co-estimuladores mais bem conhecidos são as proteínas relacionadas chamadas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são expressas nas células APC. Esses co-estimuladores B7 têm como receptor, a molécula CD28, presente na superfície da célula T. O CD28 é expresso na superfície das células e, em humanos, é detectado em mais de 95% das células T CD4⁺ e em 50% das células T CD8⁺. A ligação do B7 ao CD28 emite sinais para as células T que induzem a expressão de proteínas anti-apoptóticas, estimulam a produção de fatores de crescimento e outras citocinas como IL-2, promovendo assim a ativação e sobrevivência das células T (Bour-Jordan & Bluestone, 2002; Sharpe & Freeman, 2002).

Uma vez ativadas, as células T virgens expressam uma variedade de proteínas que contribuem para a sustentação ou modificação dos sinais co-estimulatórios que dirigem a expansão clonal e a diferenciação de células. Uma dessas proteínas é o ligante CD40 (CD40L) que se liga à molécula CD40 presente na superfície da APC. A ligação de CD40 ao seu receptor transmite sinais que induzem a expressão de moléculas B7, as quais irão contribuir para a ativação de células T (Grewal & Flavell, 1996). Um segundo receptor para as moléculas B7 é o CTLA-4 (CD152). Ele é estruturalmente homólogo ao CD28 e possui uma maior afinidade pelo ligante B7. Ele não é expresso constitutivamente na superfície da célula, no entanto, é rapidamente regulado positivamente logo após a ativação da célula T. Sua função é inibir a ativação de células T contrabalançando os sinais liberados

pelo CD28, emitindo assim um sinal inibitório às células T ativadas. Desse modo, seu papel envolve o controle das respostas de células T (Bour-Jordan & Bluestone, 2002; Sharpe & Freeman, 2002;).

A proliferação e a diferenciação de células T são orientadas pela IL-2, que é produzida pela própria célula T ativada. A ligação da IL-2 com o seu receptor IL-2R (CD25) de alta afinidade induz uma série de alterações bioquímicas que induz a resposta proliferativa com intuito de expandir o número de células específicas ao antígeno e conseqüente controle do patógeno. A molécula CD25, além de outras moléculas como, por exemplo, o CD69, podem ser utilizadas para caracterizar fenotipicamente os linfócitos em seu estado ativado (Ziegler, Ramsdekk & Aldersonl, 1994; Janeway et al, 2002).

Além das moléculas relacionadas à ativação, também ocorrem mudanças na expressão de moléculas de adesão nas células T efectoras, como por exemplo, a perda da L-selectina (CD62L) de superfície. Adicionalmente, elas expressam a integrina VLA-4 (CD29/CD49d), que lhes permitem a ligação ao endotélio vascular em locais de inflamação. Desse modo, essas células T efectoras, podem então, migrar para os sítios de infecção. Além disso, uma outra molécula de superfície de células T com participação no direcionamento dessas células para a pele é o antígeno cutâneo associado a linfócitos (CLA). O CLA liga-se à E-selectina presente nas células do endotélio vascular ativado, o que permite uma adesão da célula T a esse endotélio e posterior passagem das células T para o tecido infectado (Tapia, Cáceres-Dittmar & Sánchez, 1996).

Durante a fase efetora da resposta imune, linfócitos que foram especificamente ativados pelo antígeno executam funções efectoras que levam à eliminação do antígeno. Existem duas linhagens de linfócitos T, provenientes de um precursor comum, que são caracterizados por apresentarem dois tipos distintos de receptores de células T (TCR), $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$. A maioria das células expressa o receptor $\alpha\beta$. As células T $\alpha\beta$ são divididas em três grupos que são denominados linfócitos T $CD4^+$, linfócitos T $CD8^+$ e linfócitos T $CD4^-CD8^-$ (DN) (Janeway et al, 2002).

As células DN são uma subpopulação minoritária de células T que não expressam a molécula CD4 nem CD8. Dentro dessa população de células T DN, elas podem ser divididas em células T DN $\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$. As células DN foram consideradas o segundo tipo celular mais relevante responsável pela produção de IFN- γ na leishmaniose humana, pois o tipo celular com maior produção são os linfócitos T $CD4^+$. Essas células DN parecem ter um estado de hiper-ativação *ex vivo* (através da expressão da molécula CD69) e de expressão de produção de IFN- γ e TNF- α após cultura por 20h sem adição de estímulo. Após o estímulo com antígeno solúvel de *Leishmania*, as células T DN $\alpha\beta$ apresentam uma alta razão IFN- γ e TNF- α /IL-10, enquanto as células T DN $\gamma\delta$ apresentaram uma alta produção de

IL-10 em relação ao IFN- γ e ao TNF- α . Desse modo, o papel das células T DN $\alpha\beta$ parece estar relacionado com a ativação da atividade leishmanicida e possivelmente na patologia da leishmaniose (se não for regulada), enquanto as células T DN $\gamma\delta$ parecem estar mais relacionadas à regulação dessa atividade (Antonelli et al, 2006; Gollob et al, 2008).

As células T CD4⁺ podem ser subdivididas em duas subpopulações: células T do tipo 1 (Th1) e do tipo 2 (Th2). Vários fatores têm sido apontados como responsáveis pelo padrão de diferenciação das diferentes subpopulações de células T CD4⁺, incluindo a genética do hospedeiro, a natureza do antígeno, o tipo de APC, intensidade do sinal do TCR, dentre outros (Tao et al, 1997; Moser & Murphy, 2000; Gummy, Louis & Launois, 2004). No entanto, as citocinas presentes no ambiente da estimulação têm sido apontadas como o fator essencial na diferenciação. A diferenciação de células T CD4⁺ em Th1 ou Th2 parece ser profundamente influenciada pelas citocinas presentes durante a fase proliferativa inicial da ativação de células T. A presença de citocinas como IFN- γ e IL-2 tende a levar ao desenvolvimento de células Th1. De modo inverso, a presença da IL-4 e IL-5 tende a levar ao desenvolvimento de células Th2 (Sacks & Noben-Trauth, 2002; Gummy, Louis & Launois, 2004).

No modelo murino com infecção por *L. major*, esse modelo Th1/Th2 está bem estabelecido (Scott et al, 1989). Camundongos BALB/c são considerados suscetíveis à infecção pela *L. major*, pois desenvolvem uma resposta com predomínio do tipo Th2. Essas células, incapazes de ativar os macrófagos, não conseguem controlar a multiplicação do parasito. De modo inverso, camundongos C57Bl/6, considerados resistentes, têm o desenvolvimento de células Th1 com produção de IFN- γ , que leva à ativação de macrófagos. Esses macrófagos ativados são ainda capazes de secretar IL-12, que orienta a diferenciação de mais células T CD4⁺ virgens ativadas em células Th1 (Heinzel et al, 1991; Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Já as células T CD8⁺ são polifuncionais, sendo mais comumente conhecidas pelas suas atividades citotóxicas através da liberação de grânulos líticos após o reconhecimento do antígeno na superfície de uma célula-alvo (Almeida et al, 2009). Esses grânulos são lisossomos com pH ácido entre 5,1 e 5,4 secretados por exocitose no local de contato com a célula-alvo. Um dos componentes presentes no grânulo é a perforina, que polimeriza para gerar poros nas membranas das células-alvo. Uma vez que a integridade da membrana das células é destruída, as células morrem rapidamente (Fan & Zhang, 2005). A outra classe de proteínas citotóxicas compreende as chamadas granzimas que são capazes de induzir a apoptose na célula-alvo através da ativação de caspases (Wowk & Trapani, 2004).

1.8. DESENVOLVIMENTO DA RESPOSTA IMUNE DE MEMÓRIA:

Após o controle do patógeno, a maioria dos linfócitos T efetores morre por apoptose, enquanto as células de memória resistem a essa morte celular programada. Essas células de memória têm a capacidade de responder mais rapidamente e mais eficientemente no caso de uma reinfecção. Além disso, as células de memória necessitam de menos requisitos para a ativação e têm o potencial de secretar uma maior diversidade de citocinas, quando comparadas com as células virgens (Dutton, Bradley & Swain, 1998).

As células T de memória podem ser divididas em células de memória central (T_{MC}) ou células de memória efetora (T_{ME}). A identificação dos subtipos de células de memória é definida pela combinação de anticorpos monoclonais específicos. As moléculas associadas à migração celular (CCR7 e CD62L) e à co-estimulação (CD27 e CD28), juntamente com isoformas da molécula CD45 (CD45RA e CD45RO), definem importantes marcadores funcionais de células T virgens, de memória ou efetora (Esser et al, 2003).

A população de células $TCD4^+$ pode ser definida como virgem ($CD45RA^+CD27^+CCR7^+$), memória central ($CD45RA^-CD27^+CCR7^+$) e memória efetora ($CD45RA^-CD27^-CCR7^-$) (Sallusto et al, 1999; Campbell et al, 2001). Similarmente, células T $CD8^+$ podem ser definidas como virgem ($CD45RA^+CD27^+CCR7^+$), memória central ($CD45RA^-CD27^+CCR7^+$), memória efetora ($CD45RA^-CD27^-CCR7^-$) e efetora ($CD45RA^+CD27^-CCR7^-$) (Hamann et al, 1997; Sallusto et al, 1999; Fukada et al, 2002).

As células T_{MC} são caracterizadas por apresentarem moléculas de superfície de membrana ($CCR7^+$) que as direcionam para os órgãos linfóides secundários. Essas células são consideradas células de memória de longa duração, não necessitando de novas exposições a antígenos específicos para garantir sua viabilidade por muito tempo. Sob nova exposição antigênica via célula apresentadora de antígeno (APC), essas células são capazes de responder em grande magnitude com expansão clonal e subsequente diferenciação em células efetoras (Esser et al, 2003; Gollob, Antonelli LRV & Dutra, 2005; Seder & Ahmed, 2003).

Os T_{ME} são linfócitos que, sob novo estímulo específico, rapidamente diferenciam-se em células efetoras. Estas células ao serem ativadas sofrem modificações funcionais e estruturais, passando a apresentar novas estruturas na superfície como o CD25, CD69, integrinas, moléculas relacionadas à migração (CLA), bem como moléculas efetoras (perforina, granzima e citocinas) (Sallusto et al, 1999; Hamann et al, 1997). A resposta imediata destas células pode contribuir para o controle de novas infecções nos sítios de infecção através da secreção de citocinas de ação microbicidas como $IFN-\gamma$ e $TNF-\alpha$ ou pela eliminação das células infectadas pela lise via ação da perforina (Sallusto et al, 1999;

Sobao et al, 2001). Ao contrário das células T_{MC}, essas células requerem um contínuo estímulo com antígeno específico para sua manutenção (Zaph et al, 2004).

No modelo experimental de infecção por *L. major* foi demonstrado que diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ de memória exercem funções distintas na manutenção da resposta imune duradoura frente a *Leishmania* (Zaph et al, 2004).

O melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na memória imunológica, sobretudo sua dependência ou não da permanência de antígenos parasitários, pode contribuir para a avaliação de candidatos vacinais, no que se refere a sua capacidade de induzir uma resposta imune celular protetora de duração prolongada.

1.9. RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA:

Pacientes de LTA têm a capacidade de montar uma reação de hipersensibilidade tardia aos antígenos de *Leishmania* e de induzir a expansão de linfócitos T antígeno-específicos que podem produzir tanto efeitos benéficos como agravantes para o hospedeiro na tentativa de controlar a doença (Mendonça et al, 1986; Saravia et al, 1989). A magnitude das respostas de células T tende a ser maior em pacientes LM quando comparados com pacientes LC (Carvalho et al, 1985).

Na LC, pode ser observada uma positividade ao teste cutâneo *in vivo* (IDRM) e a testes *in vitro*, como a proliferação de linfócitos frente a antígenos de *Leishmania* (Castés et al, 1983). Em pacientes de LC com menos de dois meses de evolução da doença, parece ocorrer uma depressão transitória da resposta Th1 caracterizada pela baixa resposta proliferativa de linfócitos (RPL) e baixa produção de IFN- γ . Esses dados mostram que a modulação da resposta do tipo 1 ocorre durante as fases precoces da infecção (Rocha et al, 1999). No entanto, o que se encontra em fases posteriores da doença é o predomínio de citocinas do tipo 1 e uma resposta específica ao parasito bem modulada. Isso reflete uma tendência à cura espontânea e uma boa resposta ao tratamento. Por isso, a LC pode ser considerada uma doença benigna que, na maioria dos casos, resolve-se mesmo sem um tratamento específico (Da-Cruz & Pirmez, 2005).

Na LCD, observa-se um quadro de anergia celular, com acentuada proliferação dos parasitos e disseminação da infecção. Estes pacientes, na ausência de uma resposta imune celular efetiva contra o parasito, permitem uma multiplicação sem controle do parasito, com aumento do número de lesões e expansão dessas por toda a superfície corporal. A IDRM é normalmente negativa, assim como os testes de proliferação de linfócitos (Castés et al, 1983). Apesar da ausência de respostas celulares específicas, os níveis de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes são altos. O perfil de citocinas da resposta imune nestes casos é predominantemente do tipo 2, com baixa produção de IFN- γ e níveis altos de IL-10.

A resposta insatisfatória ao tratamento deve-se provavelmente à esta ausência de resposta imune específica (Convit et al, 1993).

Na LM, ocorre um exagero das respostas celulares anti-*Leishmania*. Do ponto de vista imunológico, a IDRM é fortemente positiva, com áreas de endureção cutânea significativamente superiores às observadas na LC. A resposta proliferativa de linfócitos é significativamente maior do que as observadas na LC (Castés et al, 1983). Nesta forma clínica, há uma resposta exacerbada do tipo 1, com produção de altos níveis de IFN- γ e TNF- α (Da-Cruz et al, 1996; Bacellar et al, 2002). Embora o IFN- γ e TNF- α possam atuar no controle da multiplicação do parasito, eles também podem estar envolvidos na patogênese da doença quando são produzidos em altos níveis em associação com uma produção relativamente baixa de IL-10, uma citocina capaz de modular a resposta imune (Ribeiro-de-Jesus et al, 1998). Desse modo, altos níveis de IFN- γ , uma atividade citotóxica aumentada associado com uma baixa expressão do receptor de IL-10 podem ser responsáveis pela resposta inflamatória não modulada que é observada na LM (Faria et al, 2005). Embora a resposta imune que se desenvolve na LM não seja capaz de controlar a doença e muito provavelmente seja responsável pelas manifestações clínicas, ela é capaz de conter a multiplicação parasitária, e os parasitos são escassos nas lesões mucosas. Estes pacientes parecem ter um controle do ponto de vista parasitológico, mas não em termos da patologia da doença (Castés, Agnelli & Rondon, 1984).

A LM é uma forma clínica mais suscetível a reativações, quando comparada com a LC. Ainda não se sabe exatamente o que leva um paciente a ter a reativação da doença. No entanto, Tuon e colaboradores (2008) mostraram que a reativação da LM parece ser uma situação imuno-dependente no qual os pacientes que apresentam um alto número de células T CD8⁺ e NK e um baixo número de macrófagos nos tecidos, além de uma alta razão IFN- γ /IL-10, parecem ter um elevado risco de reativação. Por outro lado, pacientes com um padrão de resposta imune modulada no tecido, são capazes de atingirem uma cura clínica mais estável após a terapia. Além disso, nas lesões de LM há uma frequência mais elevada de linfócitos T respondedores à *Leishmania*, bem como níveis mais altos de IL-4, quando comparado com a LC (Conceição-Silva et al, 1990; Pirmez et al, 1993). Alguns estudos também vêm apontando a IL-4 como uma citocina determinante na susceptibilidade da LC humana causada pela *L.braziliensis*. A IL-4 pode ser encontrada em altos níveis durante a fase ativa e estes diminuem após a cura clínica do paciente (Castellano et al, 2009).

Na LDiss pode ser observada uma positividade ao teste cutâneo *in vivo* IDRM e uma variação da resposta ao teste *in vitro* de proliferação de linfócitos frente ao antígeno de *Leishmania*, podendo ser negativo ou positivo (Vieira-Gonçalves et al, 2008). Além disso, esses pacientes parecem ter produção de altos níveis de IFN- γ e de TNF- α e baixa produção de IL-10 e IL-5 em relação aos pacientes LC

(Turetz et al, 2002). Esses resultados sugerem que o tipo de resposta imune do hospedeiro pode predispor a progressão para a forma LDiss após a infecção.

A identificação das características fenotípicas e do papel funcional dos linfócitos induzidos durante o curso da infecção tem auxiliado na compreensão dos perfis imunes associados com a geração da doença e o estabelecimento da cura clínica da leishmaniose, permitindo também apontar diferenças entre as formas clínicas da doença (Bacellar et al, 2002; Da-Cruz et al, 1994; Toledo et al, 2001). Vem sendo demonstrado que existem diferenças no perfil de subpopulações linfocitárias induzidas em diferentes fases da evolução da leishmaniose. A caracterização dos linfócitos T circulantes reativos para *Leishmania* realizada em pacientes de LC mostra que na fase de doença ativa há uma indução preferencial de células TCD4⁺. No entanto, ao final do tratamento, parece haver uma diminuição dessas células T CD4⁺ e um aumento das células T CD8⁺ (Da-Cruz et al, 1994; Toledo et al, 2001). Este fenômeno da diminuição da razão CD4/CD8 parece ocorrer mais tardiamente nos pacientes de LM, sendo observado somente acima de seis meses após o tratamento (Da-Cruz et al, 2002). Desse modo, parece que o processo de cura da leishmaniose está associado com um aumento dessas células T CD8⁺.

Nas lesões de LC e LM podem ser encontrados altos percentuais de células T CD8⁺ (Pirmez et al, 1990). No entanto, em termos funcionais, foi verificado que os pacientes com lesões ativas de LM apresentam maior proporção de células TCD8⁺ que exercem uma alta atividade citotóxica (CTL) sobre macrófagos infectados quando comparado com os casos de LC. Possivelmente esta alta citotoxicidade está associada ao dano tecidual e à gravidade da forma mucosa (Brodszyn et al, 1997). Assim, supõe-se que a exacerbação dos mecanismos de citotoxicidade possa exercer um efeito deletério, levando a destruição dos tecidos.

Ainda, Bertho e colaboradores (2000) mostraram que na LC humana causada por *L.braziliensis*, a doença ativa estaria associada com o aumento da apoptose de linfócitos T CD8⁺ quando comparados com células nas lesões de indivíduos que evoluíram para a cura espontânea. Nestes modelos, parece que a indução de apoptose nestas células levaria a uma inibição de uma imunidade anti-*Leishmania* eficaz, permitindo assim uma propagação do parasito nas células do hospedeiro.

Além da caracterização da resposta imune associada à proteção em pacientes curados após a quimioterapia, alguns estudos buscam avaliar a resposta imune em indivíduos que foram capazes de controlar a infecção e não desenvolveram sintomas da doença (assintomáticos) e em indivíduos que conseguiram controlar a infecção e curar a lesão espontaneamente. A média da razão IFN- γ / IL-10 é similar em indivíduos assintomáticos, nos indivíduos que evoluíram com cura espontânea e pacientes curados de LC. Porém, os indivíduos curados de LM apresentaram uma média da razão maior, ou seja, apresentaram uma alta produção de IFN- γ em relação à IL-10. Isso demonstra que um balanço na

produção dessas citocinas é um parâmetro imunológico associado a um bom prognóstico (Gomes-Silva et al, 2007).

Um estudo de Carvalho et al 1995 mostrou que indivíduos que curaram a LC espontaneamente apresentam uma forte reação à IDR, uma alta resposta proliferativa de linfócitos a antígenos de *Leishmania* e produção de altos níveis de IFN- γ , quando comparados com indivíduos curados de LC após o tratamento. Desse modo, os indivíduos que tiveram CE parecem ter a capacidade de controlar a multiplicação e progressão da doença.

A descrição da resposta imune celular associada à cura em indivíduos capazes de controlar a infecção por *Leishmania* contribui para a definição de parâmetros compatíveis com a resposta imune protetora. Assim, parece ser possível definir o tipo de resposta imune que deve ser preferencialmente induzido por candidatos vacinais para o controle da LTA.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas pela OMS uma das principais doenças tropicais de importância para saúde pública, constituindo um sério agravo às populações sob risco de infecção. Do ponto de vista terapêutico, a maioria dos pacientes apresenta uma resposta favorável ao tratamento, embora ainda não existam parâmetros clínicos bem definidos que certifiquem a cura definitiva e, portanto, que o paciente não apresentará riscos de recidiva ou re-infecção. Por outro lado, os pacientes podem evoluir para formas graves de difícil tratamento como a LM ou mesmo formas cutâneas resistentes aos medicamentos disponíveis. Dessa forma, torna-se necessário o desenvolvimento de táticas mais eficazes para o controle do número de casos da doença. A estratégia mais expressiva para a profilaxia da doença seria o desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger os indivíduos que estiverem em áreas de risco de transmissão do patógeno.

Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na LC e LM durante a fase ativa da doença têm sido identificados, mas pouco se sabe sobre essa resposta imune longo tempo após a cura clínica. O nosso grupo (Da-Cruz et al, 2002; Bittar et al, 2007; Gomes-Silva et al, 2007) vem trabalhando para tentar definir as subpopulações celulares associadas com a cura clínica duradoura da leishmaniose, porém, ainda é necessário estabelecer as características fenotípicas funcionais dessas células. Sabe-se que após a cura clínica, subpopulações de linfócitos T de memória específicos aos antígenos de *Leishmania* são mantidos no sangue periférico (revisto por Gollob, Antonelli & Dutra, 2005). A compreensão dos mecanismos utilizados por essas células frente ao reencontro com os antígenos de *Leishmania* poderia mimetizar o que ocorre nos casos dos pacientes que têm uma reativação da doença ou uma reinfecção.

Diante desta problemática, desenhos de estudos que permitam estabelecer perfis imunológicos associados com a cura e a resposta protetora na LTA são de fundamental importância para a avaliação do controle da doença. A definição destes padrões traz novas perspectivas para definição do prognóstico desses casos e de avaliação da resposta terapêutica após o tratamento, como também pode trazer subsídios para a avaliação de candidatos vacinais.

3. OBJETIVO GERAL

O objetivo geral é identificar o perfil imunológico de pacientes curados de leishmaniose cutânea, com foco na análise das características fenotípicas funcionais de linfócitos T específicos para a *Leishmania*.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar a razão de linfócitos T quanto ao fenótipo CD4 e CD8, visando identificar se essa razão modificou-se após o estímulo *in vitro* em indivíduos com diferentes tempos de cura.
2. Avaliar a capacidade proliferativa de linfócitos frente ao antígeno de *Leishmania*.
3. Estudar as características fenotípicas e funcionais dos linfócitos T respondedores para *Leishmania*, visando identificar o tipo de linfócitos T de memória (central ou efetora) que é primordialmente mantido por longo período de tempo.
4. Identificar se o nível de ativação em resposta aos antígenos de *Leishmania* de linfócitos T específicos que se mantêm na periferia de indivíduos curados de LTA há longo tempo difere daquele observado em pacientes logo após a cura clínica.
5. Determinar se as células TCD8⁺ reativas à *Leishmania* de indivíduos curados de LTA são capazes de expressar moléculas relacionadas à atividade citotóxica.
6. Avaliar se o estímulo por antígenos parasitários aumenta a expressão de moléculas que propiciem o direcionamento dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ para o tegumento.

5. METODOLOGIA

5.1. CASUÍSTICA:

Foram estudados pacientes curados de LC que estão em acompanhamento ambulatorial no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas/FIOCRUZ. Os indivíduos incluídos aceitaram a participação no estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Esse projeto de estudo foi aprovado pelo CEP IPEC (Nº 069/2008).

Todos os pacientes foram tratados anteriormente para leishmaniose e foram considerados curados através da observação clínica. O critério de cura foi definido pela epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e eritema até três meses após a conclusão do esquema terapêutico, segundo recomendações do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2007).

Os pacientes curados de LC foram divididos em dois grupos segundo os tempos de cura. O período de acompanhamento clínico de cinco anos foi estabelecido em função do período de maior probabilidade de reativação da doença (até 5 anos). Desse modo, foram estabelecidos três grupos de estudo:

- (i) Pacientes considerados clinicamente curados há menos de 2 anos (n=13).
- (ii) Pacientes considerados clinicamente curados entre 2 e 5 anos (n=13).
- (iii) Indivíduos sadios, sem histórico prévio de leishmaniose (n=12).

Além da avaliação clínica e imunológica, foram coletadas informações clínicas e epidemiológicas progressas dos pacientes através do levantamento de prontuários. Os dados avaliados foram: idade, sexo, local de moradia, número de lesões durante a fase ativa, tempo de evolução, ocorrência de recidivas, IDRM, área da lesão, esquema terapêutico, tipo de resposta desses pacientes ao tratamento (satisfatório ou insatisfatório) e tempo estimado da cura clínica. O tamanho da IDRM foi expresso em milímetros (mm) no maior diâmetro observado da endureção. O tratamento foi considerado insatisfatório quando notava-se a ausência de cicatrização completa somente com o uso do glucantime sendo necessária a utilização de outro esquema terapêutico adicional ou quando foi necessária a repetição de mais de um ciclo do glucantime. O tempo de cura foi calculado como o intervalo de tempo existente entre a data da primeira avaliação em que o paciente apresentou a cura clínica e a data da avaliação atual, na qual foi coletado o material biológico. A área da lesão foi calculada de acordo com a seguinte fórmula matemática, onde o “D” corresponde ao diâmetro:

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

5.2. PREPARAÇÃO DE ANTÍGENOS DE PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS* PARA OS ENSAIOS DE AVALIAÇÃO DE RESPOSTA IMUNE ESPECÍFICA:

Para a obtenção do antígeno a ser utilizado nos experimentos de cultivo de avaliação de resposta imune específica *in vitro* foram utilizadas formas promastigotas da cepa de referência de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903). As leishmânias foram expandidas em frascos de poliestireno de 25cm² (Techno Plastic Products, Suíça) contendo meio de cultura Schneider (pH 7,2; “Schneider’s insect medium”, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) suplementado com 1,5 mM de L-glutamina (Sigma, EUA), 10 mM de HEPES (Sigma, EUA), antibióticos (200 UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina) e 10% de soro fetal bovino (Sigma, EUA).

Primeiramente foi verificado o melhor dia da cultura para a preparação do antígeno (fase estacionária) por intermédio da curva de crescimento da *Leishmania*. Após cinco dias, a cultura foi centrifugada a 1900 x g, 4°C, 15 minutos, e o precipitado foi lavado com tampão fosfatado (PBS, pH 7.2). Novamente a cultura foi centrifugada a 1900 x g, a 4°C por 15 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o “pellet” foi ressuspensão novamente em PBS para a contagem do número de leishmânias. Essa contagem foi feita a fim de que pudéssemos relacionar o número de promastigotas com a concentração de proteínas.

Em seguida, a suspensão foi submetida a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C, com o objetivo de se obter o antígeno particulado. A lise completa foi confirmada pela ausência de parasitos íntegros na visualização por microscopia óptica. Posteriormente, foi realizada a dosagem de proteína através do método de Lowry (Lowry et al, 1951) e a concentração de antígeno foi ajustada para 1mg/mL em PBS (equivalente a 10⁸ promastigotas/mL). O antígeno, assim preparado, foi aliquotado e conservado a -20°C até o momento de uso.

5.3. COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO:

No momento de admissão do protocolo, os pacientes foram submetidos à avaliação clínica pelo médico assistente e foi coletado um volume máximo de 30 mL de sangue periférico de cada indivíduo em tubos contendo heparina (Becton Dickinson, Frankling Lakes, EUA). Do sangue heparinizado foram obtidas células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) utilizadas para os ensaios *ex-vivo* e *in vitro* (proliferação frente a estímulos e caracterização fenotípica de células reativas a antígenos de *Leishmania*).

5.4. OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSPs):

O sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 com RPMI 1640 suplementado com 2-mercaptoetanol (1mM), L-glutamina (1,5mM), antibiótico (200UI de penicilina e 200µg/mL de estreptomicina) e 10mM HEPES (RPMI suplementado) (Sigma, EUA). As células mononucleares do sangue periférico (CMSPs) foram obtidas por gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1077; Sigma, EUA). Em tubo de 50mL (Techno Plastic Products, Suíça), foi colocada uma proporção 1 ficoll: 2 sangue e este tubo foi centrifugado a 1200 x g por 20 minutos à 20°C, sem freio (Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, EUA). Ao final da centrifugação, houve a formação de um anel contendo as CMSPs e estas células foram coletadas com pipetas Pasteur (Chase Instruments Corp., Tennessee, EUA). Em seguida, as CMSPs foram lavadas duas vezes por centrifugação a 670 x g por 10 minutos a 4°C, com freio.

A partir das células obtidas, foi realizada a contagem das células viáveis em câmara de Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha) utilizando o corante azul de Tripán (Sigma, EUA). A contagem foi feita no microscópio óptico (Carl Zeiss MicroImaging Inc., Thornwood, NY, EUA) em aumento de 40X. Após a contagem as células foram ajustadas para a concentração de 3×10^6 por mL em meio RPMI suplementado e acrescido de 10% de soro humano AB Rh⁺ inativado (RPMI completo) (Sigma, EUA). Essas células foram utilizadas para todos os ensaios imunológicos realizados nesse projeto.

5.5. AVALIAÇÃO DA RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS (RPL) FRENTE A ANTÍGENOS DE *L. BRAZILIENSIS* E MITÓGENOS:

Para avaliação da resposta proliferativa de linfócitos, as CMSPs obtidas através do gradiente de Ficoll-Hypaque foram cultivadas em placa de 96 poços (Corning Incorporated, NY, EUA) em fundo U (3×10^5 células/poço), por 5 dias em estufa de 5% de CO₂ e temperatura de 37°C (General Electric, GE, São Paulo, Brasil). As culturas foram realizadas em triplicata nas seguintes condições: células sem estímulo (controle), células estimuladas como mitógeno Concanavalina-A (1µg/poço) (Sigma, EUA), células com antígeno particulado de *L. braziliensis* (10µg/poço). O volume final do poço foi ajustado para 200µl, com meio RPMI 1640 completo.

No quinto dia de cultura, foi adicionado 0,5µCi/poço de timidina triciada (Amersham International, Amersham, Reino Unido) e as células foram incubadas novamente em estufa de 5% de CO₂ por mais 6 horas, aproximadamente. Ao final, o conteúdo dos poços foi coletado em papel de filtro

(Titertektm, Flow Laboratories, Rockville, Md, EUA) utilizando um multicoletor de células (Cell Harvester, Skatron Instruments, Md, EUA). A incorporação do isótopo foi medida em um contador de radiação beta (TRI-CARB Liquid Scintillator Analyser, Packard Instrument Company, Downers Grove, IL, EUA).

O resultado de proliferação celular foi expresso como contagens por minuto (cpm) e índice de estimulação (IE, média de cpm dos poços estimulados sobre a média da cpm dos poços não estimulados). Foram considerados positivos quando os IEs foram iguais ou superiores a 2,5.

5.6. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DE LINFÓCITOS *EX VIVO* E LINFÓCITOS RESPONDEDORES A ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA*:

As CMSPs foram analisadas tanto *ex vivo* quanto após estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania*.

Para as células estimuladas *in vitro* foram colocadas 3×10^6 células por poço em placa de 24 poços (Nunc, Roskilde, Dinamarca). Para cada paciente, foi utilizado um poço contendo as CMSPs mais antígenos de *L. braziliensis* (Ag-Lb) e um poço contendo apenas as células mononucleares (BG), o controle do ensaio. Essa placa de 24 poços foi mantida por cinco dias em cultura na estufa com atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C (NAPCO, NY, EUA). No quinto dia de cultivo, o conteúdo de cada poço foi coletado e centrifugado a 670 x g por 5 minutos a 4°C. Desse modo, foi obtido o “pellet” contendo as células de interesse.

Os “pellets” formados a partir das células *ex vivo* e a partir das células colocadas em cultura estimuladas com antígeno Lb ou não (BG) foram ressuspensos em 1mL da solução PBS +0,1% azida-sódica (Merck, RJ, BR) + 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, NY, EUA), para o bloqueio de ligações inespecíficas. Após 15 minutos de incubação à 4°C, as células foram distribuídas em minitubos de 1,1mL (Axygen Scientific Inc, CA, EUA) e cada um desses tubos continha entre 2×10^5 e 3×10^5 células. Essas células foram incubadas por 30 minutos à 4°C com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos. Foi analisada a expressão de moléculas de superfície relacionadas ao fenótipo dos linfócitos (CD3, CD4 e CD8 – Beckman Coulter, CA, EUA), ao fenótipo funcional dos linfócitos de memória central -T_{MC} - ou de memória efetora - T_{ME} - (CCR7 e CD45RO - BD Pharmingen, EUA), à ativação (CD69 e CD25 – BD Pharmingen, CA, EUA), à citotoxicidade (C1.7 Beckman Coulter, EUA) e à migração linfocitária (CLA - BD Pharmingen, EUA) (**Quadro 1**).

Quadro 1. Combinação de monoclonais utilizados na fenotipagem de linfócitos T.

Característica fenotípica estudada	Combinação de anticorpos monoclonais
Subpopulação de linfócitos	CD3-PC5 / CD4-FITC / CD8-PE
Ativação	CD4-FITC / CD8-PC5 / CD25-PE / CD69-PC7
Citotoxicidade	CD8-FITC / C1.7-PE
Memória	CD4-FITC / CD8-PC5 / CD45RO-PC7 / CCR7-PE
Endereçamento celular	CD4-PC5 / CD8-PE / CLA-FITC

Após a incubação com os anticorpos monoclonais, as células foram lavadas com PBS + 5% SFB a 670 g por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi desprezado e os “pellets” foram homogeneizados em um agitador mecânico (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA) e fixados com PBS contendo 1% de paraformaldeído. Essas amostras foram posteriormente adquiridas no citômetro de fluxo Cyan (Beckman Coulter, CO, EUA) que pertence à Plataforma de Citometria de Fluxo, núcleo de análise do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, coordenado pela Dra Andrea Henriques Pons e operado pelo técnico Alessandro Marins. Foram adquiridos 20.000 eventos dentro da região de linfócitos em cada tubo contendo amostra de células.

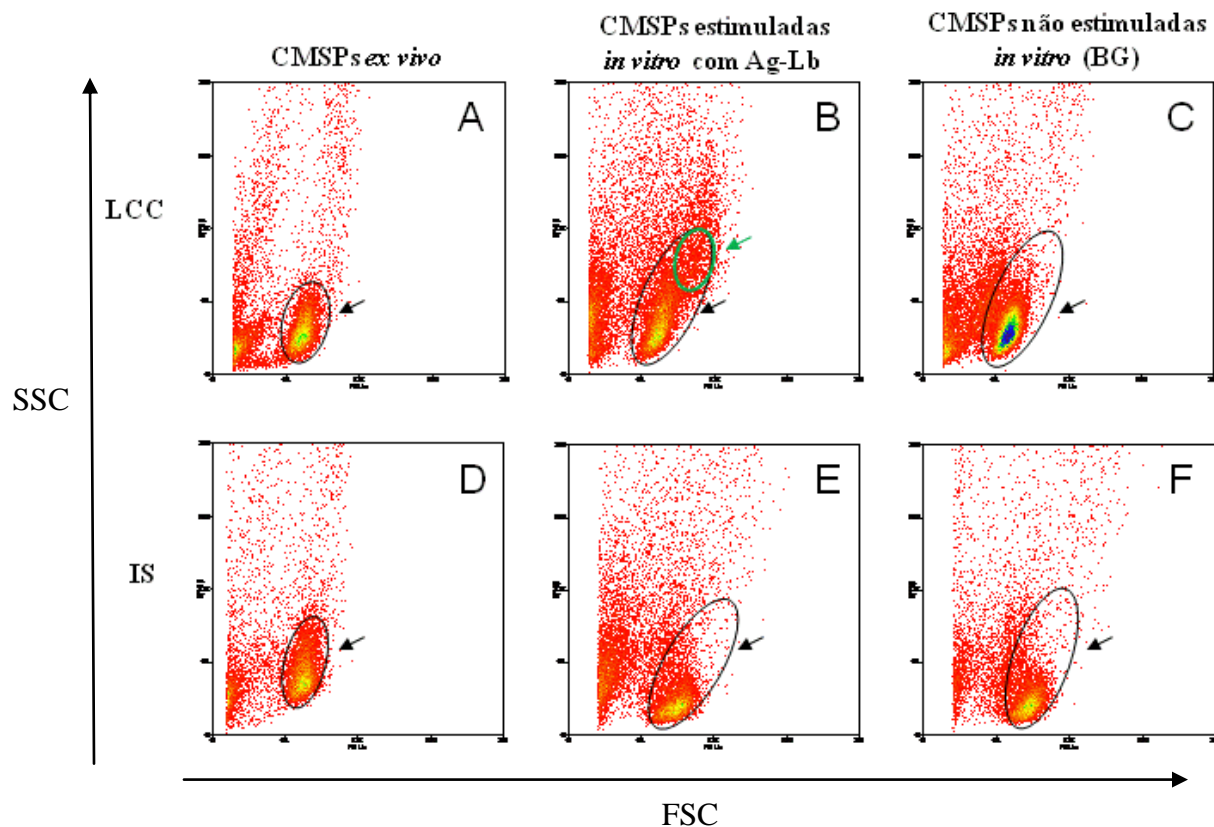
5.7. FORMA DE ANÁLISE DAS MARCAÇÕES FENOTÍPICAS DOS LINFÓCITOS:

Para análise dos dados de citometria de fluxo foi utilizado o programa Summit V4.2 (Beckman Coulter, EUA). A população de linfócitos foi definida a partir da criação de uma região eletrônica em um gráfico de *dot plot* de tamanho (FSC: *forward scatter*) no eixo “x” versus granulidade das células (SSC: *side-scatter*) no eixo “y”. Essa região foi estabelecida a partir de um histograma no qual se considerou uma região de células CD3⁺ (linfócitos T). Todas as análises posteriores foram realizadas nessa mesma região inicial.

Duas regiões eletrônicas foram consideradas para avaliação do percentual de subpopulações de linfócitos. A primeira foi criada para o estudo da população de linfócitos recém obtidos dos pacientes (avaliação *ex vivo*) (setas pretas no **Esquema 1A e 1D**). A segunda foi definida para investigar as subpopulações de linfócitos obtidos após o cultivo *in vitro* na presença ou não de antígenos de *Leishmania*. (setas pretas no **Esquema 1B, 1E, 1C e 1F**). Nos pacientes LCC, após o estímulo *in vitro* com antígeno de Lb, pode-se observar o aparecimento de uma população de linfócitos com maior granulidade e maior tamanho em função do processo de ativação sofrido por essas células, o que justifica a criação de uma região eletrônica maior (seta verde no **esquema 1B**). Essa população não é observada em nenhuma outra análise dos pacientes LCC ou de IS.

Os resultados foram expressos como percentual de células positivas para as moléculas de superfície CD3, CD4 e CD8. Para as moléculas CD25, CD69, C1.7, CD45RO/CCR7 e CLA, os percentuais foram avaliados dentro da subpopulações de células T CD4⁺ e/ou T CD8⁺. Todos os limites de intensidade de fluorescência utilizados para determinar os percentuais positivos e negativos para os diferentes marcadores foram baseados em células não incubadas com anticorpos e ou incubadas com anticorpo isotipo IgG1 FITC-PE-PC5 (Beckman Coulter, EUA).

Não foi possível realizar os conjuntos de marcação completos para todos os pacientes, portanto, há um número desigual de pacientes para cada experimento. Esse número está especificado em cada sessão na parte dos resultados.



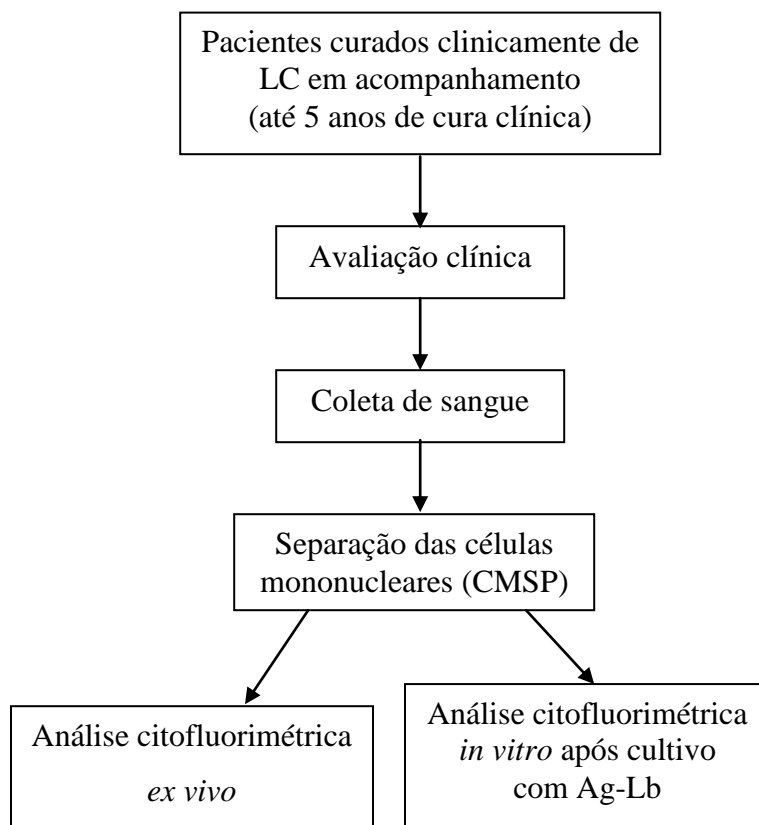
Esquema 1: Representação de gráfico em “dot plot” constituídos pelas variáveis tamanho da célula (FSC) no eixo x e granulosidade da célula (SSC) no eixo y. Cada ponto representa um evento, ou seja, célula mononuclear do sangue periférico (CMSP). Estas foram provenientes de indivíduos saudáveis (IS) e de pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC). As CMSPs foram avaliadas *ex vivo* (A e D) e após cultivo *in vitro* na presença (B e E) ou ausência (C e F) de antígeno de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb). As setas pretas representam as regiões analisadas e a seta verde representa a população de células que tiveram um aumento de tamanho e granulosidade após o cultivo *in vitro* com Ag-Lb.

5.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA:

Os gráficos foram confeccionados utilizando o programa GraphPad Prisma 4 (GraphPad Instat, GraphPad Software, San Diego, Califórnia, EUA). Nesse mesmo programa, foi utilizado o teste estatístico Mann-Whitney (para comparação entre os grupos) e a correlação de Spearman (para correlacionar dados fenotípicos com dados clínicos dos pacientes). As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o intervalo de confiança apresentou valores menores que 0,05.

5.9. FLUXOGRAMA:

A parte do estudo metodológica foi baseada segundo o fluxograma abaixo:



6. RESULTADOS

6.1. DESCRIÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E EPIDEMIOLÓGICAS DOS PACIENTES CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA:

Foi avaliado um total de 26 pacientes curados de leishmaniose cutânea provenientes do estado do Rio de Janeiro. As principais características desse grupo estão representadas na **Tabela 1**. Esse grupo foi composto por 18 homens e 8 mulheres e a idade média \pm desvio padrão foi $39,6 \pm 16,3$ (mediana 38). A maioria desses pacientes residia na região de Campo Grande - RJ (23,1%) e o tempo médio para a cura foi de $28,7 \pm 11,9$ meses (mediana=25).

Esses pacientes curados foram subdivididos em dois grupos, segundo o tempo de cura. O grupo com tempo de cura menor que dois anos (< 2 anos) foi composto por oito homens e cinco mulheres e a idade média foi $40,6 \pm 18,5$ (mediana=42). O grupo de dois a cinco anos de cura clínica (2-5 anos) foi composto de dez homens e três mulheres e a idade média foi $38,6 \pm 14,4$ anos (mediana=36 anos). O tempo de cura médio foi de $18,8 \pm 4,2$ meses (mediana=19 meses; $n=13$) e $38,6 \pm 8,0$ meses (mediana=36 meses; $n=13$) nos grupos < 2 anos e no grupo 2-5 anos, respectivamente.

Foram também obtidos alguns dados clínicos desses pacientes referentes à fase ativa da doença. Esses dados foram compilados a partir de prontuários para a realização de correlações com análises fenotípicas dos pacientes curados. Os pacientes, durante a fase ativa, apresentaram uma enduração média na IDRM de $21,5 \pm 11,0$ mm (mediana=21,0 mm; $n=21$), sendo que apenas um paciente exibiu uma IDRM negativa. Houve o predomínio do aparecimento de apenas uma lesão (18 de 26 pacientes; 69,2%) e a área média da lesão foi $3,0 \pm 2,4$ cm² (mediana=2,4 cm²; $n=17$). O tempo de evolução mais frequente foi de 60 dias (10 de 26 pacientes; 38,5%) e o tratamento mais utilizado foi o glucantime (21 de 24 pacientes; 87,5%). A resposta ao tratamento foi em geral satisfatória (19 de 24 pacientes; 79,2%) e somente cinco pacientes (5 de 24 pacientes; 20,8%) tiveram uma resposta considerada insatisfatória. Desses cinco pacientes, dois utilizaram adicionalmente aplicação intralesional, em um paciente foi utilizada a associação de glucantime com pentamidina e dois pacientes necessitaram da aplicação de três ciclos de glucantime. Não foram observados episódios de reativação da doença durante o período de acompanhamento do estudo em nenhum dos pacientes foram observados.

O grupo controle foi composto por 12 indivíduos sadios sem histórico prévio de leishmaniose e com RPL negativa a Ag-Lb. Esse grupo contém sete homens e cinco mulheres e a idade média \pm desvio padrão foi $26,3 \pm 5,7$ anos (mediana= 25 anos).

Tabela 1: Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC) avaliados.

Características	Frequência (n)	Percentual (%)
Sexo		
Masculino	18 (26)	69,2
Feminino	8 (26)	30,8
Local da residência		
Campo Grande	6 (26)	23,1
Bangu	3 (26)	11,5
Saquarema	2 (26)	7,7
Senador Camará	2 (26)	7,7
Teresópolis	2 (26)	7,7
Nova Iguaçu	2 (26)	7,7
Outros	9 (26)	34,6
Tempo de evolução		
30 dias	6 (26)	23,1
45 dias	1 (26)	3,8
60 dias	10 (26)	38,5
90 dias	3 (26)	11,5
120 dias	4 (26)	15,4
180 dias	2 (26)	7,7
Número de lesões		
1 lesão	18 (26)	69,2
2 lesões	3 (26)	11,5
3 lesões	1 (26)	3,8
4 lesões	2 (26)	7,7
6 lesões	2 (26)	7,7
Tratamento		
Glucantime	21 (24)	87,5
Glucantime + intralesional	2 (24)	8,3
Glucantime + pentamidina	1 (24)	4,2
Resposta ao tratamento		
Satisfatória	19 (24)	79,2
Insatisfatória	5 (24)	20,8

(n) – número de casos avaliados.

6.2. CAPACIDADE PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS APÓS ESTÍMULO COM ANTÍGENOS DE *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* (RPL-LB) DE INDIVÍDUOS COM DIFERENTES TEMPOS DE CURA CLÍNICA:

O índice de estimulação (IE) da RPL-Lb foi positivo em todos os casos curados de leishmaniose cutânea, porém houve uma grande variação entre os indivíduos analisados. Todos os indivíduos sadios (IS) apresentaram uma RPL-Lb com IE abaixo de 2,5 ($1,6 \pm 0,5$; mediana=1,8). A média do IE da RPL-Lb dos casos clinicamente curados há menos de 2 anos ($IE=14,9 \pm 9,3$; mediana=11,7; $n=10$) foi similar ao observado no grupo 2-5 anos ($IE=22,9 \pm 27,1$; mediana=10; $n=9$). Curiosamente, neste último grupo, dois casos apresentaram IE muito elevados (68 e 70,9) (**Figura 2**).

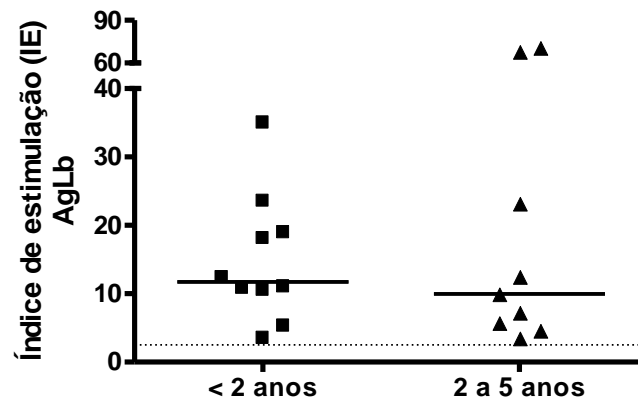


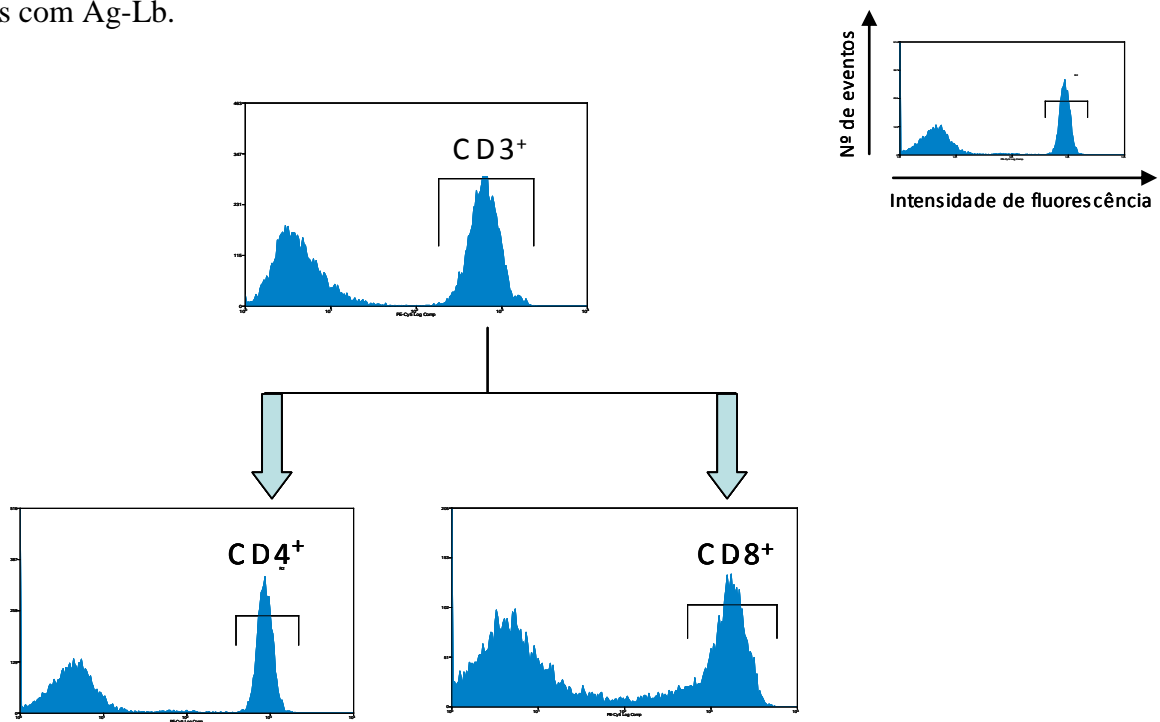
Figura 2: Índice de estimulação (IE) da resposta proliferativa de linfócitos (RPL) em pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), após o estímulo *in vitro* com antígenos de Lb (Ag-Lb). Os pacientes foram divididos em dois grupos: menos de 2 anos após a cura (<2 anos) e mais de 2 anos após a cura clínica (2-5 anos). Os resultados foram expressos como índice de estimulação (IE) e a mediana foi representada por barras horizontais. Cada ponto representa um indivíduo e a linha tracejada representa o valor de corte para a positividade ($IE > 2,5$).

Não foi possível realizar o ensaio de RPL para o paciente que tinha a IDRMs negativa durante a fase ativa e não foram observadas correlações entre os IEs ao Ag-Lb e os dados clínicos dos pacientes.

6.3. ANÁLISE DE LINFÓCITOS T QUANTO AO FENÓTIPO CD4⁺ E CD8⁺ EM PACIENTES CLINICAMENTE CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA EM DIFERENTES TEMPOS APÓS A CURA:

Para avaliar as características fenotípicas dos linfócitos T, analisamos a presença das moléculas de superfície CD4 e CD8 dentro da subpopulação CD3⁺, como indica o **esquema 2**.

Nos indivíduos LCC, o percentual médio de células T CD4⁺ foi de 63%±12,1% (mediana=64,1%, n=25) nas células *ex vivo* e 65,8%±12,2% (mediana=69,6%; n=21) nas células estimuladas com Ag-Lb. O percentual médio de células T CD8⁺ no LCC foi de 33,1%±11,9% (mediana=29,6%; n=25) nas células *ex vivo* e 30,6%±9,6% (mediana=30,9%; n=21) nas células estimuladas com Ag-Lb.



Esquema 2: Histogramas representativos de uma análise fenotípica de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ dentro da população de células CD3⁺ utilizados nos estudos de caracterização do perfil celular de pacientes curados de leishmaniose cutânea e controles saudios. A caracterização fenotípica foi realizada em células do sangue periférico *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb).

Os resultados foram também expressos em uma razão T CD4⁺/T CD8⁺. A média da razão TCD4⁺/TCD8⁺ nos pacientes curados (LCC) foi similar nas células *ex vivo* (2,4%±1,6%; mediana=2,2%; n=25) e nas células estimuladas por Ag-Lb (2,4%±1,1%; mediana=2,1%; n=21) (**Figura 3A**). A análise desses pacientes dividindo-os em subgrupos segundo o tempo de cura mostrou que também não há diferença entre as células *ex vivo* e as células estimuladas por Ag-Lb de indivíduos

com menos de 2 anos de cura (*Ex vivo*: $2,8\% \pm 2\%$; mediana=2,6%; n=12; Ag-Lb: $2,6\% \pm 1,2\%$; mediana=2,2%; n=10) e nem entre as células *ex vivo* e as estimuladas por Ag-Lb de indivíduos com 2 a 5 anos (*Ex vivo*: $1,9\% \pm 0,8\%$; mediana=1,9%; n=13; Ag-Lb: $2,3\% \pm 1,1\%$; mediana=2,1%; n=11) (**Figura 3B**).

Nos indivíduos saudáveis, também não houve diferença estatística entre a razão $T CD4^+ / T CD8^+$ nas células *ex vivo* ($1,6\% \pm 0,7\%$; mediana=1,4%; n=12) e nas estimuladas por Ag-Lb ($2,0\% \pm 0,7\%$; mediana=2,0%; n=9) (**Figura 3A**).

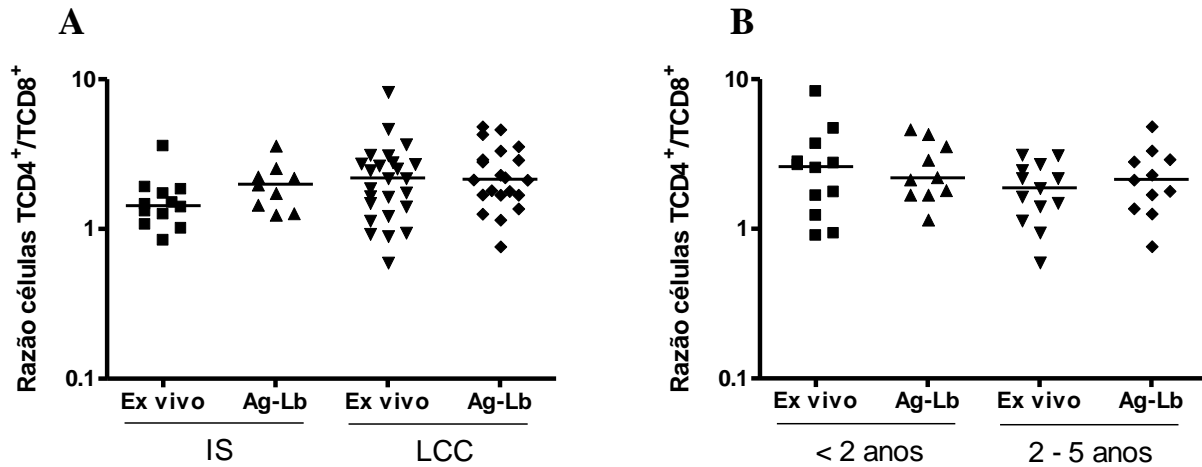


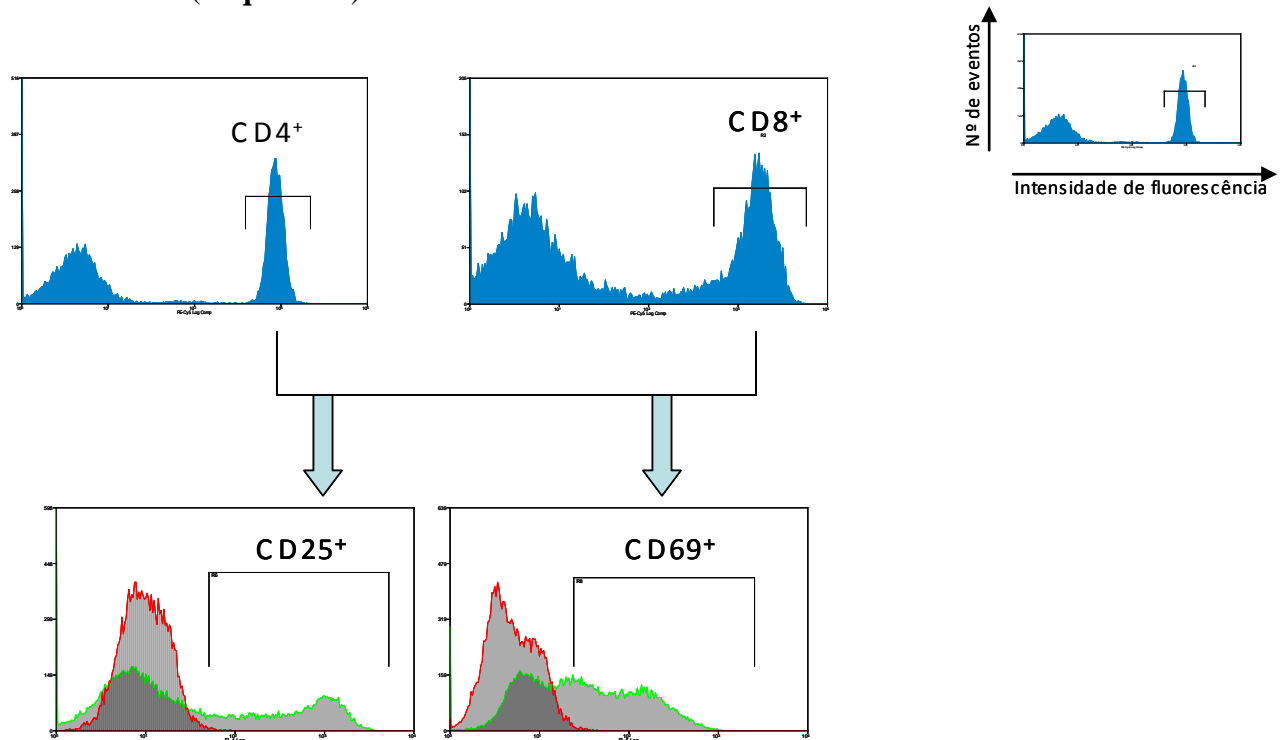
Figura 3: Razão entre as células $T CD4^+ / T CD8^+$ na população de células mononucleares do sangue periférico que foram analisadas *ex vivo* e após o estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Ag-Lb) (**A**) em indivíduos saudáveis (IS) e indivíduos clinicamente curados de leishmaniose cutânea (LCC). (**B**) Os pacientes LCC foram subdivididos em dois grupos: menos de 2 anos após a cura (<2 anos) e mais de 2 anos após a cura clínica (2-5 anos). A mediana foi representada por barras horizontais e cada ponto representa um indivíduo.

Torna-se possível observar que dentre as células estimuladas com antígeno de Lb dos 21 pacientes LCC analisados, todas apresentaram uma razão $T CD4^+ / T CD8^+$ superior a 1, com exceção de um paciente em que esta foi igual a 0,8. Esses resultados estão de acordo com os dados obtidos por Da-Cruz et al 2002, onde pacientes longo tempo (de 1 a 17 anos) após a cura clínica voltam a ter uma proporção maior de células T reativas $CD4^+$ em relação às $CD8^+$.

A partir desses dados, passamos então a estudar a capacidade destas células serem ativadas caso venham reencontrar um antígeno, seja por reativação ou reinfeção, mimetizada por ensaios de estimulação *in vitro*.

6.4. AVALIAÇÃO DO GRAU DE ATIVAÇÃO DOS LINFÓCITOS DE PACIENTES DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA CLINICAMENTE CURADOS EM DIFERENTES TEMPOS DA CURA CLÍNICA:

Para avaliar o grau de ativação das células T, utilizamos como parâmetro de análise a quantificação do percentual de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando na superfície as moléculas CD25 ou CD69 (Esquema 3).



Esquema 3: Histogramas representativos de uma análise fenotípica das moléculas relacionadas à ativação (CD25 e CD69) em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Essas moléculas foram estudadas em células do sangue periférico *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb) em pacientes curados de leishmaniose cutânea e em controles saudios. Em vermelho está representada a região marcada com o isotipo IgG1 e em verde a região positiva para as moléculas analisadas (CD25 ou CD69).

Quando os indivíduos LCC foram avaliados quanto ao percentual de células CD25⁺ em T CD4⁺, observou-se que há um aumento significativo ($p < 0,001$) da ativação linfocitária após o estímulo com Ag-Lb ($31,6\% \pm 19\%$; mediana=29,1%; $n=21$), quando comparado com as células *ex vivo* ($10,8\% \pm 7,3\%$; mediana=8,5%; $n=23$) (**Figura 4A**). Já nos indivíduos saudáveis (IS), os percentuais dessas células foram similares nas análises *ex vivo* ($10\% \pm 4,4\%$; mediana=9,5%; $n=12$) e após estímulo antigênico ($10,7\% \pm 3,5\%$; mediana=10,2%; $n=10$) (**Figura 4A**).

Dentre os pacientes LCC, pode-se observar que o percentual de células T CD4⁺ expressando na membrana a molécula CD25 foi similar nas células *ex vivo*, comparando os indivíduos curados com

menos de 2 anos ($13,3\% \pm 9,2\%$; mediana=9,4%; n=10) e entre 2-5 anos de cura ($8,9\% \pm 5,2\%$; mediana=8,1%; n=13). Porém, após o estímulo com Ag-Lb, houve um aumento significativo ($p < 0,001$) dessas células T CD25⁺ em CD4⁺ tanto no grupo <2 anos ($38,1\% \pm 19,1\%$; mediana=40,9%; n=11) quanto no grupo 2-5 anos ($24,4\% \pm 17,0\%$; mediana=17,2%; n=10). No entanto, esse aumento mostrou-se mais evidente no grupo dos indivíduos com menos de 2 anos de cura (**Figura 4B**). Não foi observada uma correlação significativa entre o percentual de células T CD25⁺ em T CD4⁺ após o estímulo antigênico e o tempo de cura dos pacientes LCC ($r = -0,28$; $p > 0,05$) (**Figura 4C**).

Com o objetivo de avaliar se o aumento da expressão membranar da molécula CD25 nas células foi relacionado ao estímulo antigênico e não consequente à manutenção da cultura *in vitro* por cinco dias, foi utilizado um controle onde as células foram mantidas em cultura sem a adição de nenhum estímulo (BG). As avaliações fenotípicas do BG foram realizadas nas mesmas condições que as análises das células estimuladas com Ag-Lb.

Sendo assim, foi visto que houve um aumento das células CD25⁺ em T CD4⁺ somente nas células estimuladas com Ag-Lb (*ex vivo*: $9,0\% \pm 4,2\%$; mediana=8,3%; n=13 e Ag-Lb: $28,4\% \pm 20,8\%$; mediana=22%; n=13; $p < 0,001$) (**Figura 5A**). Esse aumento não foi observado nas culturas de células não estimuladas com o antígeno (BG: $9,2\% \pm 3,1\%$; mediana=9,1%; n=13) (**Figura 5B**). Esses resultados mostram que a manutenção das células em cultura não leva à ativação de células T CD4⁺.

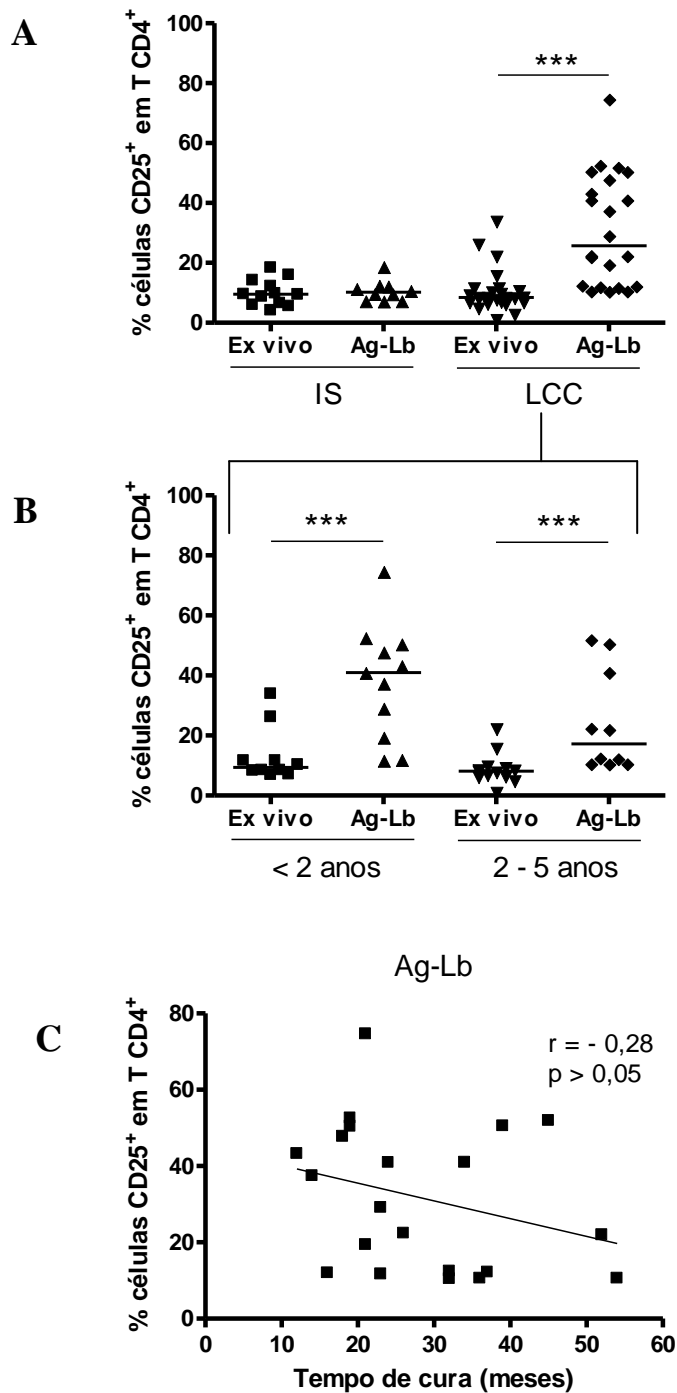


Figura 4: Avaliação do grau de ativação de linfócitos T CD4⁺ em resposta ao estímulo com *Leishmania braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose cutânea. As células T CD4⁺ expressando a molécula de superfície CD25 foram avaliadas *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (Ag-Lb). **(A)** Comparação entre indivíduos saudáveis (IS) e pacientes leishmaniose cutânea clinicamente curados (LCC), **(B)** Comparação entre indivíduos LCC com menos de 2 anos após a cura e 2 a 5 anos após a cura. A mediana foi representada por barras horizontais. *** (p<0,001). **(C)** Correlação entre o percentual de células CD25⁺ em T CD4⁺ e o tempo de cura em células estimuladas *in vitro* com Ag-Lb de indivíduos LCC. Cada ponto representa um indivíduo.

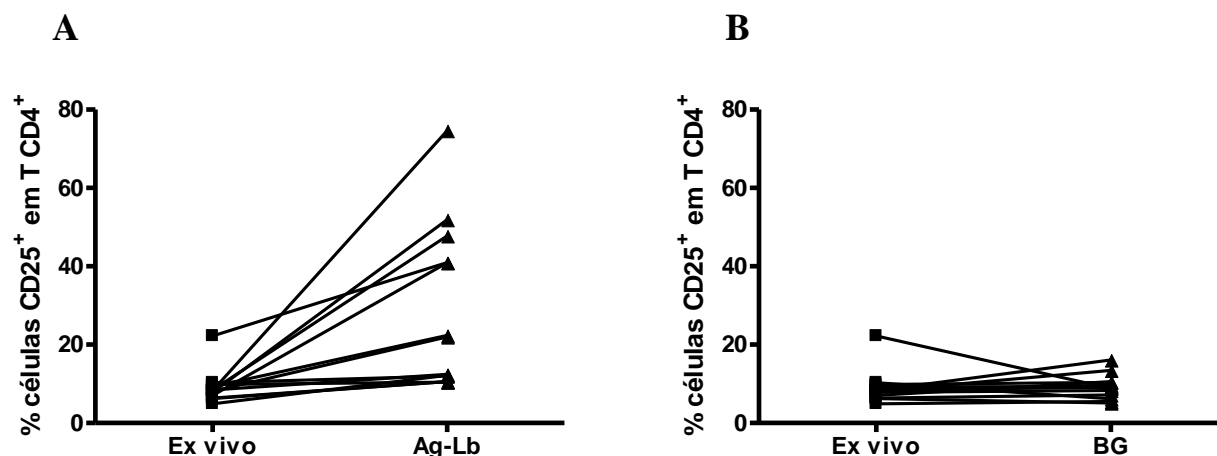


Figura 5: Análise da influência do cultivo *in vitro* na expressão de CD25 em membrana de linfócitos T CD4⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea. O percentual de células CD25⁺ dentro da população de linfócitos T CD4⁺ foi analisado em (A) células mononucleares do sangue periférico (CMSP) *ex vivo* e células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Ag-Lb) e em (B) CMSPs *ex vivo* e células não estimuladas (BG) de pacientes de leishmaniose cutânea clinicamente curados. Cada ponto representa um indivíduo. As linhas contínuas ligam os resultados referentes a um mesmo indivíduo.

Analisando o percentual de células CD25⁺ dentro da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ nos indivíduos LCC, também pode-se observar que há um aumento significativo ($p < 0,001$) da ativação dessas células após o estímulo antigênico ($18\% \pm 19,6\%$; mediana=9,8%; $n=22$), quando comparado com as células *ex vivo* ($4,7\% \pm 9,1\%$; mediana=1,7%; $n=23$) (**Figura 6A**). Nos indivíduos saudáveis (IS), o percentual em T CD8⁺ da molécula CD25 foi similar nas células *ex vivo* ($1,6\% \pm 1,2\%$; mediana=1,2%; $n=12$) e nas estimuladas por Ag-Lb ($5,0\% \pm 6,5\%$; mediana=1,6%; $n=10$) (**Figura 6A**).

Dentre os indivíduos LCC, o percentual médio de células T CD8⁺ *ex vivo* com a molécula CD25 foi similar nos indivíduos com menos de 2 anos de cura ($8,5\% \pm 13,1\%$; mediana=2,9%; $n=10$) e nos indivíduos com 2 a 5 anos de cura ($1,8\% \pm 1,4\%$; mediana=1,4%; $n=13$). Quando essas células foram estimuladas *in vitro* com o antígeno de Lb, houve um aumento significativo do percentual de células T CD25⁺ dentro de TCD8⁺ tanto no grupo <2 anos ($29,0\% \pm 22,8\%$; mediana=19,5%; $n=11$; $p < 0,01$) quanto no grupo 2-5 anos de cura clínica ($7,0\% \pm 4,6\%$; mediana=5,5%; $n=11$; $p < 0,001$). No entanto, esse aumento foi mais expressivo no grupo <2 anos ($p < 0,01$) (**Figura 6B**). Adicionalmente, foi observada uma correlação negativa entre o tempo de cura desses pacientes e o percentual de células T CD8⁺ com CD25, nas células estimuladas *in vitro* ($r = -0,69$; $p < 0,001$) (**Figura 6C**).

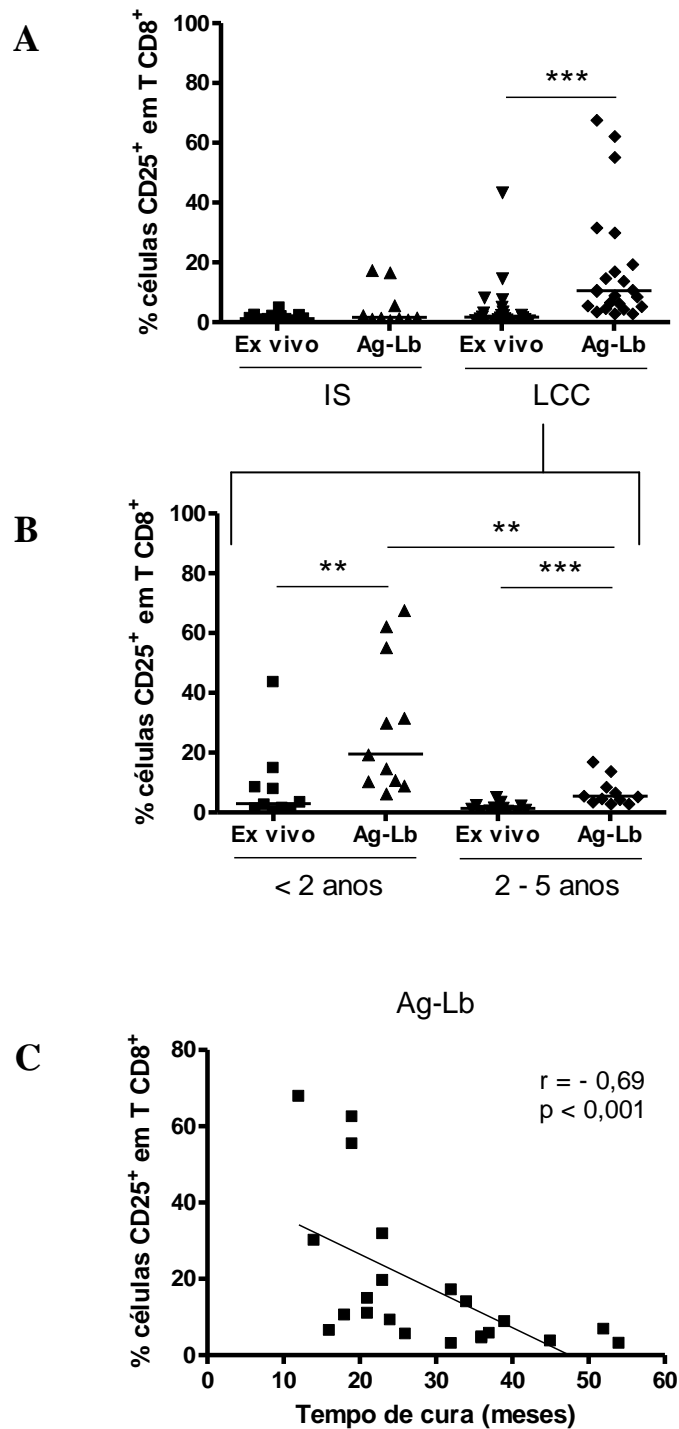


Figura 6: Avaliação do grau de ativação de linfócitos T CD8⁺ em resposta ao estímulo com *Leishmania braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose cutânea. As células T CD8⁺ expressando a molécula de superfície CD25 foram avaliadas *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígenos de *Leishmania* (Ag-Lb). **(A)** Comparação entre indivíduos saudáveis (IS) e pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), **(B)** Comparação entre indivíduos LCC com menos de 2 anos após a cura e 2 a 5 anos após a cura. A mediana foi representada por barras horizontais. *** (p<0,001) e ** (p<0,01). **(C)** Correlação entre o percentual de células CD25⁺ em T CD8⁺ e o tempo de cura em células estimuladas *in vitro* com Ag-Lb de indivíduos LCC. Cada ponto representa um indivíduo.

Nos pacientes LCC, o percentual de células CD25⁺ em T CD4⁺ foi mais elevado tanto *ex vivo* ($p < 0,001$) quanto após estímulo com Ag-Lb ($p < 0,01$) (**Figura 4A**), quando comparado à expressão de CD25 na membrana de linfócitos T CD8⁺ (**Figura 6A**).

Os três pacientes do grupo < 2 anos que apresentaram os maiores níveis de CD25 em células T CD8⁺ após o estímulo antigênico (67,8%, 62,4% e 55,4%), também apresentaram altos níveis de CD25 em células T CD4⁺ (43,2%, 50,4% e 52,6%). No entanto, não foi realizada a análise da molécula CD69 para esses pacientes. Dois desses pacientes tiveram uma resposta insatisfatória ao tratamento e um deles foi tratado com o esquema terapêutico glucantime + intralesional. O único paciente com uma IDRm negativa durante a fase ativa, apresentou o maior percentual de células CD25⁺ em T CD4⁺ reativas ao Ag-Lb (74,7%) e 10,94% de células CD25⁺ em T CD8⁺ reativas ao Ag-Lb.

Assim como foi observado para as células T CD4⁺, o aumento observado de células T CD25⁺ em CD8⁺ ocorreu somente após o estímulo antigênico (*ex vivo*: $1,4\% \pm 1,3\%$; mediana=1,1%; $n=13$ e Ag-Lb: $7,8\% \pm 4,2\%$; mediana=6,4%; $n=13$; $p < 0,001$) (**Figura 7A**), e não em culturas de células contendo somente o meio e sem o estímulo com o antígeno (BG: $3,4\% \pm 2,6\%$; mediana=2,6%; $n=13$) (**Figura 7B**).

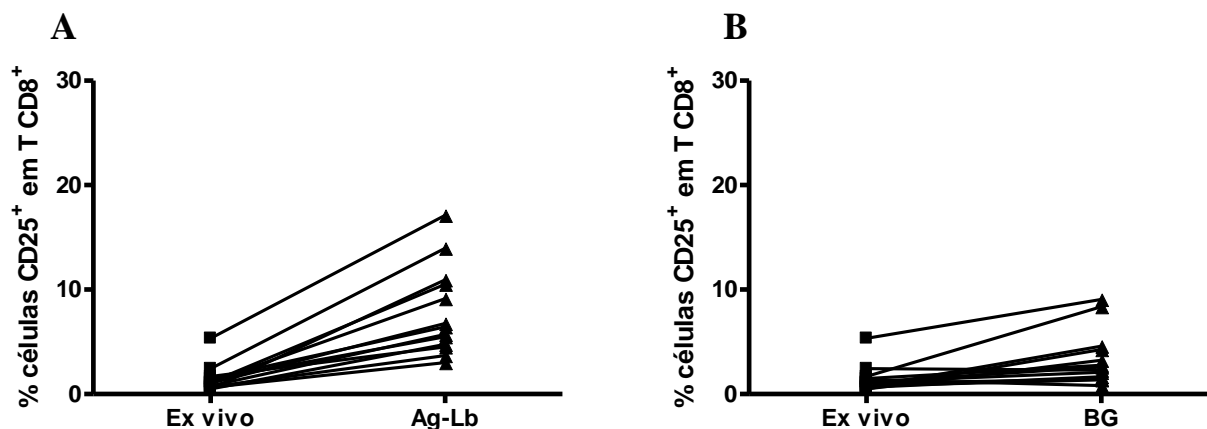


Figura 7: Análise da influência do cultivo *in vitro* na expressão de CD25 em membrana de linfócitos T CD8⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea. O percentual de células CD25⁺ dentro da população de linfócitos T CD8⁺ foi analisado em (A) células mononucleares do sangue periférico (CMSP) *ex vivo* e células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* (Ag-Lb) e em (B) CMSPs *ex vivo* e células não estimuladas (BG) de pacientes de leishmaniose cutânea clinicamente curados. Cada ponto representa um indivíduo. As linhas contínuas ligam os resultados referentes a um mesmo indivíduo.

A molécula CD69, relacionada com o grau de ativação de células T em fases mais precoces do ciclo celular, também foi avaliada. Essa molécula foi avaliada dentro da população de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e os resultados foram similares aos encontrados na avaliação do CD25.

Nos indivíduos LCC, o percentual de células CD69⁺ dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ foi mais elevado ($p < 0,01$) após o estímulo com Ag-Lb (16,4%±13,9%; mediana=10,5%; n=13), quando comparado com as células *ex vivo* (8,0%±11,4%; mediana=2,7%; n=15) (**Figura 8A**). Já nos indivíduos saudáveis (IS), o percentual dessas células T CD4⁺ com a molécula CD69 foi similar nas células *ex vivo* (1,6%±1,2%; mediana=1,1%; n=8) e nas células estimuladas (2,9%±2,2%; mediana=1,4%; n=7) (**Figura 8A**).

Dentre os indivíduos LCC, pode-se observar que o percentual de células T CD4⁺ com a molécula CD69 foi maior ($p < 0,01$) nas células *ex vivo* de indivíduos curados com menos de 2 anos (15,2%±13,7%; mediana=6,3%; n=7), quando comparado com o grupo 2-5 anos de cura (1,7%±1,3%; mediana=1,3%; n=8). Após o estímulo antigênico com Lb, houve um aumento dessas células T CD69⁺ em CD4⁺ tanto no grupo <2 anos (25,0%±13,7%; mediana=20,5%; n=7), quanto no grupo 2-5 anos (6,3%±3,5%; mediana=5,4%; n=6). No entanto, esse aumento mostrou-se mais evidente no grupo dos indivíduos com menos de 2 anos de cura (**Figura 8B**).

Foi observada uma correlação negativa entre o tempo de cura desses pacientes e o percentual de células T CD4⁺ com CD69 estimuladas *in vitro* ($r = -0,61$; $p < 0,05$) (**Figura 8C**).

De modo semelhante ao que ocorreu na análise da molécula CD25, o aumento observado de células CD69⁺ em T CD4⁺ ocorreu somente após o estímulo antigênico (*Ex vivo*: 2,9%±1,8%; mediana=2,5%; n=10 e Ag-Lb: 12,0%±11,5%; mediana=8,7%; n=10; $p < 0,01$) (**Figura 9A**), e não em cultura de células contendo somente o meio e sem o estímulo com o antígeno parasitário (BG: 2,6%±1,4%; mediana=2,2%; n=10) (**Figura 9B**).

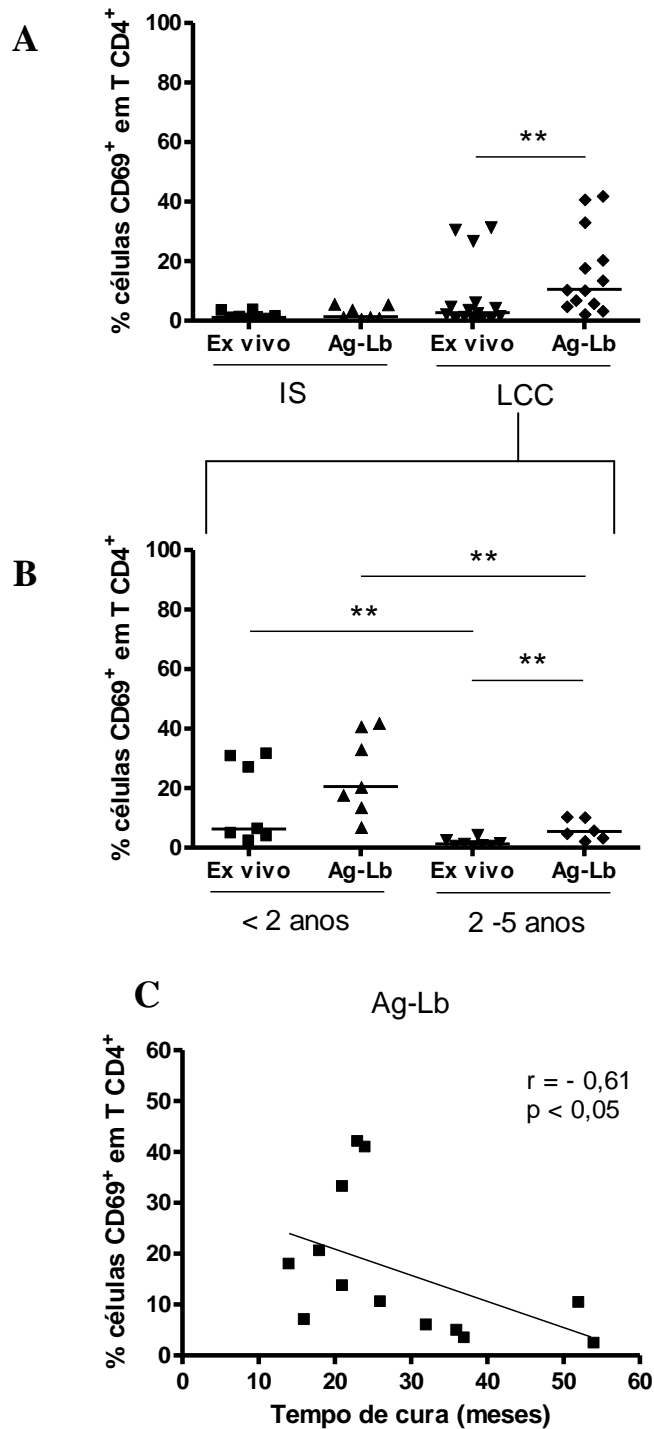


Figura 8: Percentagem de células T CD4⁺ com a molécula CD69 em CMSP (células mononucleares do sangue periférico) *ex vivo* e em células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Ag-Lb). **(A)** Comparação entre indivíduos saudáveis (IS) e pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), **(B)** Comparação entre indivíduos LCC com menos de 2 anos após a cura e 2 a 5 anos após a cura. A mediana foi representada por barras horizontais. ** (p<0,01). **(C)** Correlação entre o percentual de células T CD4⁺ expressando a molécula CD69 e o tempo de cura em células estimuladas *in vitro* (Ag-Lb) de indivíduos LCC. Cada ponto representa um indivíduo.

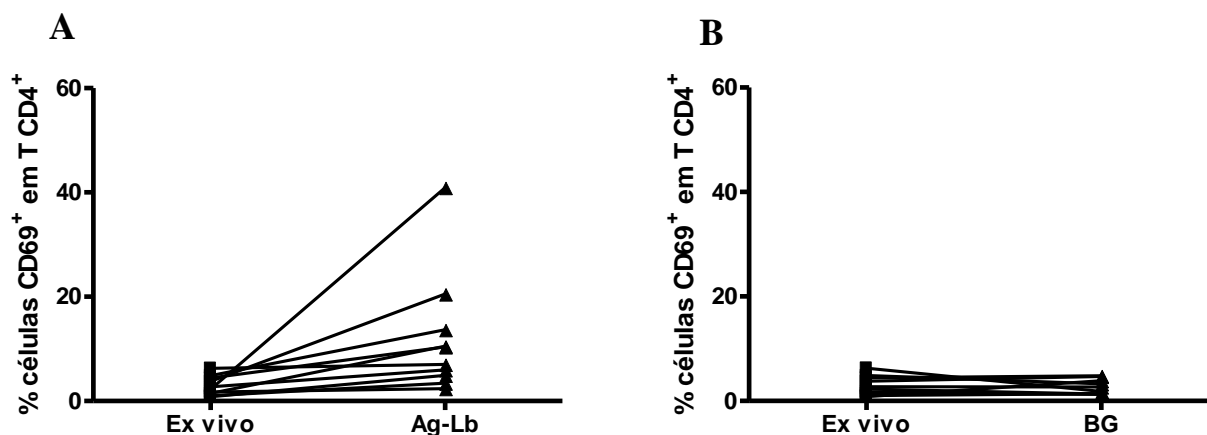


Figura 9: Análise da influência do cultivo *in vitro* na expressão de CD69 em membrana de linfócitos T CD4⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea. O percentual de células CD69⁺ dentro da população de linfócitos T CD4⁺ foi analisado em (A) células mononucleares do sangue periférico (CMSP) *ex vivo* e células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Ag-Lb) e em (B) CMSPs *ex vivo* e células não estimuladas (BG) de pacientes de leishmaniose cutânea clinicamente curados. Cada ponto representa um indivíduo. As linhas contínuas ligam os resultados referentes a um mesmo indivíduo.

De modo similar ao que ocorreu na subpopulação de linfócitos T CD4⁺, o percentual de células CD69⁺ dentro da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ foi maior ($p < 0,001$) nas células após o estímulo antigênico ($22,2\% \pm 13,7\%$; mediana=18,5%; $n=14$), quando comparado com as células *ex vivo* ($3,6\% \pm 2,8\%$; mediana=2,8%; $n=15$) nos indivíduos LCC (**Figura 10A**). Já nos indivíduos saudáveis (IS), o percentual dessas células T CD8⁺ com a molécula CD69 foi similar nas células *ex vivo* ($2,6\% \pm 1,2\%$; mediana=2,5%; $n=8$) e nas células estimuladas ($3,3\% \pm 1,6\%$; mediana=2,9%; $n=7$) (**Figura 10A**).

Dentre os pacientes LCC, pode-se observar que o percentual de células T CD8⁺ com a molécula CD69 foi maior ($p < 0,05$) nas células *ex vivo* de indivíduos curados com menos de 2 anos ($5,5\% \pm 2,8\%$; mediana=5,9%; $n=7$), quando comparado com indivíduos entre 2-5 anos de cura ($1,9\% \pm 1,2\%$; mediana=1,9%; $n=8$). Após o estímulo antigênico com Lb, houve um aumento ($p < 0,001$) dessas células T CD69⁺ dentro de CD8⁺ tanto no grupo <2 anos ($28,5\% \pm 14,8\%$; mediana=30,2%; $n=7$) quanto no grupo 2-5 anos ($15,9\% \pm 10,0\%$; mediana=14,7%; $n=7$). No entanto, esse aumento também se mostrou mais evidente no grupo dos indivíduos com menos de 2 anos de cura (**Figura 10B**).

Também foi observada uma correlação negativa entre o tempo de cura desses pacientes e o percentual de células T CD8⁺ expressando CD69 estimuladas *in vitro* ($r = -0,56$; $p < 0,05$) (**Figura 10C**).

Nos pacientes LCC, o percentual de células *ex vivo* CD69⁺ foi similar em T CD4⁺ e T CD8⁺. O mesmo ocorre para as células estimuladas com Ag-Lb (**Figura 8A e 10A**).

O aumento observado de células CD69⁺ dentro de T CD8⁺ também ocorreu somente após o estímulo antigênico (*Ex vivo*: 3,2%±2,8; mediana=2,8; n=11 e Ag-Lb: 19,9%±11,7%; mediana=17,1%; n=11; p<0,001) (**Figura 11A**), e não em cultura de células sem o estímulo com o antígeno (BG: 5,3%±3,8%; mediana=3,5%; n=11) (**Figura 11B**).

Não houve correlação dos níveis de ativação com dados clínicos, como área da lesão, IDRM, tempo de evolução ou número de lesões durante a fase ativa.

Foram avaliados em separado os dois pacientes que tiveram um alto índice de estimulação na RPL, na tentativa de analisar se esses pacientes também teriam altos níveis de ativação após o estímulo com o mesmo Ag-Lb (**Figura 2**). O primeiro desses pacientes (nº 004/09) obteve um IE de 70,9. Nesse caso, foi observado um alto percentual de células T CD4⁺ expressando CD25 após estimulação *in vitro* (41%) e o segundo maior percentual de células T CD8⁺ expressando CD25 após estimulação *in vitro* (14%) no grupo 2-5 anos. Porém, a avaliação da molécula CD69 não foi realizada para esse paciente. Já o segundo paciente (nº 019/09), com IE de 68, apresentou baixos percentuais de células T CD4⁺ (10,4%) e T CD8⁺ (3%) expressando CD25 quando estimuladas *in vitro*. Também foram observados baixos percentuais de células T CD4⁺ para CD69, porém ele teve o terceiro percentual mais alto de T CD8⁺ expressando a molécula CD69. Esse indivíduo tem um diferencial clínico, pois ele foi um dos pacientes que apresentou seis lesões durante a sua fase ativa.

Dois pacientes apresentaram simultaneamente altos níveis de CD69 em T CD4⁺ e em T CD8⁺. O paciente com maior nível de CD69 em T CD4⁺ (42%), obteve o percentual de 30,2% da molécula CD69 em células T CD8⁺. O paciente com o segundo maior nível de CD69 em T CD4⁺ (40,9%), obteve também o segundo maior percentual da molécula CD69 em células T CD8⁺ (40,8%).

O único paciente com uma IDRM negativa durante a fase ativa, apresentou 13,7% de células CD25⁺ reativas ao Ag-Lb em T CD4⁺ (74,7%) e 19,95% de células CD25⁺ reativas ao Ag-Lb em T CD8⁺.

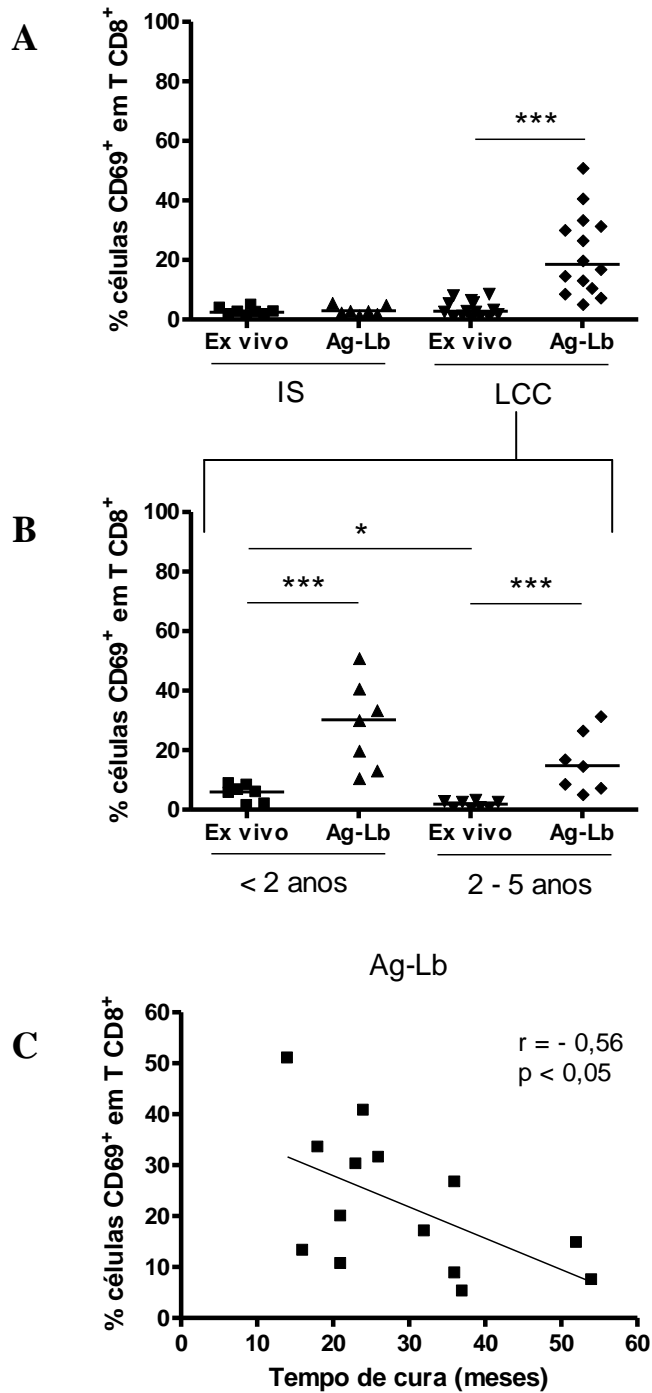


Figura 10: Percentagem de células T CD8⁺ com a molécula CD69 em CMSP (células mononucleares do sangue periférico) *ex vivo* e em células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Ag-Lb). **(A)** Comparação entre indivíduos saudáveis (IS) e pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), **(B)** Comparação entre indivíduos LCC com menos de 2 anos após a cura e 2 a 5 anos após a cura. A mediana foi representada por barras horizontais. *($p < 0,05$) *** ($p < 0,001$). **(C)** Correlação entre o percentual de células T CD8⁺ expressando a molécula CD69 e o tempo de cura em células estimuladas *in vitro* (Ag-Lb) de indivíduos LCC. Cada ponto representa um indivíduo.

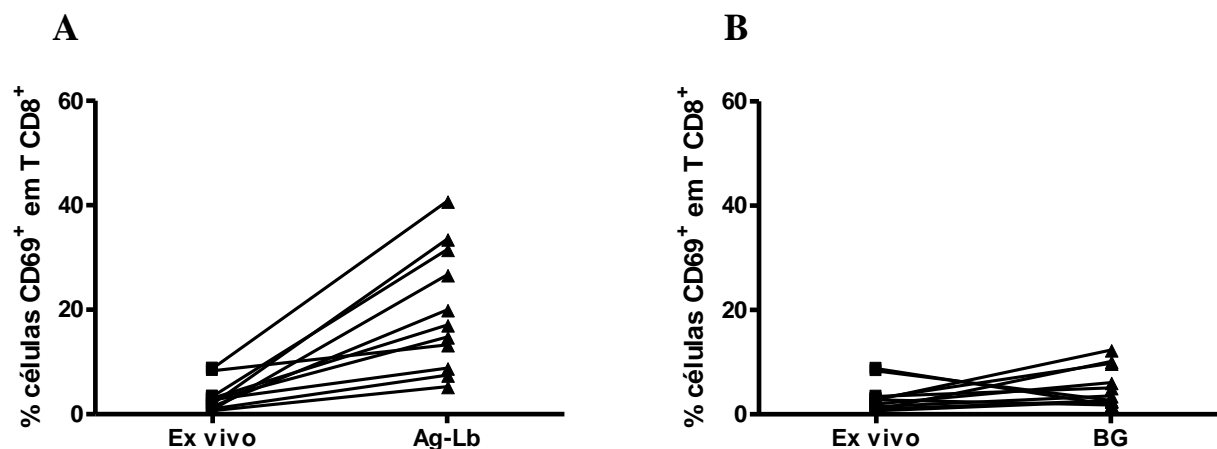


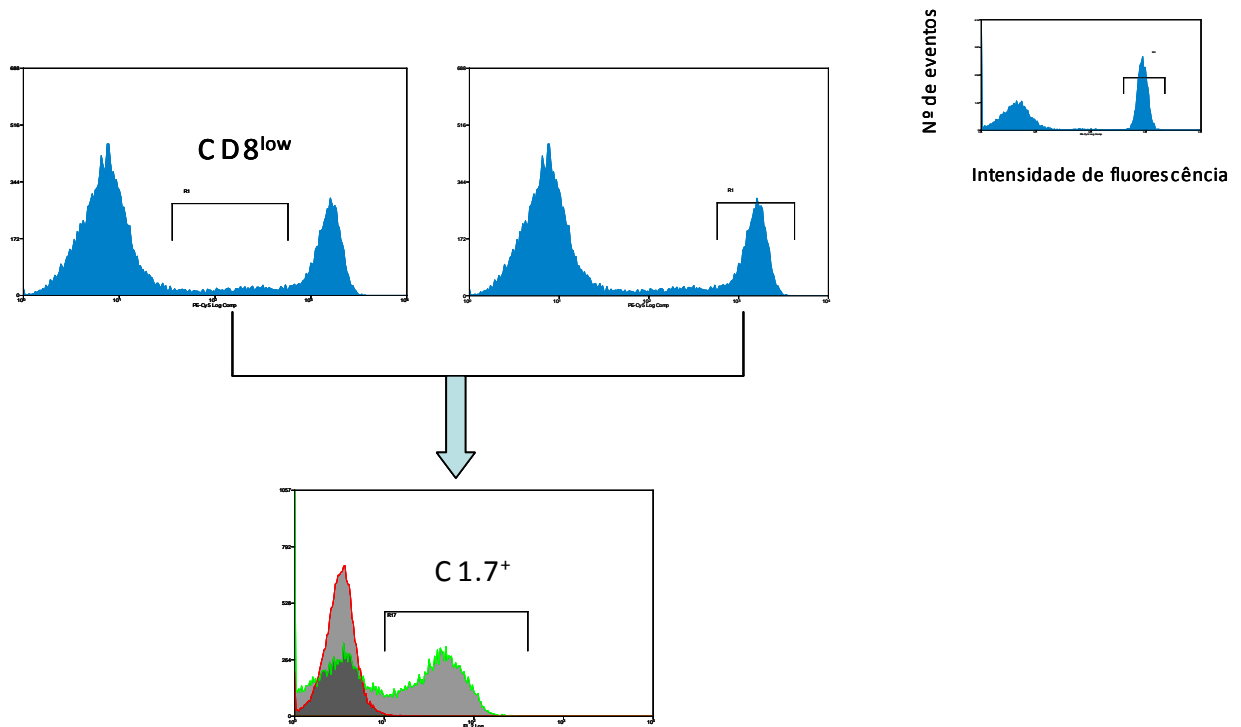
Figura 11: Análise da influência do cultivo *in vitro* na expressão de CD69 em membrana de linfócitos T CD8⁺ de pacientes curados de leishmaniose cutânea. O percentual de células CD69⁺ dentro da população de linfócitos T CD8⁺ foi analisado em (A) células mononucleares do sangue periférico (CMSP) *ex vivo* e células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Ag-Lb) e em (B) CMSPs *ex vivo* e células não estimuladas (BG) de pacientes de leishmaniose cutânea clinicamente curados. Cada ponto representa um indivíduo. As linhas contínuas ligam os resultados referentes a um mesmo indivíduo.

Esses resultados mostram que nos indivíduos com tempo de cura mais recente (menor que 2 anos), as células T parecem ter um grau de ativação mais elevado nos linfócitos do sangue periférico do que indivíduos com maior tempo de cura (2-5 anos). Quando essas células são estimuladas *in vitro*, ocorre um aumento desse grau de ativação em relação às células *ex vivo* e este grau de ativação é significativamente mais elevado em pacientes com menor tempo de cura. Estes resultados sugerem que a capacidade de ativação das células reativas à *Leishmania* que permanecem na periferia, se reduz com o aumento do tempo de cura.

Tendo em vista que as células T CD8⁺ de pacientes curados de leishmaniose apresentaram uma mudança no perfil de ativação em função do tempo de cura, passou-se a avaliar se essas células também apresentariam atuação do fenótipo associado à citotoxicidade.

6.5. AVALIAÇÃO DA MOLÉCULA C1.7 (CD244) ASSOCIADA À CITOTOXICIDADE EM CÉLULAS DE PACIENTES CLINICAMENTE CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA:

A avaliação da citotoxicidade foi analisada através da expressão membranar da molécula C1.7 (CD244). Essa molécula foi avaliada na região de células $CD8^+$, nas subpopulações de células $CD8^{high}$ e $CD8^{low}$, como mostra o **Esquema 4**.



Esquema 4: Histogramas utilizados para análise fenotípica da molécula C1.7 (CD244) dentro das subpopulações de células $CD8^+$ total, $CD8^{high}$ e $CD8^{low}$. Essas moléculas foram estudadas em células do sangue periférico *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania braziliensis* (ag-Lb) em pacientes curados de leishmaniose cutânea e em controles sadios. Em vermelho está representada a região marcada com o isotipo IgG1e em verde a região positiva para a molécula analisada (C1.7).

Nos pacientes LCC, o percentual médio de células $C1.7^+$ em $CD8^{high}$ foi similar nas células *ex vivo* ($10,9\% \pm 7,9\%$; mediana=9,9%; n=26) e nas células estimuladas *in vitro* com Ag-Lb ($9,2\% \pm 6,9\%$; mediana=8,1%; mediana=20). O mesmo ocorreu para os IS (*Ex vivo*: $10,5\% \pm 4,9\%$; mediana=10,8%; n=11 e Ag-Lb: $7,8\% \pm 3,9\%$; mediana=7,3; n=6) (**Figura 12A**).

A análise da molécula C1.7 em subpopulações de células CD8^{low} mostrou resultados semelhantes. Não houve modificação do percentual médio de células C1.7⁺ em CD8^{low}, comparando as células *ex vivo* e após o estímulo antigênico, tanto em pacientes LCC (*Ex vivo*: 8,9%±3,6%; mediana=8,2%; n=26; Ag-Lb: 8,0%±4,5%; mediana=7,2%; mediana=20) quanto em IS (*Ex vivo*: 7,6%±4,1%; mediana=6,5%; n=11; Ag-Lb: 5,1%±2,7%; mediana=4,8; n=6) (**Figura 12B**).

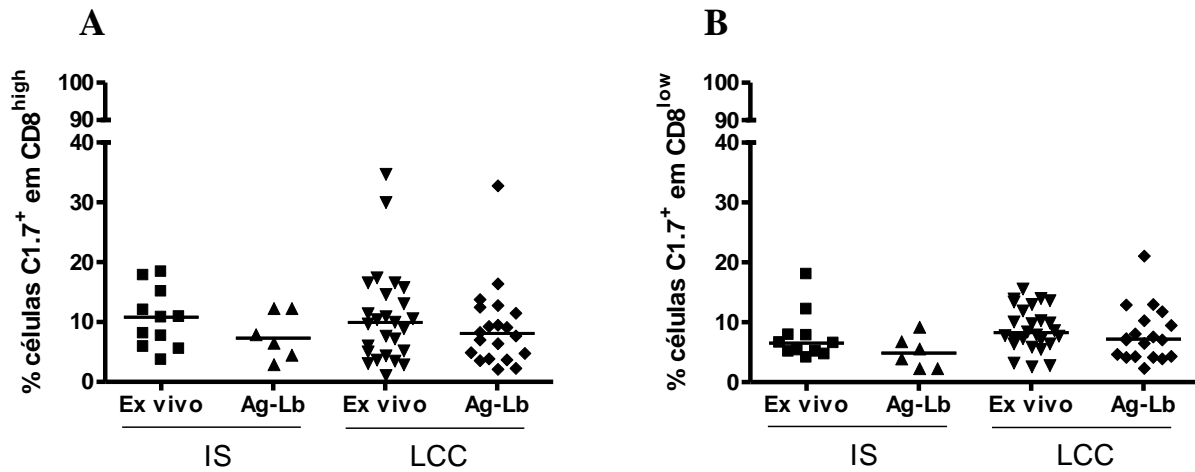
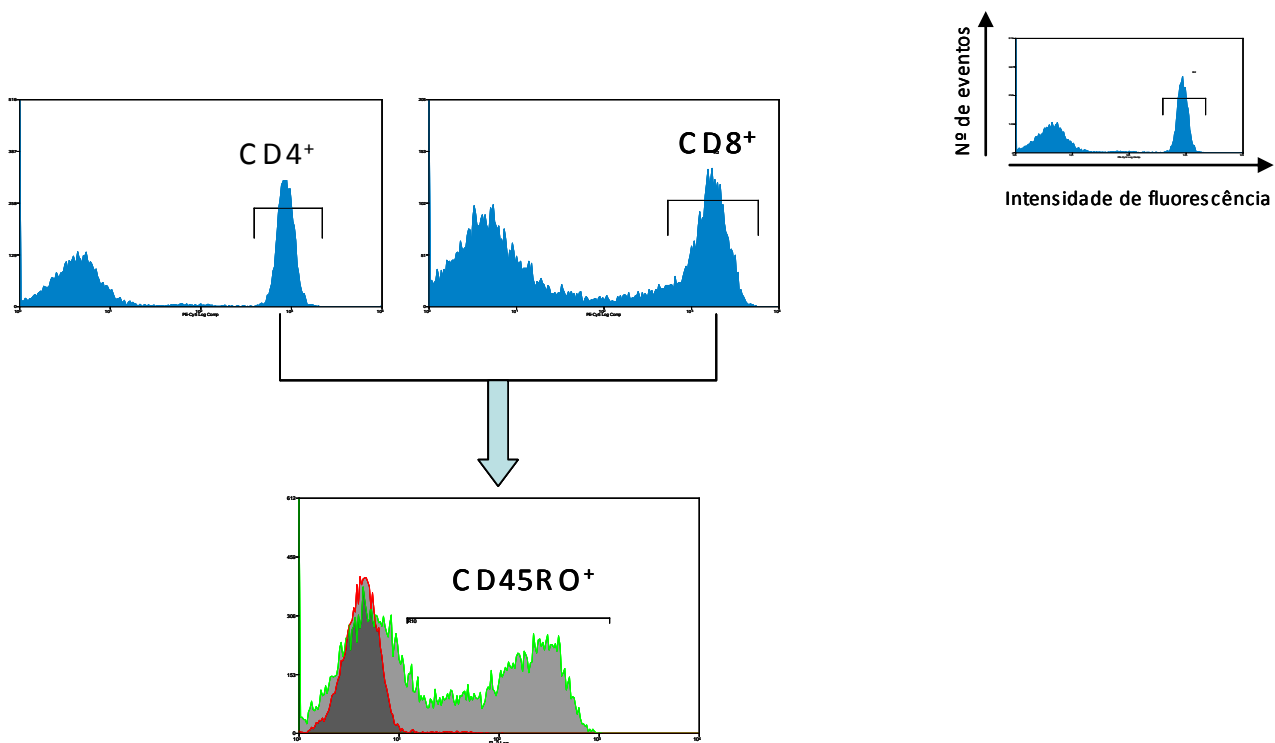


Figura 12: Avaliação da indução da molécula C1.7 (CD244) associada à citotoxicidade por antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose de leishmaniose cutânea (LCC). O percentual da molécula de superfície C1.7 foi avaliada em células CD8^{high} (A) e células CD8^{low} (B), comparando indivíduos saudáveis (IS) e LCC. A mediana foi representada por barras horizontais. Cada ponto representa um indivíduo.

Esses resultados indicam que a expressão membranar da molécula C1.7 em células CD8⁺ parece não aumentar após o reencontro com o antígeno de *Leishmania*.

6.6. AVALIAÇÃO DE PERFIS FENOTÍPICOS ASSOCIADOS A LINFÓCITOS T DE MEMÓRIA EM PACIENTES CLINICAMENTE CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA:

Tendo em vista os achados que mostram uma diminuição da ativação com o aumento do tempo de cura e os dados da literatura que indicam a possível persistência do parasito, mesmo em indivíduos clinicamente curados (Schubach et al, 1998), avaliou-se as subpopulações de linfócitos que se mantém na circulação após terem tido uma “experiência prévia” com antígenos de *Leishmania*. Essa análise foi realizada através da molécula CD45RO, dentro das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (Esquema 5).



Esquema 5: Histogramas para análise fenotípica da molécula CD45RO dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A caracterização foi realizada em células do sangue periférico *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb) em pacientes curados de leishmaniose cutânea e em controles saudios. Em vermelho está representada a região marcada com o isótipo IgG1 e em verde a região positiva para a molécula analisada (CD45RO).

A expressão de CD45RO dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ *ex vivo* foi superior nos indivíduos LCC (63,4%±11,5%; mediana=60,4%; n=13) quando comparados com os IS (53,2%±11,8%; mediana=50,4%; n=10), embora não haja diferença estatística. Após o estímulo antigênico, os percentuais médios se mantiveram similares quando comparado as suas respectivas células *ex vivo* nos indivíduos LCC (64,6%±11,9%; mediana=68,9%; n=11) e nos IS (46,7%±11,2%; mediana=46,3%; n=9). No entanto, o percentual médio de CD45RO em células T CD4⁺ estimuladas *in vitro*, foi superior nos indivíduos LCC quando comparado com os IS (p<0,05) (**Figura 13A**).

Já em relação à expressão membranar da molécula CD45RO dentro da subpopulação de linfócitos T CD8⁺, foi observado um percentual médio similar nas células *ex vivo* de pacientes LCC (38,4%±19,0%; mediana=31,5%; n=13) e de IS (42,6%±12,1%; mediana=38,6%; n=9). Após o estímulo *in vitro* com antígeno de Lb, esses percentuais não se alteraram, tanto nos pacientes LCC (36,7%±11,6%; mediana=38,2%; n=11) quanto nos IS (41,3%±21,7%; mediana=30,8%; n=7) (**Figura 13B**).

Foi observada uma correlação negativa entre o tempo de cura dos indivíduos LCC e o percentual de células CD45RO⁺ em T CD4⁺ após o estímulo *in vitro* (r= -0,60; p<0,05), porém esta correlação não foi encontrada dentro da subpopulação de linfócitos T CD8⁺ (r= -0,48; p>0,05) (**Figuras 13C e 13D**, respectivamente).

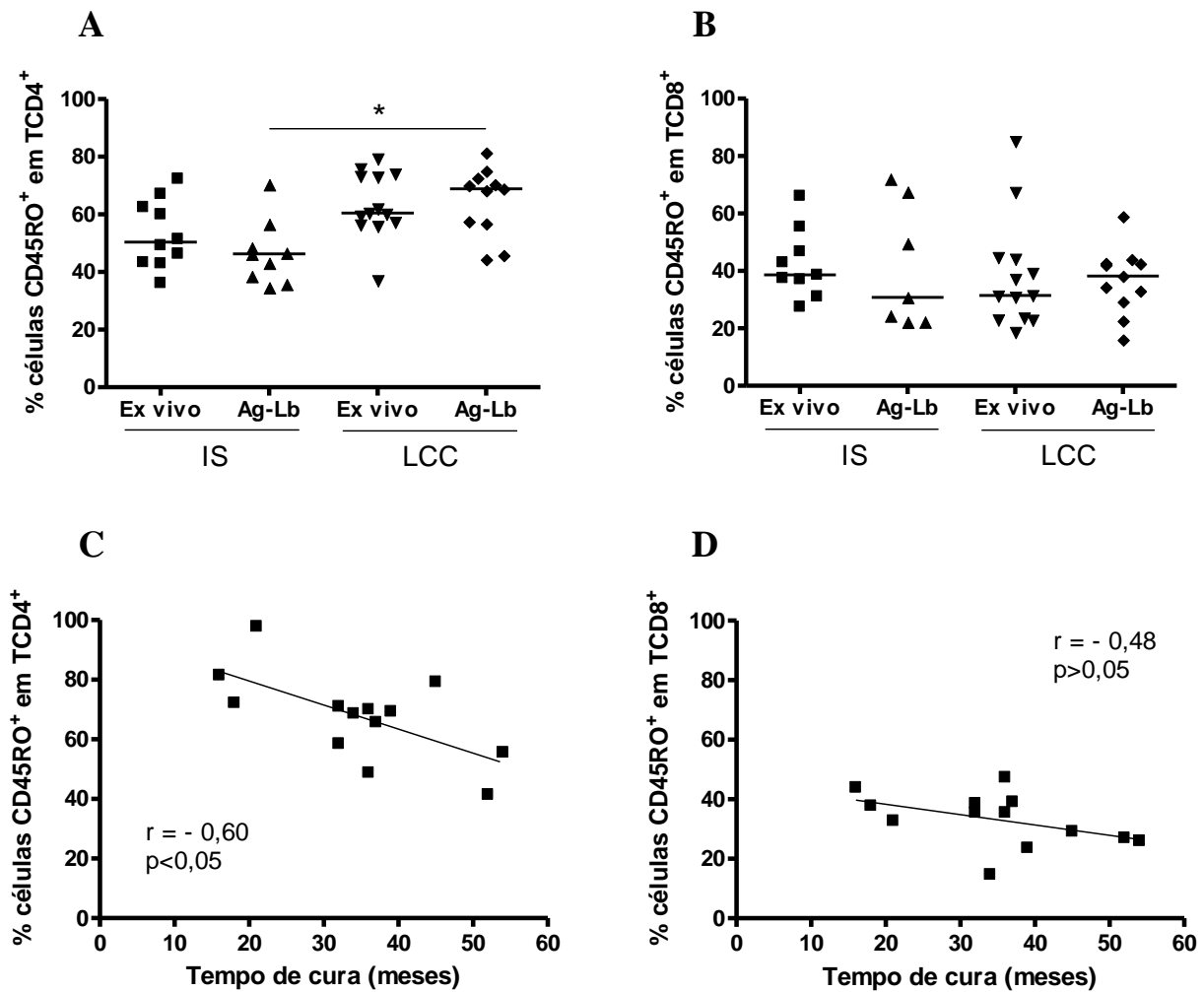
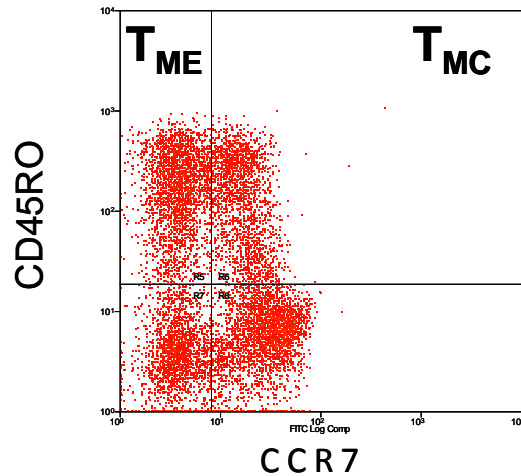


Figura 13 Análise do perfil de memória de linfócitos T estimulados com antígeno de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb) em pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC). O percentual da molécula CD45RO foi avaliado em linfócitos T CD4⁺ (A e C) e T CD8⁺ (B e D) em indivíduos saudáveis (IS) e pacientes LCC até 5 anos após a cura clínica. O percentual foi mensurado *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Ag-Lb). (A) Comparação entre indivíduos saudáveis (IS) e pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC) das células CD45RO⁺ em T CD4⁺, (B) Comparação entre indivíduos saudáveis (IS) e pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC) das células CD45RO⁺ em T CD8⁺. A mediana foi representada por barras horizontais. *($p < 0,01$). (C) Correlação entre o percentual de células T CD4⁺ com a molécula CD45RO e o tempo de cura em células estimuladas *in vitro* (Ag-Lb) de indivíduos LCC, (D) Correlação entre o percentual de células T CD8⁺ com a molécula CD45RO e o tempo de cura em células estimuladas *in vitro* (Ag-Lb) de indivíduos LCC. Cada ponto representa um indivíduo.

Com o objetivo de avaliar as subpopulações de linfócitos de memória central (MC) e memória efetora (ME), foram analisadas conjuntamente as moléculas de superfície CD45RO e CCR7 em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (**Esquema 6**).



Esquema 6: Análise citofluorimétrica em gráfico de *dot plot* da população de células de memória central (T_{MC}) CD45RO⁺CCR7⁺ e de memória efetora (T_{ME}) CD45RO⁺CCR7⁻ nas subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A caracterização dessas duas subpopulações celulares foi realizada em células do sangue periférico *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose cutânea e em controles saudáveis.

Foi observado um percentual maior de linfócitos T_{MC} em relação aos linfócitos T_{ME}, tanto na subpopulação de linfócitos T CD4⁺ quanto em T CD8⁺ (**Figura 14**).

Nos pacientes LCC, após o estímulo com Ag-Lb, houve uma diminuição do percentual médio de linfócitos T CD4⁺ de MC (46,5%±15,9%; mediana=48,2%; n=11), quando comparado com as células *ex vivo* (60,15%±11,7%; mediana=56,8%; n=14). No entanto, essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Em relação aos linfócitos T CD4⁺ de ME, houve um aumento (p<0,01) do percentual após o estímulo antigênico (18,6%±17,6%; mediana= 8,4%; n=12), quando comparado às células *ex vivo* (4,0%±4,3%; mediana=3,1%; n=14) (**Figura 14A**). Em 7 de 11 pacientes, esse aumento foi superior a duas vezes.

Dentre os linfócitos T CD8⁺ de MC, também houve uma diminuição (não significativa) do percentual dessas células após estímulo *in vitro* (21,5%±10,4%; mediana=23,9%; n=12), quando comparado com as células *ex vivo* (34,15%±16,6%; mediana=31,6%; n=14). Já nos linfócitos T CD8⁺ de ME, pode-se observar um aumento significativo (p<0,001) destas células após o estímulo *in vitro* (13,6%±11,6%; mediana=9,4%; n=12), quando comparado com as células *ex vivo* (2,3%±1,7%; mediana=2,1%; n=14) (**Figura 14B**). Em 9 de 11 pacientes, esse aumento foi superior a duas vezes.

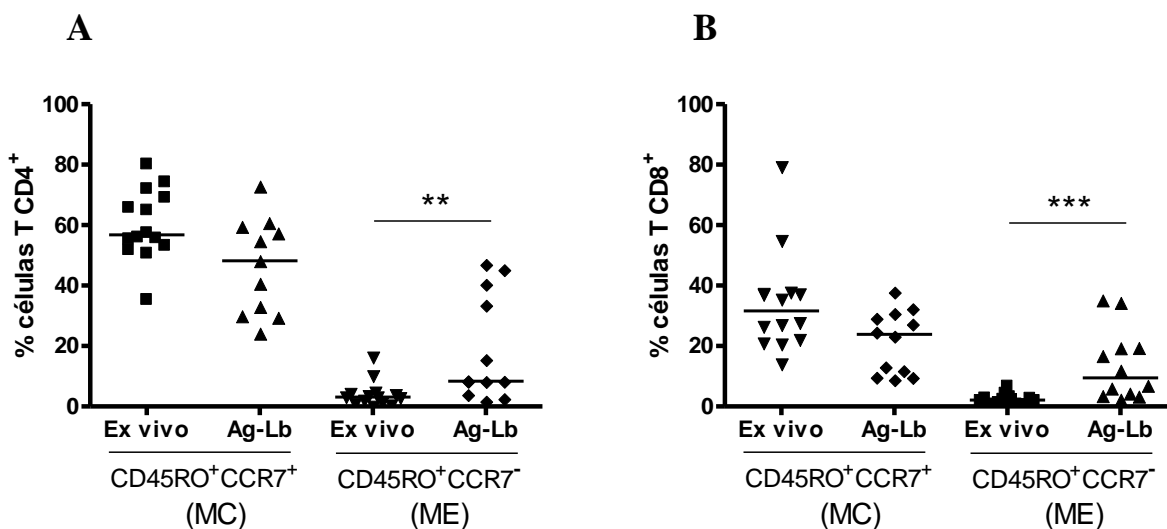


Figura 14: Percentual de células de memória central (MC) CD45RO⁺CCR7⁺ e memória efetora (ME) CD45RO⁺CCR7⁻ dentro de células T CD4⁺ (A) e células T CD8⁺ (B) em pacientes curados de leishmaniose cutânea. O percentual foi mensurado *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Ag-Lb). A mediana foi representada por barras horizontais. **($p < 0,01$); *** ($p < 0,001$). Cada ponto representa um indivíduo.

Não houve correlação entre as células T CD4⁺ e T CD8⁺ de MC e ME e dados clínicos como tempo de evolução e tempo de cura.

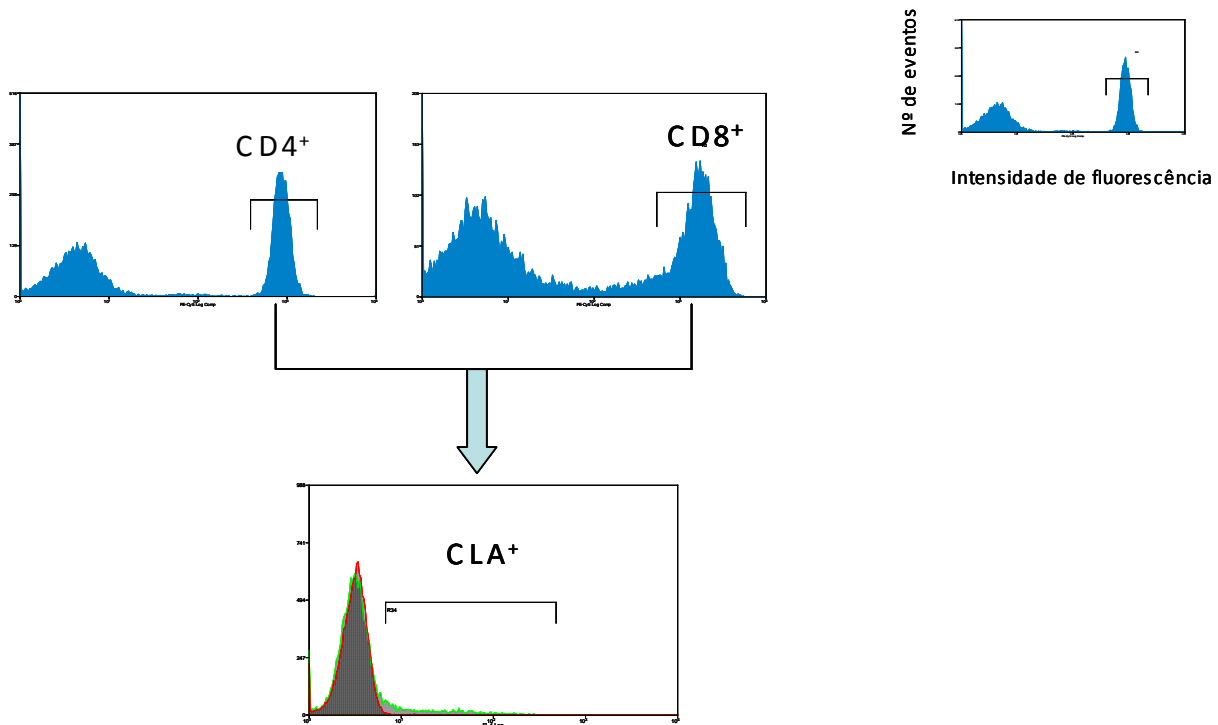
Os dois pacientes com maiores percentuais de células T CD4⁺ de ME após o estímulo antigênico (46,94% e 45,22%) foram os mesmos pacientes que apresentaram os maiores percentuais de células T CD8⁺ de ME (35,22% e 34,36%). Não foi possível fazer a avaliação do percentual de células de memória do paciente que apresentou IDRМ negativa durante a fase ativa.

Esses resultados mostram que, após o estímulo antigênico, houve uma pequena redução do percentual de células de MC e um aumento do percentual de células de ME em alguns pacientes de LCC. Esses pacientes parecem, mesmo após longo tempo após a cura, terem a capacidade de reconhecer os antígenos de *L. braziliensis* e serem capazes de produzir respostas efetoras a esse antígeno.

A partir desses dados, nós avaliamos se essas células com características fenotípicas de células de ME expressariam uma molécula que as direcionasse para a lesão no caso de um reencontro com o antígeno de *L. braziliensis*.

6.7. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE CÉLULAS DE PACIENTES CURADOS DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA DE EXPRESSAREM MOLÉCULA ASSOCIADA À MIGRAÇÃO PARA A PELE:

A avaliação da molécula de superfície CLA, relacionada com o direcionamento de células para a pele, foi realizada dentro da região dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (**Esquema 7**).



Esquema 7: Histogramas para análise fenotípica da molécula antígeno leucocitário cutâneo (CLA, do inglês *cutaneous leucocyte antigens*) dentro das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. A caracterização foi realizada em células do sangue periférico *ex vivo* e após estímulo *in vitro* com antígeno de *Leishmania braziliensis* (Ag-Lb) em pacientes curados de leishmaniose cutânea e em controles saudios. Em vermelho está representada a região marcada com o isotipo IgG1 e em verde a região positiva para a molécula analisada (CLA).

O percentual médio da molécula CLA dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺ *ex vivo* foi similar nos indivíduos LCC (10,2%±5,6%; mediana=8,6%; n=14) quando comparados com os IS (6,7%±2,8%; mediana=6,3%; n=11). Após o estímulo antigênico, os percentuais médios se mantiveram similares nos indivíduos LCC (10,5%±2,1%; mediana=11,4%; n=9) e nos IS (5,2%±2,7%; mediana=5,0%; n=10) (**Figura 15A**).

Em relação à molécula CLA na subpopulação de linfócitos T CD8⁺, também foi observado um percentual médio similar nas células *ex vivo* de pacientes LCC (5,2%±3,3%; mediana=4,8%; n=14) e de IS (2,5%±1,0%; mediana=2,5%; n=11). Após o estímulo *in vitro* com Ag-Lb, esses percentuais não se alteraram tanto nos pacientes LCC (5,6%±2,6%; mediana=4,8%; n=9) quanto nos IS (2,7%±2,0%; mediana=1,9%; n=10) (**Figura 15B**).

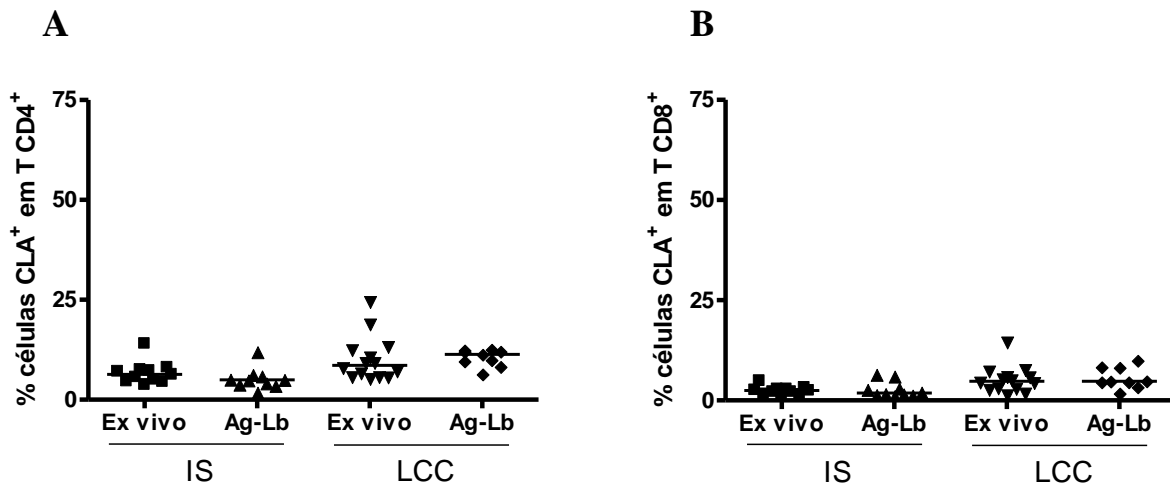


Figura 15: Avaliação da molécula CLA associada à migração celular por antígenos de *Leishmania braziliensis* em pacientes curados de leishmaniose de leishmaniose cutânea (LCC). A molécula CLA foi analisada em células mononucleares do sangue periférico *ex vivo* e em células estimuladas *in vitro* com antígeno de *Leishmania* (Ag-Lb). O percentual da molécula de superfície CLA foi avaliado em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. **(A)** Percentual (%) de células CLA⁺ dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺, em LCC e indivíduos sadios (IS). **(B)** Percentual (%) de células CLA⁺ dentro da subpopulação de linfócitos T CD8⁺, em LCC e IS. A mediana foi representada por barras horizontais. Cada ponto representa um indivíduo.

7. DISCUSSÃO:

As leishmanioses ainda são um desafio para a saúde pública, visto que as medidas de controle da doença não são eficazes e existe uma grande parte da população que vive em áreas endêmicas sob o risco de adquirir a infecção. Devido à complexidade no controle das leishmanioses, a estratégia profilática ideal seria o desenvolvimento de vacinas indutoras da resposta imunológica, capazes de conferir aos indivíduos imunizados a competência de controlar a replicação do parasito e o dano tecidual progressivo. Entretanto, o desenvolvimento de uma vacina com efeito protetor depende inicialmente da definição do perfil de resposta imunológica compatível com o controle do patógeno em questão. Neste trabalho, dentre uma série de mecanismos imunológicos induzidos pela infecção por *Leishmania*, propusemos estudar as subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, no que diz respeito ao fenótipo associado com ativação celular, migração celular e citotoxicidade, que possivelmente são induzidos pelo antígeno parasitário em clones específicos que persistem para responder novamente à *Leishmania*.

Com relação ao hospedeiro, a imunidade mediada por células tem um papel importante no controle da *Leishmania*. Muitas subpopulações celulares estão envolvidas na resposta imune a esse parasito, incluindo linfócitos que são ativados por citocinas inflamatórias e que irão atuar em conjunto com outras células (Abbas & Lichtman, 2003). As subpopulações de linfócitos podem ser identificadas através da imunofenotipagem que consiste na detecção de moléculas expressas na superfície ou no interior da célula por meio de anticorpos monoclonais altamente específicos. Essas moléculas têm sua expressão induzida por um determinado estímulo como antígenos, citocinas, quimiocinas e outros elementos sinalizadores. A partir dessa sinalização, as células apresentam mudanças no padrão de expressão gênica, que irá refletir no fenótipo das mesmas. Essas alterações observadas na superfície das células estimuladas muitas das vezes se convertem em uma nova função ou conjunto de funções. Dessa forma, é possível determinar grupos funcionais com características relacionadas à ativação, à citotoxicidade e ao endereçamento celular através da avaliação imunofenotípica.

A maioria dos estudos de resposta imune na leishmaniose tem sido realizada em pacientes com a forma ativa da doença. No entanto, ainda não se sabe ao certo quais são os mecanismos que levam à cura da leishmaniose. Alguns autores estudaram perfis imunológicos associados à cura avaliando indivíduos pós-tratamento na infecção por *L. braziliensis* (Mendonça et al, 1986; Da-Cruz et al, 1994; Coutinho et al, 1998; Ribeiro de Jesus et al, 1998; Bacellar et al, 2002), mas poucos estudos vêm sendo conduzidos no sentido de investigar a resposta imune duradoura em pacientes curados há longo tempo

(Da-Cruz et al, 2002; Bittar et al, 2007; Gomes-Silva et al, 2007; Tuon et al, 2008). A caracterização da resposta imunológica de indivíduos portadores de lesões ativas de leishmaniose ou de pacientes imediatamente após o término do tratamento pode nos remeter a duas linhas de pensamento. Uma de que o perfil de resposta observado nesses indivíduos seja compatível com uma posterior evolução clínica favorável a cura, ou que esse perfil esteja associado ao mau prognóstico, predispondo esses indivíduos a apresentarem no futuro episódios de reativação da doença ou mesmo evoluir para forma mucosa. O período recomendado para o acompanhamento clínico é de cinco anos, pois esse parece ser o período com maior probabilidade de ocorrer uma reativação ou desenvolvimento para a forma mucosa (Oliveira et al, 1995). No entanto, na prática clínica, esse acompanhamento por longo tempo se torna difícil, pois muitos dos pacientes deixam de retornar ao centro médico para as avaliações de rotina. Dessa forma, seria interessante que fossem desenvolvidos parâmetros clínicos ou laboratoriais que permitissem prever o risco de evoluções desfavoráveis.

Após a cura clínica da LTA a persistência parasitária tem sido descrita em uma série de casos em que a presença do parasito foi confirmada através de isolamento em cultura axênica ou pela detecção de DNA de *Leishmania* através da PCR (Schubach et al, 1998; Mendonça et al, 2004; Oliveira-Camara et al, 2006). Dessa forma, a persistência do parasito mesmo após a cura clínica remete ao fato de que os indivíduos mantêm uma resposta imunológica específica aos antígenos de *Leishmania*. Embora os mecanismos efetores que participam do controle do parasito possam ter tanto a participação tanto da resposta imune humoral quanto da resposta imune celular, os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ são classicamente descritos como elementos fundamentais em infecções por patógenos intracelulares (Bogdan, 2008). Eles exercem sua função tanto pela modulação da resposta quanto por efeitos citotóxicos na eliminação de células consideradas fontes de infecção.

O objetivo de se determinar um padrão de resposta imunológica associado à proteção contra *Leishmania*, pode ser melhor alcançado se avaliados indivíduos que evoluíram para a cura clínica e a mantiveram por um longo período de tempo. Este estudo torna-se possível visto que a história natural da infecção por *Leishmania* resulta em grupos de indivíduos que, do ponto de vista clínico, apresentam um prognóstico favorável, como os indivíduos assintomáticos, de cura espontânea ou mesmo aqueles curados longo tempo após o tratamento sem histórico de reativação da doença.

Nesse contexto, este trabalho teve como objetivo investigar perfis fenotípicos de linfócitos T de pacientes curados de leishmaniose cutânea (LCC), com até cinco anos de cura. Esses perfis fenotípicos foram avaliados tanto em células mononucleares do sangue periférico (CMSP) *ex vivo*, quanto em CMSP estimuladas *in vitro* com o antígeno de *L. braziliensis*. O estímulo antigênico *in vitro* teve por

objetivo mimetizar uma reativação ou reinfecção pelo parasito, permitindo verificar aspectos associados à resposta imunológica mediante a uma re-estimulação.

Uma das formas de avaliar a re-estimulação é através de ensaios *in vitro* para estudar a linfoproliferação. Ao se tornarem ativados, ou seja, após receberem sinalizações via complexos MHC-antígeno-TCR e moléculas co-estimuladoras, os clones de linfócitos virgens sofrem modificações fenotípicas e são induzidos a realizarem múltiplas mitoses, processo que é denominado expansão clonal. Também, os clones de linfócitos antígeno específicos já primados e que estejam em estado de repouso, podem retomar sua atividade proliferativa após um novo contato com uma APC que tenha processado e exposto o epítipo específico.

No estudo da leishmaniose, a avaliação da capacidade respondedora de linfócitos a antígenos foi muito estudada através da resposta proliferativa de linfócitos (RPL) aos antígenos de *Leishmania*, utilizando-se como parâmetro tanto a contagem por minuto (cpm) quanto o índice de estimulação (IE). Castés e colaboradores (1983) demonstraram que pacientes com LM durante a fase ativa têm níveis de RPL significativamente mais elevados do que os observados na LC. No entanto, Conceição-Silva e colaboradores (1990) não observaram uma correlação entre os IEs da RPL e as formas clínicas da leishmaniose (LC e LM). A RPL também já foi estudada em pacientes na fase pós-tratamento. Toledo e colaboradores (2001) descreveram que a RPL é mais alta em pacientes LC antes do tratamento, quando comparado com pacientes após o término do tratamento. Da-Cruz e colaboradores (1994) demonstraram uma tendência de declínio dos IEs comparando antes e depois do tratamento, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa. Já Mendonça e colaboradores (1986) descreveram que o IE da RPL é maior em pacientes durante o tratamento, quando comparado com pacientes antes e após o término do tratamento. Esse apanhado de trabalhos que fazem menção à RPL antes e após o tratamento demonstra a dificuldade em associar esse parâmetro de proliferação celular com o status clínico apresentado pelo paciente. Além disso, esses artigos também demonstram que, de forma geral, existe uma grande variação da intensidade da RPL dentro de um mesmo grupo de pacientes analisados.

O atual estudo demonstrou que a RPL de indivíduos curados de LTA foi positiva e que, como esperado, os linfócitos dos indivíduos saudáveis não responderam aos antígenos parasitários. Independente do tempo de cura dos pacientes, os linfócitos foram capazes de responder mediante aos antígenos de *Leishmania*, realizando a ciclagem celular. No entanto, houve uma grande variação em torno dos valores médios de IE, tanto no grupo de indivíduos com tempo de cura menor de dois anos (<2 anos) quanto nos indivíduos entre 2 e 5 anos. Um elevado IE na RPL pode indicar que poucos clones de células T apresentaram uma elevada capacidade proliferativa ou que muitos clones de células

T possam estar proliferando pouco frente ao estímulo antigênico. Nesse caso, os dados da RPL parecem não ser muito úteis para avaliar a magnitude de resposta dos linfócitos frente aos antígenos ou auxiliar na caracterização da funcionalidade dessas células. Essa técnica nos mostra a capacidade das mesmas em retomar a divisão celular frente aos antígenos sem, no entanto, mensurar a frequência de células que de fato estão respondendo aos antígenos. A estimativa da frequência de células capazes de responder ao estímulo através de ensaios de análise de diluições limitantes seria uma estratégia interessante para abordar esta questão (Dórea et al, 1988; Conceição-Silva et al, 1990). No entanto, nesse trabalho, não foi estimada a frequência de células capazes de responder ao estímulo ou caracterizadas quais as células que contribuíram para as elevadas taxas de replicação celular.

Como a intensidade de proliferação linfocitária não foi capaz de discriminar pacientes com cura recente e tardia, passou-se a analisar se o tempo de cura levaria a modificações fenotípicas relacionadas à funcionalidade dos linfócitos respondedores ao Ag-Lb que contribuíram para as elevadas taxas de replicação celular, comparando-os com os linfócitos circulantes do sangue periférico de pacientes LCC (células *ex vivo*).

Inicialmente, foram avaliados os percentuais das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos pacientes LCC. A média da razão T CD4⁺/T CD8⁺ foi similar nas células *ex vivo* e nas células estimuladas *in vitro* com Ag-Lb, e o percentual de linfócitos T CD4⁺ reativos à *Leishmania* foi maior em relação às células T CD8⁺ reativas. Esses resultados estão de acordo com publicações prévias em que foi avaliado o percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ reativas à *Leishmania* em pacientes LC entre um ano e 17 anos após a cura. Enquanto pacientes de LC, durante a fase ativa, apresentavam uma indução preferencial de linfócitos T CD4⁺ em relação aos T CD8⁺, ao final do tratamento, houve um aumento de linfócitos T CD8⁺. Entretanto, longo tempo após o tratamento o percentual de linfócitos T CD4⁺ volta a ser superior aos de linfócitos T CD8⁺ (Da-Cruz et al, 2002). Estes dados sugeriram que embora não houvesse mudança no fenótipo linfocitário, certamente as células que se expandiam na fase ativa eram funcionalmente diferentes daquelas que se mantinham na reposta duradoutra.

Assim, visto que os linfócitos de pacientes LCC mantêm a capacidade em proliferar frente aos antígenos de *Leishmania*, foram avaliados os perfis fenotípicos associado à ativação nessas células.

A avaliação do grau de ativação de linfócitos T vem sendo estudada em pacientes com a forma ativa da leishmaniose. Pacientes com a forma mucosa (LM) apresentam maior percentual de células ativadas, além de uma maior produção de citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α), quando comparados aos pacientes com LC. Esses dados corroboram com o modelo da patogênese característico da LM, com a presença de uma resposta imune exacerbada (Bacellar et al, 2002; Da-Cruz et al, 2002; Faria et al, 2005; Gaze et al, 2006; Carvalho et al, 2007).

Nesse estudo, foi observado que pacientes de leishmaniose cutânea após a cura clínica (LCC) apresentam no sangue periférico um elevado grau de ativação linfocitária após o estímulo Ag-Lb, o que foi avaliado através da expressão de moléculas CD69 e CD25 na superfície de linfócitos T. Isso significa que os pacientes, mesmo após a cura clínica, possuem células respondedoras capazes de reconhecer o antígeno de *Leishmania* corroborando com os dados anteriormente discutidos sobre a RPL. Essas células antígeno-específicas ao entrarem novamente em contato com o antígeno, reconhecem o mesmo e são induzidas a modificarem seu padrão fenotípico de superfície, incluindo a expressão das moléculas associada à ativação.

Normalmente essas moléculas associadas à ativação são expressas obedecendo à ordenação de sinais que são disparados por um determinado estímulo, como por exemplo, o reconhecimento do antígeno pelo complexo do receptor de célula T (TCR). A expressão da molécula CD69 ocorre de forma precoce e é disparada mediante a sinalização via CD3 e TCR, que induzem a transdução de sinal para o início da transcrição do gene que codifica para esta molécula. A partir desse momento, uma ou duas horas após o início do processo de ativação, a molécula CD69 passar a ser detectada na membrana plasmática do linfócito, onde permanece por pelo menos três dias (Ziegler, Ramsdekk & Alderson, 1994).

No presente estudo não foi realizado um experimento para avaliar a influência do tempo de incubação com Ag-Lb na expressão dessas moléculas. A idéia principal foi de verificar o fenótipo desses linfócitos após tempo suficiente para que o processo de ativação pudesse ocorrer em sua totalidade. Dados prévios da literatura estabeleceram por meio de outros parâmetros de ativação como produção de citocinas (como IFN- γ) e proliferação de linfócitos, que o pico máximo seria o tempo de cinco dias de cultivo frente ao Ag-Lb (Mendonça et al, 1986; Da-Cruz et al, 2002; Bittar et al, 2007; Gomes-Silva et al, 2007).

Nossos resultados mostram que em um tempo de cura mais recente (menor que 2 anos), as células *ex vivo* (T CD4⁺ e TCD8⁺) parecem ter um grau de ativação maior no sangue periférico, principalmente quando avaliada a molécula CD69. A presença de células T *ex vivo* CD4⁺CD69⁺ em indivíduos com lesão ativa de LC correlaciona positivamente com o tamanho das lesões, como já foi demonstrado anteriormente (Antonelli et al, 2005). Esse fato indica uma evidência de que a lesão cutânea causada pela *Leishmania*, mesmo sendo localizada na pele, leva a uma ativação que pode ser detectada sistemicamente, como por exemplo, no sangue periférico. De forma curiosa, no presente trabalho, esse grau de ativação foi observado mesmo após a cura clínica, tendendo a uma diminuição com o aumento do tempo de cura.

Quando as células foram estimuladas *in vitro*, foi observado um aumento do grau de ativação tanto para T CD4⁺ quanto para T CD8⁺ em relação às células *ex vivo*, avaliando-se a expressão das moléculas de superfície CD25 e CD69. No entanto esse aumento foi mais intenso naqueles indivíduos com menos de 2 anos de cura clínica. Estes dados em conjunto, sugerem que a capacidade de ativação das células reativas à *Leishmania* que permanecem na periferia se reduz com o aumento do tempo de cura, principalmente nas células T CD8⁺. Alguns autores apontam os linfócitos T CD8⁺ como importantes elementos no processo de controle de patógenos intracelulares com capacidade de persistirem mesmo após a cura clínica estabelecida (Da-Cruz et al, 1994; Coutinho et al, 1998; Bertho et al, 2000; Belkaid et al, 2001).

O tempo de cura dos indivíduos LCC foi correlacionado negativamente com percentual de células CD69⁺ reativas, tanto em T CD4⁺ quanto em T CD8⁺. Resultados similares foram obtidos para a molécula CD25. Houve uma correlação negativa entre o tempo de cura dos pacientes e o percentual de células CD25⁺ em T CD8⁺, mas não em T CD4⁺, embora haja uma tendência de diminuição da ativação nessas células T CD4⁺. Uma hipótese para entender essa diminuição do grau de ativação seria que, com o aumento do tempo de cura clínica, esteja ocorrendo uma redução do número de parasitos persistentes e uma consequente redução da fonte de antígenos. Dessa forma, muitas das células T de memória efetoras específicas ao Ag-Lb, cuja sobrevivência depende da contínua estimulação antigênica, deixariam de circular no sangue periférico desses indivíduos curados (Zaph et al, 2004). Essa diminuição do número de parasitos persistentes poderia ocorrer em indivíduos que não residem ou não freqüentam áreas endêmicas, tendendo a um menor contato com antígenos do parasito. Também existe a possibilidade desses indivíduos residirem em áreas consideradas endêmicas, onde ocorrem baixos índices de transmissão da *Leishmania*. No entanto, existem dificuldades para a mensuração com precisão da carga parasitária dos indivíduos com a forma tegumentar da doença, o que pode ser feito por técnicas moleculares como a PCR em tempo real.

A diminuição das taxas de células ativadas nos indivíduos com maior tempo de cura está coerente com os dados referentes à quantificação das células de memória, em que foi observado um número reduzido de células T CD4⁺ expressando a molécula CD45RO nos indivíduos com maior tempo de cura clínica. Por outro lado, essa associação não foi tão clara para os linfócitos T CD8⁺. Antonelli e colaboradores (2004) encontraram uma correlação positiva entre o percentual de células CD4⁺CD45RO⁺ e o percentual de células produtoras de IFN- γ e IL-10, avaliando células *ex vivo* de pacientes com LC ativa. Isso demonstra que a presença de células de memória com capacidade de produzir citocinas pode ter um papel importante na indução de uma resposta de proteção à reinfecção.

A duração da memória parece ser extremamente influenciada pela magnitude da resposta imune inicial. Embora essas células de memória sejam de longa duração, a exaustão clonal pode limitar a duração da memória, pois a capacidade de proliferação de células somáticas é finita e limitada pelo encurtamento do telômero a cada divisão celular. Cada vez que a célula se divide, os telômeros são ligeiramente encurtados. Sendo assim, os telômeros chegam a um ponto em que, de tão encurtados, não permitem mais a correta replicação dos cromossomos e a célula perde completa ou parcialmente a sua capacidade de divisão (Beverley, 2008).

No contexto da avaliação da memória imunológica, são descritos dois subtipos celulares: célula de memória central (T_{MC}) e de memória efetora (T_{ME}). As células T_{MC} parecem ter uma maior capacidade de persistir *in vivo* em relação às células T_{ME} (Lanzavecchia & Sallusto, 2005). Parte dessa evidência pode ser explicada pelo fato das células T_{MC} terem telômeros mais longos que as células T_{ME} , indicando que esses clones de células T_{MC} promovem uma reserva de longa sobrevivência (Beverley, 2008). No sentido de se avaliar que tipo de célula de memória duradoura é expandida na leishmaniose, estudou-se o grau de diferenciação periférica de linfócitos T.

No presente trabalho, foi observada uma considerável proporção de células *ex vivo* T_{MC} em relação às células T_{ME} , tanto na subpopulação de linfócitos T $CD4^+$ quanto em T $CD8^+$. Adicionalmente, após o estímulo *in vitro*, houve uma diminuição não significativa de células de MC e um aumento de células de ME, em células T $CD4^+$ e em células T $CD8^+$. Há várias evidências de que essas subpopulações de linfócitos de memória têm um comportamento dinâmico quando estimuladas antigênicamente. Foi observado em um paciente com hepatite C, que o cultivo *in vitro* de CMSPs com peptídeo viral por dias até 15 dias, demonstrou uma diminuição de células T $CD8^+$ de MC e um aumento de células T $CD8^+$ ME (Sobao et al, 2001). Esses dados estão de acordo com a idéia de que as células de MC após o contato com o antígeno específico, geram células de ME que irão atuar no controle do patógeno.

Após o estímulo com Ag-Lb, em 7 dos 11 pacientes o aumento de células T $CD4^+$ de ME foi superior a duas vezes, enquanto nas células T $CD8^+$ de ME esse aumento ocorreu em 9 dos 11 pacientes LCC analisados. O aumento da memória efetora poderia estar relacionado a um bom ou mau prognóstico. A um bom prognóstico porque esses pacientes que apresentaram um aumento de células T_{ME} , no caso de encontrarem novamente o parasito, seriam eficientes na sua eliminação através de mecanismos efetores. Por outro lado, poderia ser um prognóstico ruim visto que na LC ativa, as lesões apresentam altos percentuais de células T $CD4^+$ e T $CD8^+$ de ME. Essas células T_{ME} podem estar contribuindo com a destruição tecidual através de suas atividades citolíticas (Brodsky et al, 1997; Machado et al, 2002; Faria et al, 2009; Mendes-Aguiar, 2010).

No contexto da persistência de células efetoras com possível potencial citotóxico, foi avaliada a molécula C1.7 (CD244). Essa molécula é relacionada à citotoxicidade e tem sido sugerida como um importante marcador de ativação de células T CD8⁺ em resposta ao estímulo antigênico *in vivo* no HIV (Peritt et al, 1999). Recentemente, foi encontrado que na lesão de leishmaniose existem elevados níveis de células T CD8⁺/C1.7⁺, sugerindo uma função efetora citotóxica *in situ* (Da-Cruz et al, 2010; Mendes-Aguiar, 2010). Também foram evidenciados altos níveis de Tia-1, uma outra molécula associada à citotoxicidade, nas lesões pacientes com leishmaniose cutânea (Machado et al, 2002). Além disso, indivíduos na fase aguda de dengue têm altos níveis de ativação e de citotoxicidade, também avaliada pela molécula Tia-1, quando comparado com indivíduos na fase convalescente da dengue e controles sadios (Azeredo et al, 2006).

No atual estudo não foi visto um aumento de células T CD8⁺ com esse fenótipo após o estímulo com Ag-Lb. As células poderiam expressar a molécula C1.7 na superfície, mas não exercerem uma função citotóxica. Para comprovar essa hipótese, seria necessária a utilização de outros marcadores relacionados à citotoxicidade, como a molécula Tia-1, ou quantificação de granzima e perforina, ou, de forma mais precisa, por ensaios funcionais utilizando células alvo e células efetoras (Brodskyn et al, 1997). Por outro lado, pode ser favorável para o hospedeiro não ter um aumento de células citotóxicas após estímulo com o antígeno, pois estas podem estar contribuindo para a formação de um infiltrado inflamatório intenso responsável pelo dano tecidual no caso de uma reinfeção ou reativação.

A ativação de células T leva a mudanças na expressão de moléculas de adesão, conseqüentemente influenciando a migração e o recrutamento de células para os sítios efetores (Costa et al, 2003). A molécula CLA é expressa em linfócitos, mas também em outros tipos celulares como células NK, neutrófilos, monócitos e células dendríticas (Kieffer et al, 2001). O antígeno CLA está presente em mais de 90% dos linfócitos T de infiltrados em reações inflamatórias. No sangue periférico, cerca de 15% dos linfócitos T expressam essa molécula (Santamaria-Babí, 2004).

Para que a célula consiga migrar para o sítio inflamatório da pele, é necessário que haja a ligação do CLA à E-selectina presente nas células do endotélio vascular ativado. A expressão do CLA vem sendo associada à patogênese ou gravidade de muitas doenças cutâneas como dermatite atópica (Antúnez et al, 2004), psoríase (Sigmundsdóttir et al, 2001) e hanseníase (Sieling et al, 2007). Na LC ativa, o percentual de linfócitos T CLA⁺ é maior nas lesões do que no sangue periférico, tanto para CD4⁺ quanto para CD8⁺. Além disso, os antígenos de *Leishmania* são capazes de regular positivamente o CLA nessas duas subpopulações de células T (Mendes-Aguiar et al, 2009).

O atual estudo mostrou que em indivíduos LCC, a expressão da molécula de superfície CLA que não aumentou após o estímulo antigênico, tanto dentro da subpopulação de linfócitos T CD4⁺

quanto em T CD8⁺. Esses resultados estão de acordo com os apresentados no artigo de Mendes-Aguiar e colaboradores (2009) (**Anexo**).

De forma geral, foi visto que com o aumento do tempo de cura há uma redução do grau de ativação linfocitário e que após o estímulo com antígeno de Ag-Lb, há um aumento de linfócitos T de ME. Se a diminuição da ativação ocorre nesse período de cinco anos, fica a questão do tempo que essas células seriam capazes de responder se não houvesse uma nova apresentação de antígenos. Esse dado pode ter uma implicação direta no esquema de vacinação, no que diz respeito à quantidade de antígenos e doses necessárias de *booster* antigênico. Adicionalmente, as células estimuladas *in vitro* não possuem uma molécula relacionada à citotoxicidade ou à migração para a pele, o que pode ser favorável no sentido de uma possível diminuição do dano tecidual no caso de uma reinfecção ou reativação da doença.

Considerando que a maioria dos pacientes de leishmaniose adquire uma resistência a novas infecções, o padrão das suas respostas imunes mediadas por células T deve ser associado com um efeito imunoprotetor. Assim, um candidato antigênico para uma futura vacina deve induzir respostas de células T *in vitro* similares às observadas em pacientes curados. Isso pode ser considerado um parâmetro importante para a seleção de antígenos candidatos para uma vacina.

8. CONCLUSÕES:

- Os linfócitos de pacientes curados de leishmaniose cutânea mantêm a capacidade de responder aos antígenos de *Leishmania*, sem que haja diferença da intensidade proliferativa nos diferentes tempos de cura. Entretanto, na medida em que aumenta o tempo de cura clínica, há uma redução de moléculas associadas à ativação tanto em linfócitos T CD4⁺ quanto em T CD8⁺. Estes dados indicam que após a cura clínica estável, há uma redução gradativa da capacidade dos linfócitos específicos serem ativados por antígenos parasitários.
- Indivíduos clinicamente curados de leishmaniose cutânea têm uma indução preferencial de linfócitos T CD4⁺ reativos à *Leishmania* em relação ao T CD8⁺. No entanto, o estímulo antigênico leva ao aumento de células de memória efetora em ambas as subpopulações, enquanto os percentuais de células de memória central se mantêm. Estes dados mostram que após a cura clínica, há uma manutenção da capacidade de gerar uma resposta efetora, podendo esta controlar a infecção.
- Após o estímulo por *Leishmania*, as células expandidas não têm aumento da expressão de moléculas na superfície relacionadas à citotoxicidade (C1.7) ou à migração para a pele (CLA). Assim, estes linfócitos específicos poderão exercer atividade citotóxica e seu direcionamento para a pele pode ocorrer por outras moléculas de migração.

Conjuntamente, os dados sugerem que esse perfil fenotípico de linfócitos T que compõe a imunidade duradoura na leishmaniose cutânea deve ser associado a uma resposta benéfica, possivelmente capaz de controlar a infecção sem causar dano tecidual. Estes dados podem auxiliar no rastreamento de moléculas candidatas a vacinas para a leishmaniose.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas AK, Lichtman AH. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Philadelphia: Elsevier Science; 2003.
2. Alexander J, Satoskar AR, Russel DG. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. Journal of Cell Science 1999; 112:2993-3002.
3. Almeida JR, Sauce D, Price DA, Papagno L, Shin SY, Moris A, Moris A, Larsen M, Pancino G, Douek DC, Autran B, Sáez-Ciri3n A, Appay V. Antigen sensitivity is a major determinant of CD8⁺ T-cell polyfunctional and HIV-suppressive activity. Blood 2009; 25: 6351-6360.
4. Alter A, Teigen N, Ahern R, Streeck H, Meier A, Rosenberg ES, Altfeld M. Evolution of innate and adaptive effector cell functions during acute HIV-1 infection. The Journal of Infectious Diseases 2007; 195:1452-1460.
5. Amato VS, Tuon FF, Bacha HA, Neto VA, Nicodemo AC. Mucosal leishmaniasis: current scenario and prospects for treatment. Acta Tropica 2008; 105:1-9.
6. Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis*-infected macrophages maintain an acidic pH. Infection and Immunity 1990; 58:779-787.
7. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Gollob KJ. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. Clinical and Experimental Immunology 2004; 136:341-348.
8. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. Immunology Letters 2005; 101:226-230.
9. Antonelli LRV, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KCL, Guimar3es LH, Bacellar O, Gollob KJ. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4⁻ CD8⁻) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. Infection and Immunity 2006; 74(11):6317-6323.
10. Ant3nez C, Torres MJ, Mayorga C, Cornejo-Garcia JA, Santamar3a-Babi LF, Blanca M. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen⁺ T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. Clinical and Experimental Allergy 2004; 34:559-566.

11. Azeredo EL, Zagne SMO, Alvarenga AR, Nogueira RMR, Kubelka CF, Oliveira-Pinto LM. Activated peripheral lymphocytes with increased expression of cell adhesion molecules and cytotoxic markers are associated with dengue fever disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2006; 101(4):437-449.
12. Azeredo-Coutinho RBG, Conceição-Silva F, Schubach A, Cupolillo E, Quintella LP, Madeira MF, Pacheco RS, Valete-Rosalino CM, Mendonça SCF. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro state, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2007; 101:735-737.
13. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, de Jesus AM, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infection and Immunity* 2002; 70(12):6734-6740.
14. Bates PA, Rogers ME. New insights into developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Current Molecular Medicine* 2004; 4:601-609.
15. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *International Journal for Parasitology* 2007; 37:1097-1106.
16. Belkaid Y, Hooffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. 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. *Journal of Experimental Medicine* 2001; 194(10):1497-1506.
17. Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4⁺ and CD8⁺ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 2000; 33(3):317-325.
18. Beverley PCL. Primer: making sense of T-cell memory. *Nature Clinical Practice Rheumatology* 2008; 4(1):43-49.
19. Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2007; 102(5):625-630.
20. Bogdan C. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cellular Microbiology* 2008; 10(6):1221-1234.
21. Bour-Jordan H, Bluestone JA. CD28 function: a balance of costimulatory and regulatory signals. *Journal of Clinical Immunology* 2002; 22(1):1-7.

22. Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 1997; 159:4467-4473.
23. Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC, Wu L. CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *The Journal of Immunology* 2001; 166:877-884.
24. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JLM, Reed S, Rocha H. Cell mediated immunity in American Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. *The Journal of Immunology* 1985; 135(6):4144-4148.
25. Carvalho EM, Correia Filho D, Bacellar O, Almeida RP, Lessa H, Rocha H. Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995; 53(3):273-277.
26. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhães A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, Ribeiro-de-Jesus A. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunology* 2007; 29:251-258.
27. Castellano LR, Correia Filho D, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. *Human Immunology* 2009; 70:383-390.
28. Castés M, Agnelli A, Rondon AJ. Characterization of the immune response in American Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical Immunology and Immunopathology* 1983; 27:176-186.
29. Castés M, Agnelli A, Rondon AJ. Mechanisms associated with immunoregulation in human American Cutaneous Leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 1984; 57:279-286.
30. Conceição-Silva F, Dórea RCC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 1990; 79:221-226.
31. Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, Rondon AJ. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1993; 87:444-448.

32. Costa RP, Gollob KJ, Machado PRL, Bacellar OAR, Almeida RP, Barral A, Barral-Netto M, Carvalho EM, Dutra WO. 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* 2003; 90:155-159.
33. Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31:139-142.
34. Coutinho SG, Pirmez C, Da-Cruz AM. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2002; 96(S1):173-178.
35. Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infection and Immunity* 1994; 62(6):2614-2618.
36. Da-Cruz AM, Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SCF, Coutinho SG. Tumor necrosis factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1996; 91(2):225-229.
37. Da-Cruz AM, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Coutinho Z, Machado ES, Coutinho SG. Cellular immune responses to *Leishmania braziliensis* in patients with AIDS-associated American cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2000; 94:569-571.
38. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG. T-cell mediated immune response in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* 2002; 9(2):251-256.
39. Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Coura JR. *Dinâmica das Doenças Infecciosas*. 1^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 697-712.
40. Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to *Leishmania* and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *Journal of Investigative Dermatology* 2010 (em impressão).
41. Descoteaux A, Turco S. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta* 1999; 1455:341-352.

42. Dórea RCC, Coutinho SG, Sabroza PC, Hendriks J, Cysne L, Conceição-Silva F. Quantification of *Leishmania*-specific T cells in human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania braziliensis braziliensis*) by limiting dilution analysis. *Clinical and Experimental Immunology* 1988; 71:26-31.
43. Dutton RW, Bradley LM, Swain SL. T cell memory. *Annual Review of Immunology* 1998; 16:201-223.
44. Esser MT, Marchese RD, Kierstead LS, Tussey LG, Wang F, Chirmule N, Washabaugh MW. Memory T cells and vaccines. *Vaccine* 2003; 21:419-430.
45. Falqueto A, Sessa PA, Verjão JBM, Barros GC, Momen H, Grimaldi Jr G. Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* in Espírito Santo State, Brazil. Further evidence on the role of dogs as a reservoir of infection for humans. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1991; 86(4):499-500.
46. Fan Z, Zhang Q. Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity. *Cellular and Molecular Immunology* 2005; 2(4):259-264.
47. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa Jr J, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO. Decreased *in situ* expression of the interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytokine responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2005; 73(12):7853-7859.
48. Faria DR, Souza PEA Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO. Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology* 2009; 31:432-439.
49. Fukada K, Sobao Y, Tomiyama H, Oka S, Takiguchi M. Functional expression of the chemokine receptor CCR5 on virus epitope-specific memory and effector CD8⁺ T cells. *The Journal of Immunology* 2002; 168:2225-2232.
50. Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimarães LH, de Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nobalanced monocyte population. *Scandinavian Journal of Immunology* 2006; 63:70-78.
51. Gollob KJ, Antonelli LRV, Dutra WO. Insights into CD4⁺ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends in Parasitology* 2005; 21(8):347-350.
52. Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, Keesen TSL, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4⁺CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *International Immunopharmacology* 2008; 8:1338-1343.

53. Gomes-Silva A, Bittar RC, Nogueira RS, Amato VS, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG, Da-Cruz AM. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clinical and Experimental Immunology* 2007; 149:440-444.
54. Grewal IS, Flavell RA. The role of CD40 ligand in costimulation and T-cell activation. *Immunological Reviews* 1996; 153:85-106.
55. Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1989; 41:687-725.
56. Gumy A, Louis JA, Launois P. 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* 2004; 34(4):433-444.
57. Hamann D, Baars PA, Rep MHG, Hooibrink B, Kerkhof-Garde SR, Klein MR, Van Lier RAW. Phenotypic and functional separation of memory and effector CD8⁺ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 1997; 186(9):1407-1418.
58. Heinzl FP, Sadick MD, Mutha SS, Locksley RM. Production of interferon- γ , interleukin-2, interleukin-4, and interleukin-10 by CD4⁺ lymphocytes *in vivo* during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 1991; 88:7011-7015.
59. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença*. 5^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2002.
60. Jones TC, Johnson WD, Barreto AC, Lago E, Badaró R, Cerf B, Reed SG, Netto EM, Tada MS, Franca F, Wiese K, Golisgty L, Fikrig E, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD. Epidemiology of American Cutaneous Leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *The Journal of Infectious Diseases* 1987; 156(1): 73-83.
61. Kieffer JD, Fuhlbrigge RC, Armending D, Robert C, Ferenczi K, Camphausen RT, Kupper TS. Neutrophils, monocytes, and dendritic cells express the same specialized form of PSGL-1 as do skin-homing memory T cells: cutaneous lymphocyte antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001; 285(3):577-587.
62. Lainson R, Shaw JJ. Evolution, classification and geographical distribution. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), *The leishmaniasis in biology and medicine*. Academic Press, London, v.I, 1987. p. 1-120.

63. Lanzavecchia A, Sallusto F. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Current Opinion in Immunology* 2005; 17:326-332.
64. Laskay T, Zandbergen GV, Solbach W. Neutrophils granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology* 2003; 11:210-214.
65. Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunology Letters* 1999; 65:101-104.
66. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry* 1951; 193(1):265-275.
67. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of *in situ* cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *European Journal of Dermatology* 2002; 12(5):449-451.
68. Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Lago EL, Cuba CC, Barreto AC, Costa JM, Jones TC. Human mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia – Brazil. An area of *Leishmania braziliensis braziliensis* transmission. III. Mucosal disease presentation and initial evolution. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1984a; 17:179-186.
69. Marsden PD, Tada MS, Barreto AC, Cuba CC. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis braziliensis* skin ulcers. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 1984b; 78:561-562.
70. Mattos MS. O desafio para a realização de ensaios clínicos em leishmaniose tegumentar. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 2006; 39(S III):94-95.
71. Mendes-Aguiar CO. Moléculas associadas com a migração, memória imunológica e ativação em linfócitos de lesões de leishmaniose cutânea (Doutorado). 2010. *Biologia Parasitária*, IOC – Fiocruz, Rio de Janeiro.
72. Mendes-Aguiar CO, Gomes-Silva A, Nunes Jr E, Pereira-carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Da-Cruz AM. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Immunology* 2009; 157:377-384.
73. Mendonça MG, Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *The Journal of Infectious Diseases* 2004; 189(6):1018-1023.
74. Mendonça SC, Coutinho SG, Amendoeira RR, Marzochi MCA, Pirmez C. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clinical and Experimental Immunology* 1986; 64:269-276.

75. Moser M, Murphy KM. Dendritic cell regulation of Th1-Th2 development. *Nature Immunology* 2000; 1(3):199-205.
76. Netto EM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Costa JML, Cuba CC, Barreto AC, Badaró R, Johnson WD, Jones TC. 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* 1990; 84:367-370.
77. Oliveira MRF, Macêdo VO, Carvalho EM, Barral A, Marotti JG, Bittencourt A, de Abreu MVA, Orge MGO, Lessa HA, Marsden PD. Estudo evolutivo da leishmaniose mucosa (7 a 17 anos de seguimento) causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis* em Três Braços, Bahia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 1995; 28(4):325-332.
78. Oliveira-Camera P, Junger J, Espírito Santo Silva Pires F, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Fernandez P, Pirmez C. Haematogenous dissemination of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in human American tegumentary leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 2006; 100(12):1112-1117.
79. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. Treatment of American Cutaneous Leishmaniasis: a comparison between low dosage (5mg/kg/day) and high dosage (20mg/kg/day) antimony regimens. *Pathologie Biologie* 1997a; 45(6):496-499.
80. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil – an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *International Journal of Dermatology* 1997b; 36:463-468.
81. Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahim LR, Menezes CR, Pirmez C. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *International Journal of Dermatology* 2000; 39:506-514.
82. Peritt D, Sesok-Pizzini DA, Schretzenmair R, Macgregor RR, Valiante NM, Tu X, Giorgio T, Kamoun M. C1.7 antigen expression on CD8⁺ T cells is activation dependent: increased proportion of C1.7⁺CD8⁺ T cells in HIV-1-infected patients with progressing disease. *The Journal of Immunology* 1999; 162:7563-7568.
83. Pirmez C, Coutinho SG, Marzochi MCA, Nunes MP, Grimaldi Jr G. Canine American cutaneous leishmaniasis: a clinical and immunological study in dogs naturally infected with *Leishmania braziliensis braziliensis* in an endemic area of Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1988; 38(1):52-58.

84. Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American Cutaneous Leishmaniasis lesions. *The Journal of Immunology* 1990; 145(9):3100-3104.
85. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation* 1993; 91:1390-1395.
86. Pirmez C, Trajano VS, Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degrave W, Fernandes O. Use of PCR in diagnosis of Human American Tegumentary Leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Clinical Microbiology* 1999; 37(6):1819-1823.
87. Rey L. *Leishmania* e leishmaníases: os parasitos. In: *Parasitologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. p. 359-371.
88. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 1998; 31:143-148.
89. Rocha PN, Almeida RP, Bacellar O, de Jesus AR, Correia Filho D, Cruz Filho A, Barral A, Coffman RL, Carvalho EM. Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. *The Journal of Infectious Disease* 1999; 180:1731-1734.
90. Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* mice. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2(11):845-858.
91. Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 1999; 401:708-712.
92. Santamaria-Babí LF. CLA⁺ T cells in cutaneous diseases. *European Journal of Dermatology* 2004; 14:13-18.
93. Saravia NG, Valderrama L, Labrada M, Holguín AF, Navas C, Plama G, Weigle KA. The relationship of *Leishmania braziliensis* subspecies and immune response to disease expression in New World Leishmaniasis. *The Journal of Infectious Diseases* 1989; 159(4):725-735.
94. Schubach A, Marzochi MCA, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araújo ML, Oliveira ALC, Pacheco RS, Momen H, Conceição-Silva F, Coutinho SG, Marzochi KBF. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1998; 58(6):824-827.

95. Scott P, Pearce E, Cheever AW, Coffman RL, Sher A. Role of cytokines and CD4⁺ T-cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. *Immunological Reviews* 1989; 112:161-182.
96. Seder RA, Ahmed R. Similarities and differences in CD4⁺ and CD8⁺ effector and memory T cell generation. *Nature Immunology* 2003; 4(9):835-842.
97. Sharpe AH, Freeman GJ. The B7-CD28 superfamily. *Nature Reviews Immunology* 2002; 2(2):116-126.
98. Sieling PA, Legaspi A, Ochoa MT, Rea TH, Modlin RL. Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. *Immunology* 2007; 120:518-525.
99. Sigmundsdóttir H, Gudjónsson E, Jónsdóttir I, Lúdvíksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA⁺ CD8⁺ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clinical and Experimental Immunology* 2001; 126:365-369.
100. Sobao Y, Tomiyama H, Nakamura S, Sekihara H, Tanaka K, Takiguchi M. Visual demonstration of hepatitis C virus-specific memory CD8⁺ T-cell expansion in patients with acute hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33:287-294.
101. SVS/MS - Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde: Manual da Leishmaniose Tegumentar Americana 2^a ed. [2007]: www.saude.gov.br
102. Tao X, Constant S, Jorritsma P, Bottomly K. Strength of TCR signal determines the costimulatory requirements for Th1 and Th2 CD4⁺ T cell differentiation. *The Journal of Immunology* 1997; 159:5956-5963.
103. Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Sánchez MA. Epidermal immune privilege in American cutaneous leishmaniasis. In: *Molecular and immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis*. Texas: RG Landes Company; 1996. p. 139-152.
104. Toledo VPCP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MAP, da Costa CA, Genaro O, Pinto JA, Afonso LCC. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 2001; 96(1):89-98.
105. Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clinical Immunology* 2008; 128:442-446.
106. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in Northeastern Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 2002; 186:1829-1834.

107. Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJS, Oliveira MP, Rutowitsch MS, Da-Cruz AM. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *The International Society of Dermatology* 2008; 47:926-932.
108. Von Stebut E. Immunology of cutaneous leishmaniasis: the role of mast cells, phagocytes and dendritic cells for protective immunity. *European Journal of Dermatology* 2007; 17:115-122.
109. World Health Organization (WHO) [2004]: www.who.int
110. Wowk ME, Trapani JA. Cytotoxic activity of the lymphocyte toxin granzyme B. *Microbes and Infection* 2004; 6:752-758.
111. Zajtchuk JT, Casler JD, Netto EM, Grogl M, Neafie RC, Hessel CR, de Magalhães AV, Marsden PD. Mucosal leishmaniasis in Brazil. *Laryngoscope* 1989; 99(9):925-939.
112. Zandbergen GV, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *The Journal of Immunology* 2004; 173:6521-6525.
113. Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nature Medicine* 2004, 10:1104-1110.
114. Ziegler SF, Ramsdell F, Alderson MR. The activation antigen CD69. *Stem cells* 1994; 12:456-465.

10. ANEXO

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

C. de O. Mendes-Aguiar,*

A. Gomes-Silva,* E. Nunes Jr,*†

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

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

and A. M. Da-Cruz*†

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

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

Accepted for publication 27 April 2009

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

4365, Pavilhão Leônidas Deane sala 408,

Manguinhos, Rio de Janeiro-RJ, CEP

21040-900, Brazil.

E-mail: alda@ioc.fiocruz.br

Introduction

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

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

Summary

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

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

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

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

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

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

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

Materials and methods

Patients

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

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

Acquisition of mononuclear cells from blood and leishmaniasis lesions

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

In vitro stimulation of PBMC with *Leishmania braziliensis* antigens

PBMC (3×10^6 in a final volume of 2 ml) were cultured in 24-well flat-bottomed plates (Nunc, Roskilde, Denmark) with medium alone or in the presence of 5×10^6 disrupted *L. (V.) braziliensis* promastigotes (MHOM/BR/75/M2903). Cells were incubated for 5 days at 37°C in a humidified atmosphere of 5% CO₂. *L. braziliensis*-stimulated T cells were washed and adjusted to 3×10^6 /ml in PBSAz/FBS for phenotypical analysis.

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

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

Statistical analysis

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

Results

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

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

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

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

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

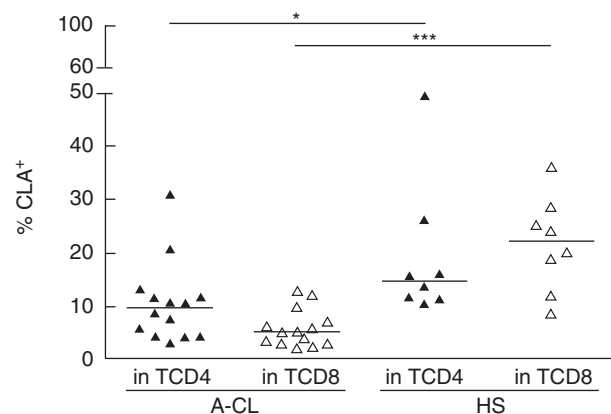


Fig. 1. *Ex vivo* analysis of cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) in peripheral blood cells from active cutaneous leishmaniasis patients (A-CL) and healthy subjects (HS). Comparison of CLA⁺ cells in T CD4⁺ (▲) and in T CD8⁺ (△) lymphocytes. Each point represents one individual and the short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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Discussion

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

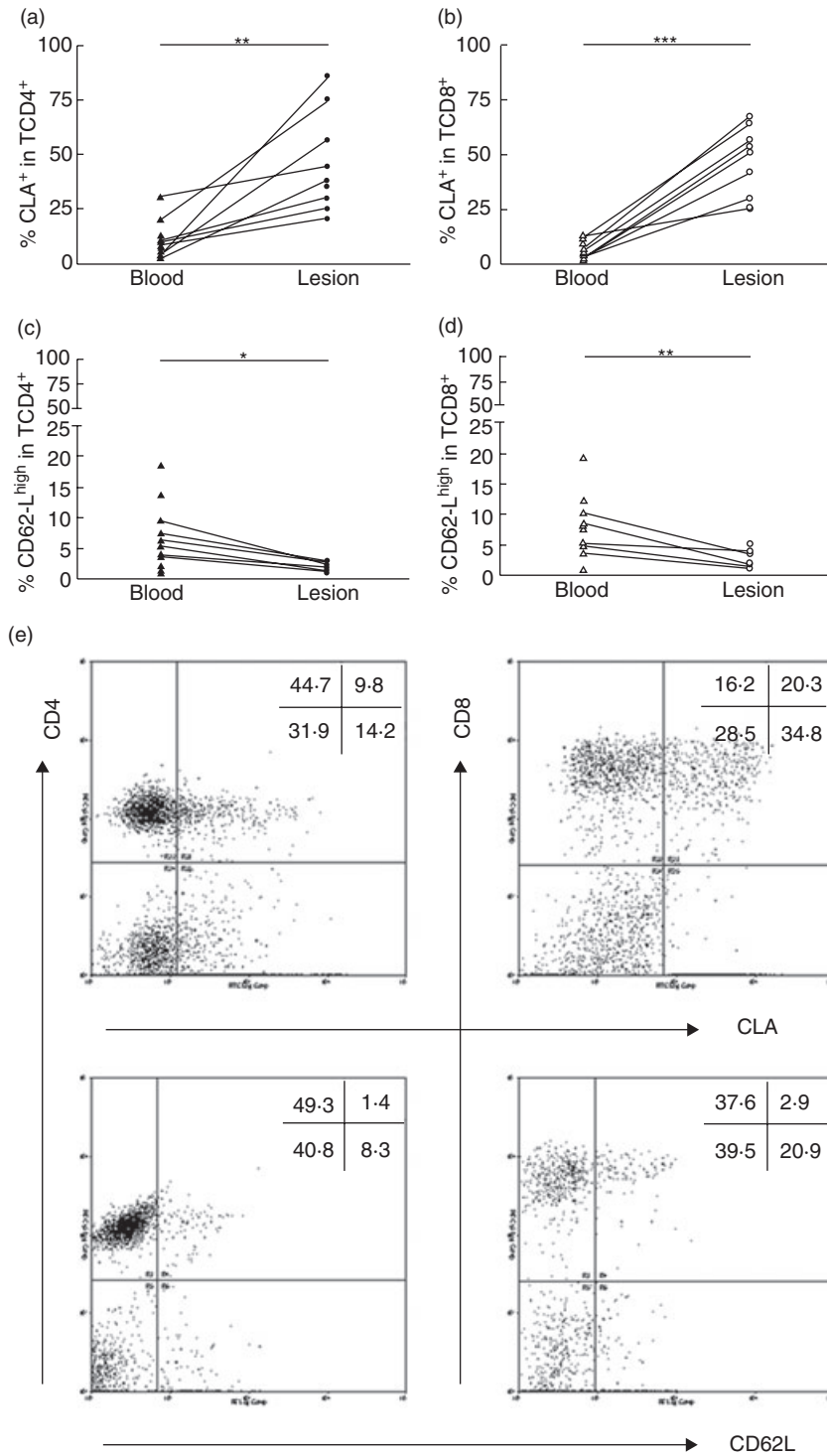


Fig. 2. *Ex vivo* analysis of cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) and CD62L in blood and lesions T cell subsets of lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients. The percentage of CLA (a, b) and CD62L^{high} (c, d) positive cells were analysed in T CD4⁺ (▲) or in T CD8⁺ (△) lymphocytes.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

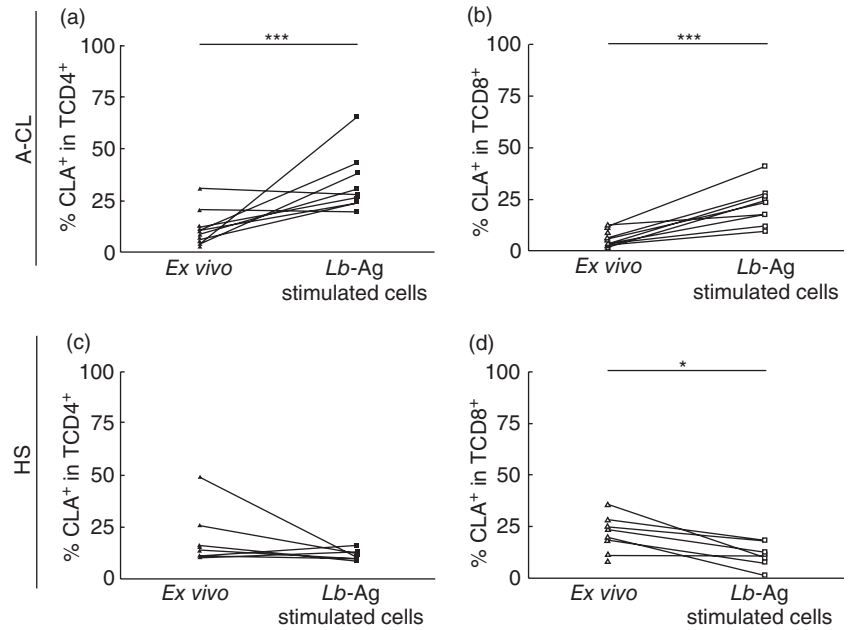


Fig. 3. Cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) but not CD62L molecules are up-regulated by *Leishmania*-antigens. CLA⁺ expression in *ex-vivo* and *Leishmania*-stimulated T CD4⁺ (▲) or T CD8⁺ (△) from cutaneous leishmaniasis patients (a, b) or healthy subjects (c, d). Each point represents one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

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

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

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

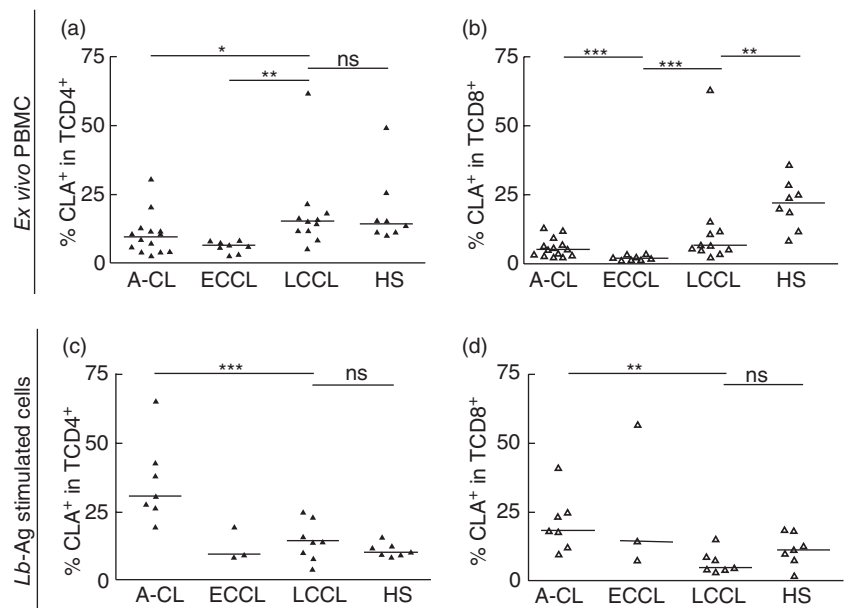


Fig. 4. Cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) molecules are differently expressed on CD4⁺ and CD8⁺ T cells during the clinical course of cutaneous leishmaniasis. Patients were evaluated during active cutaneous leishmaniasis (A-CL), after the end of therapy (early cured, ECCL), and 1 year after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

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

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

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

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

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

Acknowledgements

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

Disclosure

The authors have no financial conflicts of interest.

References

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

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