

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MUNIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS T CD4⁺ E CD8⁺
VB12 NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTE COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA
LOCALIZADA**

DANIELA RODRIGUES ANDRADE

**Salvador – Bahia
2016**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO GONÇALO MUNIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E FUNCIONAL DAS CÉLULAS T CD4+ E
CD8+ VB12 NA RESPOSTA IMUNE EM PACIENTE COM LEISHMANIOSE
CUTÂNEA LOCALIZADA**

DANIELA RODRIGUES ANDRADE

Orientador: Prof. Dr. Jorge Clarêncio de Souza Andrade

Tese apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para certificação do Doutorado.

Salvador – Bahia
2016

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Instituto Gonçalo Moniz/FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

A598c Andrade, Daniela Rodrigues
Caracterização fenotípica e funcional das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 na
resposta imune em paciente com Leishmaniose Cutânea Localizada / Daniela
Rodrigues Andrade. - 2016.
88 f.; 30 cm

Orientador: Dr. Jorge Clarêncio de Souza Andrade. Laboratório Integrado de
Microbiologia e Imunoregulação.

Tese (Doutorado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Faculdade de
Medicina. Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, 2016

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Linfócitos T. 3. Receptores de Antígenos de
Linfócitos T alfa-beta. 4. Receptores CCR7. 5. Antígenos CD45. I.Título.

CDU 616.993.161:577.27

FOLHA DE APROVAÇÃO

À David e Enedina, que em nenhum momento mediram esforços para realização dos meus sonhos, me guiaram pelos caminhos corretos, me ensinaram a fazer as melhores escolhas, me mostraram que a honestidade e o respeito são essenciais à vida, e que devemos sempre lutar pelo que queremos. A eles devo a pessoa que me tornei e tenho muito orgulho por chamá-los de pai e mãe.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Dr. Jorge Clarêncio, pelo acolhimento, dedicação, ensinamentos e exemplo de generosidade, demonstro toda minha gratidão por cada gesto de apoio e atenção dentro e fora do laboratório.

A Dra. Aldina Barral e ao Dr. Barral pelas observações e colaborações.

Aos Pesquisadores LIMI-LIP, Valéria Borges, Theolis Barbosa, Camila Indiani, Cláudia Brodskin, pelas valiosas contribuições e por proporcionar um ambiente de aprendizado.

A Dra. Marilda e aos demais que possibilitaram a experiência de colaborar com seus trabalhos e assim ampliar minha visão científica.

Aos colegas LIMI-LIP pelo prazer das discussões científicas e pelos momentos de descontração.

A estudante de iniciação científica, Lailla Farias, pela oportunidade de orientação.

A Claire Santos, Fabiana Celes, Juqueline Cristal e Natália Tavares pelas colaborações nas técnicas aplicadas no trabalho.

As Secretárias LIMI-LIP, Andrezza Kariny, Elze Leite e Juliana pelo ambiente saudável de trabalho e pela organização burocrática.

A Plataforma de Citometria do CPqGM, de forma especial a Liliane Monteiro e Rafaela Alves.

Aos colegas do curso de Pos-graduação por tornarem as cansativas discussões científicas em momentos agradáveis de aprendizado.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação pelos ensinamentos teóricos imprescindíveis para meu crescimento científico.

A banca de qualificação, Dra. Fernanda Grassi, Dr. Lucas Carvalho e Dr. Tiago Marconi pelas valiosas sugestões estruturais e científicas.

As minhas amigas, Bárbara Ribeiro, Fernanda Fraga, Lisiane Carvalho Naiane Sousa e Regina Ceerqueira pelo companheirismo, apesar da minha ausência física.

A Luis Alberto pela cumplicidade.

Aos primos e tios pelo incansável apoio aos meus pais, irmãs e sobrinho, na minha ausência.

Ao CPqGM e seus funcionários, principalmente a Biblioteca e Coordenação de Ensino do curso de Pós-Graduação em Patologia Humana.

Ao CNPq e FAPESB pelo incentivo financeiro.

“Necessitamos sempre ambicionar alguma coisa que, alcançada, não nos torne sem ambição.”

CARLOS DRUMMOND DE ANDRADE

ANDRADE, Daniela Rodrigues. **Caracterização fenotípica e funcional das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 na resposta imune em paciente com Leishmaniose Cutânea Localizada.** 88 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

RESUMO

As leishmanioses constituem um complexo de doenças causada pelo protozoário intracelular, do gênero *Leishmania*, sendo a resposta imune celular essencial para controle, eliminação e proteção contra a infecção. A teoria clonal da imunidade celular propõe que as respostas imunológicas são estabelecidas através do aumento na frequência de clones específicos ao antígeno. Para avaliar a resposta das células T à infecção por *Leishmania*, investigamos, por citometria de fluxo, a expressão de cadeias Vβ de receptores de células T (TCRs), estado de ativação, capacidade de adesão ao endotélio e potencial funcional de clones específico. Em um grupo de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), avaliamos diferentes subpopulações de células T através da expressão da região Vβ, no sangue periférico e na biópsia da lesão. Utilizamos células mononucleares de sangue periférico (CMSPs), de pacientes LCL e controles saudáveis, nas quais avaliamos, *ex vivo*, a expressão de moléculas de ativação (CD25, CD69 e HLA-DR), adesão (LFA-1, VLA-4 e CD62L), co-estimulatória (CD27 e CD28) e marcadores de memória (CCR7, CD45RA, CD45RO). *In vitro*, as CMSPs de pacientes com LCL foram estimuladas com SLA para avaliar a expansão do clone Vβ12 e a produção de citocinas intracelulares (IL-2, IFN-γ e TNF). Nossos resultados mostram: (1) diminuição no sangue das células T CD4⁺ que expressam Vβ2, Vβ5, Vβ12 e CD8⁺ Vβ5, Vβ12, Vβ14 nos pacientes com LCL quando comparado com os controles saudáveis; (2) um perfil de ativação prévia de células T CD4⁺ Vβ2, Vβ5 e CD8⁺ Vβ5, Vβ14, com expressão mais elevada HLA-DR, enquanto que o clone Vβ12 apresentou diferentes níveis de ativação; (3) uma correlação positiva entre as frequências das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12⁺ ativadas e o tamanho das lesões; (4) alta expressão de moléculas de adesão, indicando direcionamento das células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando Vβ12 para o local da lesão, confirmado através da (5) alta frequência de células Vβ12 CD62L^{low} no sangue dos pacientes quando comparado aos controles; (6) os pacientes apresentaram frequência mais elevada de células CD4⁺ Vβ12 com fenótipo efetor (CD45RA⁺CCR7⁻; CCR7⁻CD45RO⁺CD28⁻; CD45RO⁻CD27⁻) enquanto as células CD8⁺ Vβ12 apresentaram o fenótipo de memória efetora (CD45RA⁻CCR7⁻, CCR7⁻CD45RO⁻CD28⁻, CD45RO⁺CD27⁻), esse perfil apresenta correlação positiva entre a frequência de células no sangue, com o tamanho da lesão; (7) CMSPs de pacientes com LCL, estimuladas com SLA, apresentaram aumento na frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando Vβ12; (8) *in vitro*, as células T CD4⁺ Vβ12 produziram predominantemente IFN-γ, enquanto células CD8⁺ Vβ12 produzem IFN-γ e TNF; (9) Ambas as células Vβ12 têm uma subpopulação dupla positiva para IFN-γ e TNF. O Vβ12 contribui para a resposta inflamatória através produção de IFN-γ e TNF, assim como para manutenção da lesão devido a presença das células T CD8⁺ de memória efetora com capacidade de produção simultânea de IFN-γ e TNF.

Palavras-chave: Leishmaniose Cutânea, Linfócitos T, Receptores de Antígenos de Linfócitos T alfa-beta, Receptores CCR7, Antígenos CD45.

ANDRADE, Daniela Rodrigues. **Caracterização fenotípica e funcional das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 na resposta imune em paciente com Leishmaniose Cutânea Localizada.** 88 f. il. Tese (Doutorado em Patologia) - Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Gonçalo Moniz, Salvador, 2016.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a disease caused by infection with the *Leishmania* protozoan parasite. The cellular immune response is essential for controlling, eliminating and protection of the *Leishmania* infection. The clonal theory of cellular immunity proposes that immunological responses are established by increasing the frequency of antigen-specific clones. In order to measure the host T cell response to *Leishmania* infection, we have investigated by flow cytometry, the expression of Vβ chains of T-cell receptors (TCRs), activation state, adhesion to endothelium of capacity and functional potential of specific T. In a group of localized cutaneous leishmaniasis (LCL) patients, we evaluated different T cell subpopulations as identified by their Vβ region expression, in peripheral blood and biopsy. We used peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), from CL patients and healthy volunteers, in which we evaluate, *ex vivo*, the expression of activation molecules (CD25, CD69 and HLA-DR), adhesion (LFA-1, VLA-4 and CD62L), co-stimulatory (CD27 and CD28) and memory markers (CCR7, CD45RA, CD45RO). *In vitro*, PBMCs from LCL patients were stimulated with SLA to determine clone Vβ12 expansion and the production of intracellular cytokines (IL-2, IFN-γ and TNF). Our results demonstrate: (1) an decrease in blood CD4⁺ T cells expressing Vβ2, Vβ5, Vβ12 and in CD8⁺ Vβ5, Vβ12, Vβ14 in CL compared to controls; (2) a profile of previous activation of CD4⁺ Vβ2, Vβ5 and CD8⁺ Vβ5, Vβ14 positive T cells, with higher expression of HLA-DR, while Vβ12 clone has different levels of activation; (3) a positive correlation between higher frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ Vβ12⁺ T cells in biopsia and size of the lesions; (4) high expression of adhesion molecules, indicate homing of CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing Vβ12 to the lesion site, confirmed (5) high frequency of Vβ12 CD62L^{low} cells; (6) patients exhibited significant high numbers of phenotype effector CD4⁺ Vβ12 (CD45RA⁺CCR7⁻; CCR7⁻CD45RO⁺CD28⁻; CD45RO⁺CD27⁻) and memory effector CD8⁺ Vβ12 (CD45RA⁻CCR7⁺; CCR7⁺CD45RO⁻CD28⁺; CD45RO⁺CD27⁺); a positive correlation between higher frequencies of effector CD4⁺ Vβ12 and memory effector CD8⁺ Vβ12 T cells, in blood and size of the lesions; (7) Stimulated PBMCs from LCL patients with SLA induced increase in CD4⁺ and CD8⁺ T cells expressing Vβ12; (8) CD4⁺ Vβ12 T cells are prodominantly producing IFN-γ, while the CD8⁺ cells produce both IFN-γ and TNF; (9) Both Vβ12 cells have a positive double subpopulation for IFN-γ and TNF. Vβ12 clone expansion points to CD4⁺ and CD8⁺ T clone cells in response to SLA stimulation, associated with phenotypic characterization and cytokine production, we suggest that the CD4⁺ and CD8⁺ Vβ12 T cells are involved in the long-term inflammatory response against *Leishmania*.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, T-Lymphocytes, Alpha-beta T-Lymphocyte Antigen Receptors, CCR7 Receptors, CD45 Antigens

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Componentes do receptor das células T (TCR).

Figura 2: Desenho esquemático da sinapse imunológica.

Figura 3: Desenho esquemático representando as diferentes células de memória com os seus respectivos perfis de citocinas.

Figura 4: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para definição dos quadrantes através do controle isotópico (IgG1 e IgG2a).

Figura 5: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para caracterização fenotípica através da expressão das moléculas de ativação

Figura 6: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para caracterização fenotípica através da expressão das moléculas de adesão.

Figura 7: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para expressão das moléculas de adesão CD62L high e low

Figura 8: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para determinação dos fenótipos naive/efetor/memória.

Figura 9: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para caracterização funcional através da expressão das citocinas intracelulares (IFN- γ , TNF e IL-2).

Figura 10: Os pacientes com LCL mostraram diminuição, *ex vivo*, na frequência dos clones V β 2, V β 5 e V β 12 em células T CD4⁺ e V β 5, V β 12 e V β 14 em CD8⁺ quando comparados com controles saudáveis.

Figura 11: As células T V β 12 apresentam diferentes níveis de ativação no sangue periférico de pacientes com LCL em relação aos controles saudáveis.

Figura 12: Os pacientes com LCL mostraram aumento, *ex vivo*, na frequência das populações T CD4⁺ e CD8⁺ V β 12 na biópsia e correlação positiva com o tamanho da lesão.

Figura 13: Células T V β 12 no sangue de pacientes com LCL expressam mais moléculas de adesão para endereçamento de tecidos lesionados

Figura 14: Células T V β 12 possuem baixa expressão de CD62L no sangue de pacientes com LCL em relação aos controles saudáveis.

Figura 15: Células T CD4⁺ V β 12 apresentam um fenótipo predominante de células efetoras (CCR7⁻CD45RA⁺) enquanto as células T CD8⁺ V β 12 apresentam fenótipo predominante de células de memória efetora CCR7⁻CD45RA⁻).

Figura 16: Células T CD4⁺ V β 12 apresentam um fenótipo predominante de células efetoras (CCR7⁻CD45RO⁺CD28⁻) enquanto as células T CD8⁺ V β 12 apresentam fenótipo predominante de células de memória efetora (CCR7⁻CD45RO⁻CD28⁻).

Figura 17: Células T CD4⁺ Vβ12 apresentam um fenótipo predominante de células efetoras (CD45RO⁻CD27⁻) enquanto as células T CD8⁺ Vβ12 apresentam fenótipo predominante de células de memória efetora (CD45RO⁺CD27⁻).

Figura 18: Frequência das células T CD4⁺ Vβ12 efetora e CD8⁺ Vβ12 de memória efetora estão correlacionadas ao tamanho da lesão em pacientes com LCL

Figura 19: A estimulação, *in vitro* com SLA, das células mononucleares de pacientes com LCL induz ativação clonal das células T com expressão do Vβ12 tanto nas células T CD4⁺ quanto T CD8⁺.

Figura 20: As células T Vβ12⁺, quando estimuladas com SLA, são células produtoras de INF-γ e TNF.

Figura 21: A população Vβ12⁺, quando estimuladas com SLA, possui maior frequência de células marcadas para IFN-γ, quando comparada a população Vβ12⁻, tanto para as células T CD4⁺ quanto CD8⁺.

Figura 22: As células TCD4⁺ e TCD8⁺ Vβ12⁺ são predominantemente produtoras, *in vitro*, de apenas uma citocina.

Figura 23: As células TCD4⁺ Vβ12⁺, estimuladas com SLA, são predominantemente produtoras de INF-γ, enquanto as TCD8⁺ Vβ12 são produtoras de INF-γ e TNF.

Figura 24: Modelo proposto para a caracterização fenotípica e funcional das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 durante a resposta imune em pacientes com LCL.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes com LCL estudados.

Tabela 2: Dados dos controles saudáveis.

Tabela 3: Dados das moléculas de superfície e intracelulares, avaliadas no estudo, e os respectivos anticorpos fluorescentes.

Tabela 4: Dados de caracterização dos anticorpos utilizados no estudo, a partir do conjugado fluorescente, clone, isotipo e companhia.

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	Alofococianina, <i>do inglês</i> <i>Allophycocyanin</i>
CCR	Receptor para quimiocina CC, <i>do inglês</i> <i>CC Chemokine Receptor</i>
CD	Grupamento de diferenciação, <i>do inglês</i> <i>cluster of differentiation</i>
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
DTH	Reações de Hipersensibilidade Tardia, <i>do inglês</i> <i>Delayed-type hypersensitivity</i>
FACS	Separação de célula determinado por fluorescência, <i>do inglês</i> <i>Fluorescence Activated Cell Sorter</i>
FITC	Isotiocianato de fluoresceína, <i>do inglês</i> <i>Fluorescein Isothiocyanate</i>
FSC	Dispersão frontal, <i>do inglês</i> <i>forward scatter</i> (tamanho)
HLA	Antígeno leucocitário humano, <i>do inglês</i> <i>Human leukocyte antigen</i>
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LFA-1	Antígeno associado a função leucocitária 1, <i>do inglês</i> <i>lymphocyte function-associated antigen 1</i>
LM	Leishmaniose Mucosa
LRC	Leishmaniose Recidiva Cutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade, <i>do inglês</i> <i>complexo principal de histocompatibilidade</i>
MS	Ministério da Saúde
PBS	Tampão fosfato salino, <i>do inglês</i> <i>Phosphate Buffered Saline</i>
PE	Ficoeritrina, <i>do inglês</i> <i>Phycoerythrin</i>
PECY	Ficoeritrina conjugada, <i>do inglês</i> <i>Phycoerythrin tandem</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase, <i>do inglês</i> <i>Polymerase Chain Reaction</i>
SBF	Soro bovino fetal
SLA	Antígeno solúvel de <i>Leishmania</i> , <i>do inglês</i> <i>Soluble Leishmania Antigens</i>

SSC	Dispersão lateral, do inglês <i>side scatter</i> (granulosidade)
SVS	Secretaria da Vigilância Sanitária
TCR	Receptores de células T, do inglês <i>T-cell receptor</i>
TE	Célula T efetora
TGF	Fator Transformador de Crescimento β , do inglês <i>Transforming Growth Factor β</i>
Th	Célula T auxiliar, do inglês <i>helper</i>
TMC	Célula T de memória central
TME	Célula T de memória efetora
TNF	Fator de necrose tumoral, do inglês <i>Tumor Necrosis Factors</i>
V β	Cadeia V beta
VLA-4	Antígeno muito tardio-4, do inglês <i>Very Late Antigen-4</i>
WHO	Organização Mundial da Saúde, do inglês <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1 LEISHMANIOSES	15
1.2 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA	18
1.3. REPERTÓRIO DAS CÉLULAS T (CLONALIDADE)	20
1.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T DE MEMÓRIA	24
2. JUSTIFICATIVA	29
3. HIPÓTESE	29
4. OBJETIVOS	30
5. MÉTODO	
5.1 DESENHO DO ESTUDO	31
5.2 ÁREA DE ESTUDO	31
5.3 GRUPO DE ESTUDO	31
5.4 OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DO SANGUE TOTAL PARA IMUNOFENOTIPAGEM <i>EX VIVO</i>	34
5.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE BIÓPSIA	34
5.6 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) PARA ESTIMULAÇÃO <i>IN VITRO</i>	35
5.7 MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE E INTRACELULAR DAS CÉLULAS ESTUDADAS PARA AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
5.8 AQUISIÇÃO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO	39
5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	46
6. RESULTADOS	47
6.1 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS CLONES DAS CÉLULAS T CD4 ⁺ E CD8 ⁺ NO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA.	47
6.2 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4 ⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) e CD8 ⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14), ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DO CD25, CD69 E HLA-DR.	49
6.3 COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS CLONES DAS CÉLULAS T CD4 ⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) E CD8 ⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14) PRESENTES NO SANGUE	51

PERIFÉRICO E BIÓPSIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA.

6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO CLONE V β 12 NAS CÉLULAS T CD4⁺ E CD8⁺ EM PACIENTES COM LCL. 53

6.5 AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CÉLULAS T CD4⁺ E CD8⁺ V β 12 EM PACIENTES COM LCL, ESTIMULADAS COM SLA. 62

7 DISCUSSÃO 67

8 SUMÁRIO 74

9 CONCLUSÃO 75

10 REFERÊNCIAS 76

11 ANEXOS 86

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um complexo de doenças infecto-parasitárias, não contagiosas, causadas pelo protozoário do gênero *Leishmania*, transmitido ao hospedeiro vertebrado pela picada do mosquito pertencente ao gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) ou *Lutzomyia* (Novo Mundo). Leishmanias são parasitos intracelulares obrigatórios, heteroxênicos, encontrados na forma amastigota no hospedeiro vertebrado e flagelada promastigota no trato digestivo do vetor flebotomíneo. Nas Américas, a Leishmaniose Tegumentar (LT) é causada por espécies como *L. (Leishmania) amazonensis*, *L. (Vianna) braziliensis* e *L. (Vianna.) guyanensis* (WEIGLE; SARAVIA, 1996; LAINSON, 2010; FEITOSA et. al., 2012; TELES et. al., 2016).

As leishmanioses apresentam espectro amplo de manifestações clínicas, comprometendo vísceras (Leishmaniose Visceral - LV), pele e mucosa (LT). Historicamente apresentadas como uma zoonose típica com reservatórios silvestres e vetores bem definidos, atualmente, são consideradas uma antropozoonose. Esse fato se deve ao crescimento populacional, urbanização, mudanças ambientais, devastação de florestas e a adaptação do vetor ao ambiente peridomiciliar (BRASIL, 2010; CALZADA et. al., 2013). A LT apresenta um grande espectro de manifestações clínicas, com lesões localizadas, mucosa, difusa e até mesmo recidiva. Constitui a forma mais comum da doença, prevalente em todos os continentes, exceto na Oceania, com aproximadamente 12 milhões de pessoas infectadas e mais de 399 milhões em risco de contrair a doença. Anualmente são notificados de 0.7 a 1.3 milhões de casos novos em todo o mundo, sendo 70% desses casos distribuídos em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, a República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (WHO, 2016).

No Brasil, no período de 2000 a 2014, a LT apresentou média anual de 24.694 casos registrados e coeficiente médio de detecção de 13,5 casos por 100 mil habitantes. Ao longo desse período, observou-se uma tendência de redução da endemia, passando de um coeficiente de detecção de 20,3 casos por 100 mil habitantes, em 2000, para 9,1, em 2014. As Região Norte e Nordeste apresentam os maiores números de casos da doença, com 40 e 31%, respectivamente, dos números de casos registrados no Brasil, tendo como principais agentes etiológicos a *L. braziliensis*, e a *L. amazonensis* (BRASIL, 2015). Na Bahia, no período de 2010 a 2014, foram registrados 17.353 casos de LT, com uma incidência média de 30,28 casos por 100.000

habitantes (BAHIA, 2015). Apesar de muitos casos culminarem com a cura espontânea, uma pequena parte dos pacientes evoluem para a forma mucosa (BOAVENTURA et al., 2009).

A Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) representa a manifestação mais comum da forma tegumentar, caracterizada por lesões isoladas ou escassas no local da picada do inseto vetor. Estas lesões podem se tornar ulceradas com o fundo necrótico e bordas elevadas e, ocasionalmente, lesões verrugosas são observadas (MARSDEN, 1986; CARVALHO et al., 2012). Um achado clínico comum é a linfadenopatia regional, que pode proceder ao aparecimento das lesões (BARRAL et al., 1995; BOMFIM et al., 2007; SHOFARA et al., 2016). Alguns casos evoluem para a cura espontânea, entretanto, a maioria requer tratamento com drogas leishmanicidas (COSTA et al., 1990; FARAJZADEH et al., 2014; COTA et al., 2016). Pacientes com LCL apresentam reação positiva ao teste cutâneo com antígeno de *Leishmania* (Teste de Montenegro), indicando que há uma resposta imune celular contra o parasito (CASTES et al., 1983, NOGUEIRA et al., 2008; ANTÔNIO, et al., 2014).

Estima-se que de 3 a 5% dos casos de LCL causados por *L. brasiliensis* desenvolvam lesão mucosa. A Leishmaniose Mucosa (LM) caracteriza-se por lesões graves e progressivas na mucosa nasal, levando à destruição do tecido orofaríngeo (MARSDEN, 1986; COSTA, 2014; MIGNOGNA et al., 2015). O comprometimento das mucosas, com processo inflamatório intenso e contraditoriamente poucos parasitas, aparece normalmente anos após a lesão primária, por disseminação hematogênica (BOAVENTURA et al., 2009; JARA et al., 2013). A necrose do tecido da mucosa está associada com uma resposta imune, mediada por células T, intensa, refletida por uma hipersensibilidade do tipo tardio exacerbada (DTH) a antígenos de *Leishmania* (BACELLAR et al., 2002; SANTOS et al., 2014). Há evidências de que o aumento da produção de IFN- γ e TNF está associada ao aumento da reação inflamatória e aumento do tamanho da lesão. As lesões da forma mucosa apresentam expressão maior de IFN- γ e TNF comparada a forma localizada e, níveis semelhantes de IL-10, no entanto, possuem expressão menor do seu receptor (FARIA et al., 2005; CARVALHO et al., 2012; GALDINO et al., 2014). Além disso, proliferação e ativação linfocitária através da estimulação com antígenos de *Leishmania* são maiores na Leishmaniose Mucosa em comparação com a Leishmaniose Cutânea, o que corresponde à gravidade da destruição tecidual na forma mucosa (CARVALHO et al., 2007; PALMEIRO et al., 2012).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) é considerada uma forma rara, porém grave, que ocorre em pacientes com deficiência na resposta imune celular específica aos antígenos de *Leishmania*, o que justifica a anergia ao teste intradérmico de Montenegro (COSTA et al., 1995; ALVAR et

al., 2012). As lesões são nodulares, não ulceradas, de natureza crônica e recobrimdo grandes extensões cutâneas, com carga parasitária alta e com predomínio de macrófagos altamente parasitados (BARRAL et al., 1995; COSTA et al., 1995; MURRAY et al., 2005). A resposta celular anérgica pode ser explicada pela expressão baixa de CCR7 nas células dendríticas, comprometendo assim a apresentação de antígeno. Além disso foi demonstrado baixa produção de CXCL-10 pelas células da lesão e frequência baixa de células T expressando CXCR-3, contexto que compromete a polarização da resposta Th1, responsável pela eliminação do parasita (GEIGER et al., 2010; DÍAZ; ZERPA; TAPIA, 2013). Outros estudos têm demonstrado aumento de arginina-1 e poliaminas na lesão e no plasma de paciente com a forma difusa e sua relação com carga alta em macrófagos e ineficiência na produção de citocinas inflamatórias. Pacientes também apresentam associação negativa entre a produção de TNF e IL-12 por macrófagos e a gravidade da doença (BACELLAR et al., 2002; CARRARA et al., 2007; FRANÇA-COSTA et al. 2015).

As lesões cutâneas, ao evoluírem para a cura, costumam deixar cicatrizes atróficas, deprimidas, com superfície lisa, áreas de hipopigmentação ou de hiperpigmentação e traves fibrosas. É relatado na literatura casos de pacientes que, após a cura de uma lesão produzida por *Leishmania sp*, ocorre o reaparecimento de lesões nodulares, inicialmente isoladas, e em seguida confluentes, em torno da cicatriz, conhecida como Leishmaniose Recidiva Cutânea (GOMES et al., 2013). A forma recidiva – LRC (Leishmaniose Recidiva Cutis) - atualmente é considerada uma forma evolutiva rara da LT, relatada no Velho Mundo como resultante de infecções prévias por *L. tropica*, mais frequente em crianças, com lesões na face (SHARIFI et al., 2010). No Novo Mundo os casos são atribuídos tanto as infecções por *L. amazonensis* quanto por *L. braziliensis*, sendo mais frequentes em homens de idade ativa paraotrabalho, com lesões nos membros superiores e inferiores (BITTENCOURT et al., 1993; BRASIL, 2010). Histopatologicamente as lesões apresentaram um intenso infiltrado mononuclear inflamatório, associado com granulomas bem organizados, contendo células gigantes, cercados por linfócitos (ESFANDIARPOUR; DABIRI, 2007). Na recidiva o percentual médio de células mononucleares imunomarcadas positivamente (CD4, CD8 e CD14) são proeminentes em relação as formas agudas e crônicas não recidivas da Leishmaniose Cutânea. Assim como na forma localizada, a resposta imune do tipo Th1 é predominante na forma recidiva (MEYMANDI et al., 2009)

As manifestações clínicas da leishmaniose dependem das espécies de *Leishmania*, composição da saliva do mosquito vetor, perfil genético e imunológico do hospedeiro mamífero

(PEARSON; SOUSA, 1996; ANDRADE et. al 2007). A cura clínica da leishmaniose nem sempre significa eliminação completa do parasito. Dessa forma, a permanência da *Leishmania* mantém constante uma resposta específica ao antígeno do parasita (COUTINHO; PIRMEZ; DA-CRUZ, 2002; ROSALES-CHILAMA et al., 2015).

1.2 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA

A infecção por *Leishmania sp.* ocorre concomitantemente ao dano tissular induzido pela picada do flebotomíneo, com formação de um bolsão sanguíneo. A lesão tecidual gera uma resposta inflamatória, com recrutamento inicial de neutrófilos, que avidamente fagocitam os parasitos (RIBEIRO-GOMES et al., 2012). No local de inflamação, ocorre a ativação completa do neutrófilo, iniciando a explosão respiratória, através da síntese de espécies reativas de oxigênio (ROS), e mobilização dos grânulos secundários (lactoferrina) e primários (mieloperoxidase, elastase neutrofílica) responsáveis pelos efeitos microbicidas (LACY, 2005; WINTERBOURN, 2008; BORREGAARD; SORENSEN; THEILGAARD-MÖNCH, 2010). Posteriormente, é observada a migração de monócitos e células dendríticas, importantes para controlar e conter a disseminação da infecção. Os macrófagos ativados, através contato com neutrófilos viáveis, sintetizam óxido nítrico (NO) e ativam as enzima lisossômica, que são responsáveis pela morte do parasita. Em contraste, a ativação de macrófagos pelo contato com neutrófilos apoptóticos e a presença solúvel de TGF- β proporcionam um ambiente favorável para a proliferação da *Leishmania* (DOMÍNGUEZ; TORAÑO, 1999; NOVAIS et al., 2009; TAVARES et al., 2014). Ao mesmo tempo, essas células migram para o linfonodo, onde interagem com as células T, promovendo a ativação de uma resposta imune protetora, necessária para resolução da infecção (QI; POPOV; SOONG, 2001; FAVALI et al., 2007).

A resposta imune mediada pelas células T CD4⁺ efetoras (Th) é muito heterogênea devido aos diferentes padrões de citocinas que são capazes de produzir e assim são capazes de orquestrar outras células da resposta imune na eliminação dos patógenos. Além disso, são muito importantes na ativação dos linfócitos B e macrófagos. Tradicionalmente, a interação com molécula de histocompatibilidade (MHC) e as moléculas co-estimulatórias, assim com as citocinas presentes no ambiente induzem a ativação das vias de diferenciação para distintas subpopulações de células T CD4⁺, conhecidas como T helper (Th) 1, Th2, Th17 e Th22. Dados mais recentes indicam que as células T retêm um grau significativo de plasticidade, quando se considera a capacidade de uma determinada subpopulação ser capaz de produzir citocinas que

caracterizam outras subpopulações. (O'SHEA, PAUL, 2010; SCHMITT, UENO, 2015). A resposta imune baseada nos linfócitos T CD8⁺ é menos heterogênea e após o processo de apresentação antigênica são capazes de contribuir para a eliminação de patógenos por mecanismos efetores. Essas células liberam grânulos citoplasmáticos com perforinas, proteínas capazes de romper a membrana celular, e granzimas, que são uma família de serinoproteases com várias especificidades de substrato. Junto com as perforinas, as granzimas induzem apoptose, dependente de caspase, na célula-alvo. Além disso, são capazes de secretar citocinas, como IFN- γ e TNF e quimiocinas, as quais atuam na ativação de fagócitos e na indução da inflamação (HARING; BADOVINAC; HARTY, 2006; JORDAN, HUNTER, 2010).

Por ser um organismo intracelular obrigatório a resposta imune celular desempenha papel fundamental na eliminação da *Leishmania* durante a infecção. As células T efetoras coordenam a resposta imune do hospedeiro através da liberação de citocinas, como IFN- γ e TNF, que direcionam a resposta imune para o padrão de proteção e essa proteção depende da ativação dos macrófagos para eliminar os parasitas intracelulares por mecanismos oxidativos, além de aumentar sua capacidade de apresentar antígeno a outras células T (DA-CRUZ et al., 1994; KAYE; SCOTT, 2011; OLIVEIRA et.al, 2014). No entanto, o aumento de TNF e IFN- γ e níveis baixos de IL-10 contribuem para o desenvolvimento da lesão ulcerada. Essas observações foram feitas em culturas de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) estimuladas com antígeno de *Leishmania* (SLA) e em biópsias de lesão de pacientes com LCL (BACELLAR et al., 2002; UNGER et al., 2009; SANTOS et al., 2013).

Apesar da indução preferencial da célula T CD4⁺ para eliminação do parasita, a célula T CD8⁺ parecem contribuir tanto para a eliminação do parasito quanto para progressão da lesão. Foi demonstrado sua ação citotóxica direta em macrófagos infectados através da Fas/FasL e a indução elevada de apoptose dos macrófagos em pacientes subclínicos, constituindo mecanismo importante de controle da infecção (BOUSSOFFARA et al., 2004; CARDOSO et al., 2015). Pacientes com lesões tardias apresentaram frequência maior de células T CD8⁺ positivas para granzima A e B quando comparados a pacientes com lesões mais recentes. Além disso, a expressão de granzima A e B foi positivamente correlacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório nas lesões tardias, sugerindo sua contribuição na progressão da lesão (FARIA et al., 2009; DANTAS et al., 2013). Assim, a atividade mútua e a cooperação entre as células efetoras T CD4⁺ e T CD8⁺ parece definir o curso da resposta responsável pela imunopatogenia na LCL (BACELLAR et al., 2002).

A resposta celular, contra a *Leishmania*, é iniciada quando células apresentadoras de antígenos residentes no local da infecção se deslocam, através dos vasos linfáticos, para o linfonodo drenante e apresentam, as células T, antígenos no contexto MHC-peptídeo-TCR. Inicialmente essa apresentação é feita pelas células de Langerhans epidermais e 24 dias após infecção ocorre a participação dos macrófagos, este balanço pode influenciar no tipo de resposta imune inicial predominante das células T (RITTER; OSTERLO, 2007, KAUTZ-NEU et al. 2010). O reconhecimento dos antígenos de *Leishmania* desencadeia a proliferação policlonal das células T, com diferenciação das células virgens em células efetoras e memória.

1.3. REPERTÓRIO DAS CÉLULAS T (CLONALIDADE)

A capacidade dos linfócitos T em responder a uma grande variedade de peptídeos estranhos depende de um grande repertório de receptores de células T (TCRs) específicos. O TCR é um heterodímero constituído por duas cadeias polipeptídicas, designadas alfa(α)-beta(β) ou gama(γ)-delta(δ), ligadas covalentemente entre si por pontes dissulfeto. As cadeias $\gamma\delta$ constituem apenas de 1-10% do repertório de células T. As cadeias são constituídas por três regiões: variável (V), junção (J) e constante (C), no entanto as cadeias β e δ possuem uma região adicional denominada região de diversidade (D) (DAVIS, 1995; FREEMAN et al, 2009). As duas cadeias $\alpha\beta$, através da região transmembrana, hidrofóbica, estão associadas não covalentemente a um complexo protéico, constituído por cinco proteínas, na membrana plasmática (γ , δ , ϵ e duas ξ) denominado CD3 (Figura 1). Este complexo está relacionado tanto com a expressão do TCR quanto com sua ativação (VAN DER MERWE; CORDOBA, 2011).

O conjunto de células com o mesmo TCR define um clone de células T para um peptídeo específico, e o conjunto de clones presentes na circulação representa um repertório em número aproximado de 4×10^{11} células T (LYTHE et al., 2015). Essa diversidade é resultante rearranjos gênicos aleatórios, para cada clone, dos segmentos gênicos V e J da cadeia alfa (α) e V, D, J da cadeia beta (β) seguido de adição ou deleção de nucleotídeos para a estrutura do receptor. Os cinquenta genes que codificam a cadeia α estão localizados no cromossomo 14 enquanto os setenta e cinco genes que codificam a cadeia β localizam-se no cromossomo 7 (ROBISON et al., 1993, VENTURI et al., 2006). A síntese, montagem e expressão na superfície celular do complexo TCR são fenômenos regulados e coordenados durante a maturação dos linfócitos T no timo (SALAMAIRE et al., 2009).

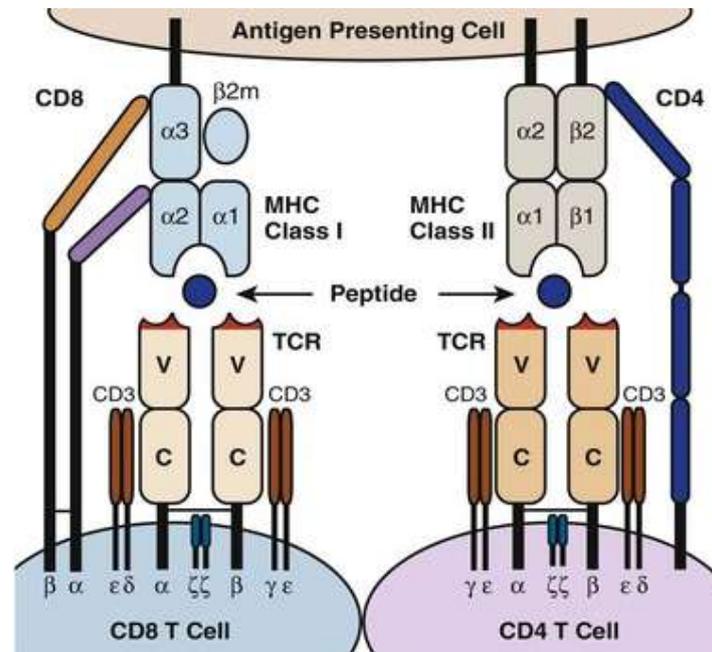


Figura 1: Componentes do receptor das células T (TCR).
 Fonte: WOMERr, 2016.

Diante da importância da resposta imune celular para a eliminação e controle dos mais diversos patógenos, estudos baseados no repertório de células T têm sido conduzidos através da análise da cadeia variável β do TCR. A análise da diversidade de receptores de células T tem um papel fundamental na compreensão da evolução e diversidade da resposta imune, além de proporcionar um marcador clinicamente relevante e sensível a partir do aumento ou diminuição de determinado clone. A análise do repertório através do TCR foi usada para estudar as respostas seletivas de células T em doenças auto-imunes, transplante, imuno-deficiências, imunidade protetora contra tumores e infecções (LUMSDEN; CRANMER; KRZYCH, 2010; LUI et al., 2012; KONING et al., 2014; LUO et al., 2014).

Os segmentos gênicos $V\beta$ são agrupados em 24 diferentes famílias, com distribuição heterogênea, como foi mostrado em estudo com indivíduos saudáveis que apresentaram aumento na expressão de determinadas famílias, como o $V\beta 2, 6, 8$ e 17 e expressão menor de outras, como o $V\beta 12$ e $V\beta 24$. Além disso, algumas cadeias tendem ser mais frequentes em subpopulações de linfócitos T CD4, como $V\beta 5.1, 6.7, 8, 9$ e 12 do que em linfócitos T CD8, nas quais foram observadas expressão maior das famílias $V\beta 1, 5.2, 9, 14$ e 23 (VAN DER BEEMD et al., 2000). No estudo de Koning e colaboradores (2014), foi mostrado que alguns clones só foram observados em ensaios *in vitro*, com células do sangue periférico de doadores

saudáveis estimuladas com citomegalovírus, e houve diminuição significativa do clone dominante na avaliação *ex vivo*. Além disso, a diversidade de expansão é dependente do tempo de incubação (correlação negativa entre diversidade e tempo de incubação).

Indivíduos doentes apresentam diversidade mais restrita quando comparado aos indivíduos saudáveis, além de determinadas famílias estarem associadas com diferentes estágios clínicos em dada patologia. Estudo em pacientes com tuberculose apresentando diferentes graus de gravidade, demonstrou que a diversidade do repertório de linfócitos T, no sangue periférico, tem uma correlação inversamente proporcional com a gravidade da doença (LUO et al., 2012). Essas diferenças ainda podem ser observadas entre as subpopulações de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺. Estudo, realizado com células mononucleares de sangue periférico de pacientes com hepatite B crônica grave, demonstrou que a diversidade de expansão nas células T CD8⁺ foi significativamente maior do que em células T CD4⁺, sendo predominante a expansão das famílias Vβ5, Vβ7, Vβ9, Vβ12 e Vβ18 (XIONG; TAN; SONG, 2014). A diversidade do repertório também pode ser influenciada pelo tratamento. Pacientes com câncer colorretal apresentaram aumento da diversidade das células T CD4⁺, durante o tratamento, refletindo no melhor prognóstico (LUO et al., 2014). González-Sernaet e colaboradores (2013) demonstraram que os pacientes com HIV-1 que interromperam o tratamento apresentaram aumento na expressão das famílias Vβ10, Vβ14 e Vβ15, e diminuição das famílias Vβ20, Vβ28, e Vβ29 quando comparado aos grupos de tratamento contínuo. Além disso, foi observado em pacientes que retomavam o tratamento a restauração na expressão das famílias moduladas pelo tratamento.

Indivíduos vacinados, com vírus modificado Ankara expressando um epítipo do vírus HIV-1 apresentaram modulação da expansão e persistência das células T CD8⁺ vírus-específico. Houve a expansão de células T CD8⁺ para HIV-1 com expressão alta para as famílias Vβ2, Vβ5.1, Vβ14 e Vβ24 dos indivíduos vacinados quando comparados a indivíduos infectados com HIV-1 que receberam terapia antiviral. Essas famílias permaneceram na circulação durante pelo menos um ano em alguns indivíduos, sendo observado capacidade para proliferar e inibir replicação do HIV-1 *in vitro*, sugerindo que a vacina pode modular uma resposta mediada pelas células T CD8 contra infecção por HIV-1 (YANG et al., 2007). Experimentalmente as células T CD8⁺ de camundongos apresentam aumento gradativo das células de memória efetora e a expansão preferencial das famílias Vβ4, 6, 7, 8,3, 9 e 11 quando desafiados (esporozoítos infecciosos de *Plasmodium berghei* – *Pb* -) após três ciclos de imunização com esporozoítos atenuados de *Pb* (LUMSDEN; CRANMER; KRZYCH, 2010).

O primeiro trabalho com leishmaniose, para determinar o repertório de células T, através do estudo do TCR foi experimental e realizado por Reiner e Locksley, em 1993. Os autores utilizaram células CD4⁺ provenientes do linfonodo de quatro grupos de animais infectados com *Leishmania major*: 1) suscetíveis; 2) suscetíveis induzidos a cura através do tratamento com anti-IL4; 3) resistentes; e 4) controle (não infectado). Com os resultados, os autores concluíram que os camundongos suscetíveis apresentaram expansão aumentada nas famílias Vβ4, 6 e 8. Os dados mostraram que os genes Vβ4 estão expressos em 31% dos clones de células T CD4⁺ isolados dos camundongos suscetíveis, sugerindo que algum antígeno proveniente da *L. major* está induzindo a proliferação específica destas células, que por sua vez, contribuem para a suscetibilidade nestes animais. Outro estudo, usando o mesmo modelo, demonstrou grande expressão de RNAm de IL-4 nas células CD4⁺ provenientes do linfonodo de camundongos suscetíveis deficientes em Vβ4, após 16 horas de infecção por *L. major*. Mostraram também uma relação inversa entre a expressão de IL-4 e os níveis de INF-γ e a regressão da lesão, ocorrendo tanto entre os grupos resistentes quanto nos deficientes de Vβ4. Concluíram então, que a presença do TCR Vβ4 nas células CD4⁺ de camundongos suscetíveis seria um dos principais fatores que levam os animais suscetíveis a não conseguirem controlar a infecção por *L. major*, pois estas células são as principais responsáveis pela produção de IL-4 (LAUNOIS et al., 1997).

Em leishmaniose cutânea humana dois trabalhos se destacam. Uyemura e colaboradores (1993) avaliaram o repertório Vβ através da comparação da expressão do TCR Vβ em 8 pacientes com LCL e verificaram que alguns genes Vβ foram mais representativos na lesão do que no sangue e as células T CD4⁺ e T CD8⁺ apresentam repertórios distintos, contudo essas variações não eram semelhantes entre os pacientes. Também foi observado expressão maior do RNAm de INF-γ nas células T CD4⁺ enquanto as células T CD8⁺ expressam níveis altos de RNAm IL-4 e IL-10, sugerindo funções distintas dessas células. Apesar da descrição do repertório das populações de células T nesses pacientes, não foi possível sugerir um repertório específico que possa ser responsável pelo controle da infecção devido as diferenças individuais apresentadas. Em 2006, Clarêncio e colaboradores, com o objetivo de caracterizar o repertório das células T Vβ, em humanos, contra *Leishmania*, verificaram por análise em citometria de fluxo a existência de uma expansão oligoclonal. Contudo mostraram existir uma expansão preferencial do TCR Vβ12 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ em células do linfonodo quando estimuladas com SLA e em células estimuladas de indivíduos vacinados. Houve uma correlação positiva entre a expansão das células Vβ12⁺ com a produção rápida de INF-γ na resposta imune *in vivo*, em

indivíduos vacinados. Nesse estudo os autores sugeriram existir uma modulação na expressão de genes codificadores para a cadeia V β do TCR das células T CD4⁺ e CD8⁺, com expansão marcante de células do tipo V β 12.

Os estudos de avaliação da cadeia V β presentes nos receptores das células T, têm se concentrado na definição do repertório, alterações no perfil, expansão ou retração de determinado clone e associação dessas alterações a resposta imunológica específica e ao prognóstico das doenças. Sabendo da dinâmica de diferenciação funcional das células T, durante a resposta imune, é importante estudar a caracterização fenotípica, funcional e sua potencialidade para a secreção de citoninas. As técnicas de PCR e citometria de fluxo são atualmente as mais utilizadas para estudar o repertório das células T, através da avaliação do seu receptor (TCR). O uso do PCR permite uma observação de alta resolução do repertório de TCR, no entanto é uma técnica com necessidade de ajuste do protocolo para cada tipo de reação, exige populações de células T altamente puras e a alta sensibilidade torna efetivo o problema de contaminação (MILES; DOUEK; PRICE, 2011). A citometria de fluxo permite uma avaliação rápida, quantitativa e qualitativa da heterogeneidade de um conjunto celular, à escala da célula individual, a partir da combinação de vários fluorocromos. Desta forma, a identificação de diferentes subpopulações, podem fornecer informações relevantes da complexidade e heterogeneidade que ocorre num determinado contexto biológico (VAN DER GEETS et al., 2015).

1.4 CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T DE MEMÓRIA

Após o estágio de maturação, os linfócitos T no timo, conhecidos como virgens, estes são direcionados para os órgãos linfóides secundários, principalmente os linfonodos. Fenotipicamente essas células apresentam alta expressão de CD62L e CCR7, e sua sobrevivência é dependente da exposição a IL-7 (SALLUSTO, 1999; SURH; SPRENT, 2008). As células virgens são ativadas ao encontrar as células dendríticas expressando peptídeos estranhos via MHC e moléculas co-estimuladoras em um ambiente pró-inflamatório (citocinas) apropriado. Estes sinais são fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta eficiente e é acompanhado por alterações sequenciais na expressão de moléculas de superfície na sinapse imunológica – Figura 2 (HUANG; AUGUST, 2014; CHOW et al. 2015).

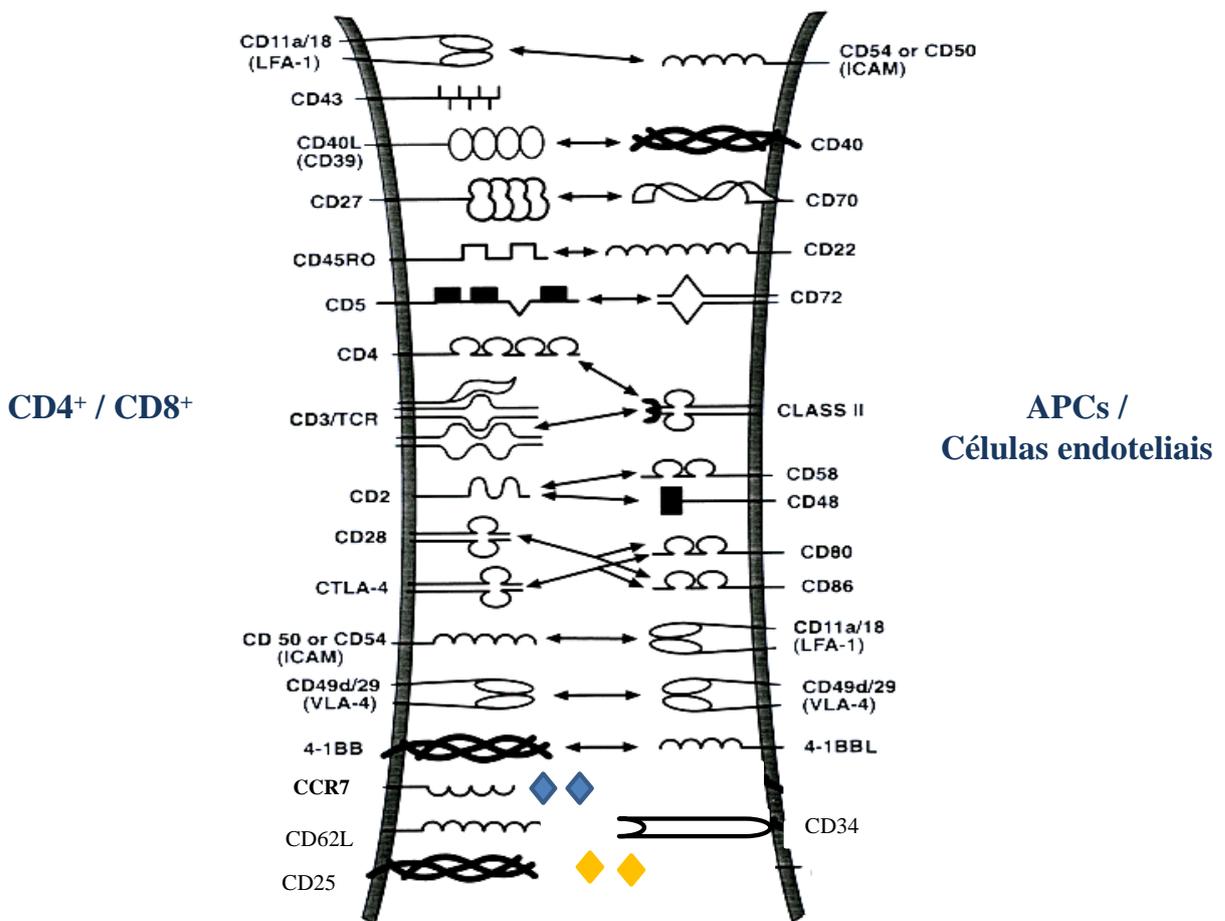


Figura 2: Desenho esquemático da sinapse imunológica.
 Fonte: Adaptado de Paul, (2014).

A dinâmica da expressão das moléculas co-estimulatórias CD27 e CD28 é descrita como relevante nos mecanismos de ativação, diferenciação funcional e expansões oligoclonais das células T. Essa expressão é regulada negativamente nas células T em resposta a ativação e proliferação (BOESTEANU; KATSIKIS, 2009; SANCHEZ-LOCKHART et al., 2014). Os CD27 e CD28 são moléculas co-estimulatórias que interagem, respectivamente, com o CD70, CD80 e 86, presentes nas células dendríticas durante a formação da sinapse imunológica. Estudos mostram que essa interação contribui para a expansão clonal, aumento da resposta celular e diferenciação em células T efetoras (XIAO et al., 2008; KUKA et al., 2013; PEPPERZAK, et al., 2013).

Após sua ativação, estes linfócitos respondem ao antígeno após fase de expansão clonal pronunciada, gerando uma população numerosa de células T antígeno-específicas. Como células efetoras, os linfócitos T deixam os órgãos linfóides secundários e percorrem os tecidos para exercerem suas funções imunológicas. O processo de reconhecimento, expansão clonal e diferenciação resulta na modificação da expressão de moléculas de superfície que permitem o

endereçamento e migração das células para o tecido, a partir do qual o seu antígeno cognato foi originalmente derivado (SCOTT, 2005; CLARK, 2010; JOSEPH, 2015).

Durante a resposta primária algumas células T se diferenciam em células de memória, permitindo o desenvolvimento de uma resposta mais rápida e com maior intensidade, induzindo resistência a uma reinfecção. Pelo menos duas populações de células T de memória são geradas, as células T de memória central (TMC) e as células T de memória efetora (TME). A frequência das células T de memória passa por mudanças dinâmicas ao longo dos anos. Ao nascer, todas as células T no sangue periférico são virgens, e células T de memória se diferenciam, ao longo dos vinte primeiros anos, em resposta à exposição aos mais diversos antígenos. Nos anos seguintes é observada uma estabilidade das células de memória, que a partir dos 65-70 anos apresenta queda na proporção e capacidade funcional (SAULE et al., 2006; GORONZY; WEYAND et al., 2013; FARBER; YUDANIN; RESTIFO, 2014). Os estudos também demonstram que o sangue e os linfonodos apresentam mudanças na composição dos subconjuntos das células de memória (diminuição das células virgens e aumento das células de memória central), enquanto mucosas e pele mantêm estáveis a frequência dos subconjuntos das células T de memória central e efetora com potencial funcional distintos, como demonstrado na Figura 3 (SATHALIYAWALA et al., 2013; THOME et al., 2014).

Dois marcadores são necessários para diferenciar populações de células virgens, memória central, memória efetora e efetora T presentes em CMSP. O primeiro é o CD45, que é expresso em todas as células hematopoiéticas, com uma das várias isoformas (CD45RA, CD45RO, CD45R). O CD45RA é expresso em células T *naive*, bem como as células efetoras, tanto nas células CD4 quanto CD8. Depois do contato com o antígeno, a diferenciação das células T em memória, regulam negativamente a expressão de CD45RA e positivamente a expressão do CD45RO. Dados da literatura demonstram que as células T recrutadas para os sítios de lesão são CD45RO⁺, apresentando ainda expressão de receptores de quimiocinas, como o CXCR3, ligante para o CXCL10 (MACKAY, 1999; GROOM; LUSTER, 2011).

No entanto, a diferenciação entre as populações de memória central e efetora é mostrado com base na baixa (*low*) ou alta (*high*) expressão das moléculas de migração celular, CD62L e CCR7. A expressão de CD62L^{low} foi associada as populações de células de memória efetora (TME) com rápida produção de INF- γ após estimulação, nos sítios inflamatórios, enquanto a expressão CCR7 e CD62L^{high} associou-se as células T de memória central (TMC), com migração para os linfonodos, alta capacidade proliferativa e produção de IL-2. Em resumo, as

células T *naive* são $CD45RA^+/CD45RO^-/CCR7^+CD62L^{high}$, memória central são $CD45RA^-/CD45RO^+/CCR7^+/CD62L^{high}$, memória efetoras são $CD45RA^-/CD45RO^+/CCR7^-/CD62L^{low}$ e células efetoras são $CD45RA^+/CD45RO^-/CCR7^-/CD62L^{low}$ (SALLUSTO; GEGINAT; LANZAVECCHIA, 2004; PEPPER; JENKINS, 2011; MUELLER et al., 2013).

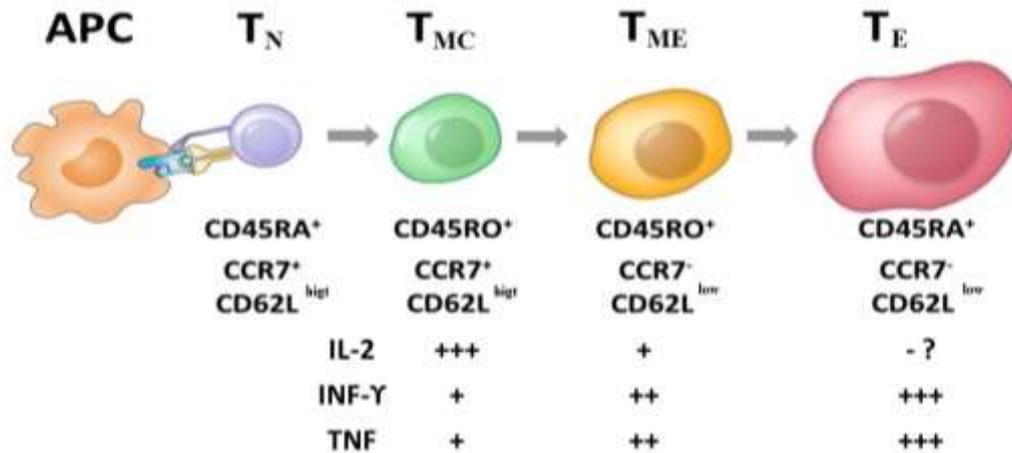


Figura 3: Desenho esquemático representando as diferentes células de memória com os seus respectivos perfis de citocinas.

Fonte: Adaptado de Okada et al. (2008).

Estudos que avaliaram o perfil das células de memória em pacientes curados para LCL tem demonstrado que a frequência das células de memória é superior na biópsia de lesões em relação ao sangue. Acrescentam ainda que células de memória efetora são as principais produtoras de IFN- γ após estimulação com SLA, no entanto essa produção é estatisticamente significante apenas na biópsia. Atualmente essa observação reforça a idéia da presença de células T de memória residentes no tecido (TMR) (CARVALHO et al., 2013). Experimentalmente tem sido demonstrado uma população de células T $CD4^+$ de memória residentes na pele que desenvolvem uma resposta específica contra *Leishmania* (PEREIRA-CARVALHO et al., 2013). Quando transplantadas por enxerto de pele em camundongos sem contato prévio com o parasito, estas células produzem IFN- γ , sugerindo que não é necessário o estímulo antigênico para sua sobrevivência. Além disso, permanecem residentes na pele, inclusive, contribuindo para o recrutamento das células circulantes após o desafio (GLENNIE et al., 2015).

As células T de memória residentes (TRM) foram identificadas em estudos experimentais usando modelos de infecção em camundongos. Em humano estas células apresentam distribuição tecidual mais abrangente do que a encontrada nos modelos murinos, sendo predominantes nos pulmões, intestinos, mucosa vaginal e pele, no entanto, também estão

presentes no fígado, no cérebro e linfonodos (MUELLER et al., 2013). A análise fenotípica das células TMR, em humanos, é baseada na expressão dos marcadores CD69, CD103 e nos marcadores presentes nas células de memória efetora (SCHENKEL; MASOPUST et al., 2014; WATANABE et al., 2015). Na pele humana, a população de células CD4 e CD8 de memória efetora CD69⁺CD103⁺ é encontrada na epiderme, enquanto a maior parte das células de memória efetora T CD4 CD69⁺CD103⁻ estão confinadas à derme. Notavelmente, essas distinções fenotípicas de células T de memória em diferentes tecidos são consistentes entre indivíduos diversos e sugerem efeitos intrínsecos ao tecido sobre as células T de memória residentes (SATHALIYAWALA et al., 2013; THOME et al., 2014).

Esses achados têm sido discutidos como indicadores da imunidade protetora eficaz para a *Leishmania* pode depender da geração das células T circulantes e residentes na pele.e, portanto, para o sucesso de uma vacina.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses estão incluídas no quadro das grandes endemias que estão em um processo de expansão e crescimento, fazendo dessa morbidade uma questão de grande importância para a saúde pública mundial. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) a leishmaniose é uma doença com amplo espectro clínico e é responsável mundialmente pelo segundo maior número de mortes por infecções parasitárias. Ao longo dos anos, estudos vêm demonstrando a importância da resposta imune celular mediada pelos linfócitos T, na LCL, e que a resposta inflamatória intensa é seguida de uma lesão tecidual (MENDONÇA, et al., 1995). Essa resposta imune pode estar associada à presença de clones de células T bastante reativos. Dessa forma, uma avaliação dos clones dos linfócitos T, baseada na diversidade de expressão da cadeia V beta ($V\beta$) do seu receptor (TCR) torna-se um foco importante de investigação uma vez que a análise do repertório de células T nos fornece informações relevantes sobre a presença ou ausência de uma resposta celular direcionada.

Poucos trabalhos têm sido realizados com o objetivo de avaliar possíveis alterações no perfil do repertório $V\beta$ do receptor de linfócitos T em pacientes com LCL (UYEMURA et al., 1993; CLARÊNCIO et al., 2006, KESSEN et al., 2011). Esses estudos mostraram que as células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), de indivíduos com LCL, apresentam modulação na expressão de genes codificadores para a cadeia $V\beta$, com expressão marcante de alguns clones, como o $V\beta 4$, $V\beta 5$ e o $V\beta 12$. Sabendo da importância da dinâmica imunológica para eliminação e proteção contra o parasito através da resposta celular desempenhada pelos linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$, além do perfil clonal, torna-se importante a caracterização fenotípica e potencial funcional dessa resposta.

A perspectiva de controle desta doença depende do aprofundamento e detalhamento do conhecimento sobre os fenômenos que ocorrem durante a resposta imune específica a *Leishmania*. Embora as células T efetoras, para a resposta contra a *Leishmania*, sejam conhecidas por desempenharem um papel crítico na eliminação do parasito, o papel das células T de memória ainda precisa ser explorado, pois o entendimento da proteção imunológica efetiva ainda não foi alcançado para a elaboração de vacinas humanas eficazes.

3. HIPÓTESE

As células T $CD4^+$ e $CD8^+$ $V\beta 12$ possuem características fenotípicas e funcionais de células de memória nos pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil fenotípico e funcional das células T CD4⁺ e CD8⁺ no repertório Vβ12 em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada e o seu papel na patogênese da doença.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

4.2.1 Avaliar a frequência dos clones das células T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.

4.2.2 Avaliar o nível de ativação das células T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14), através da expressão do CD25, CD69 e HLA-DR.

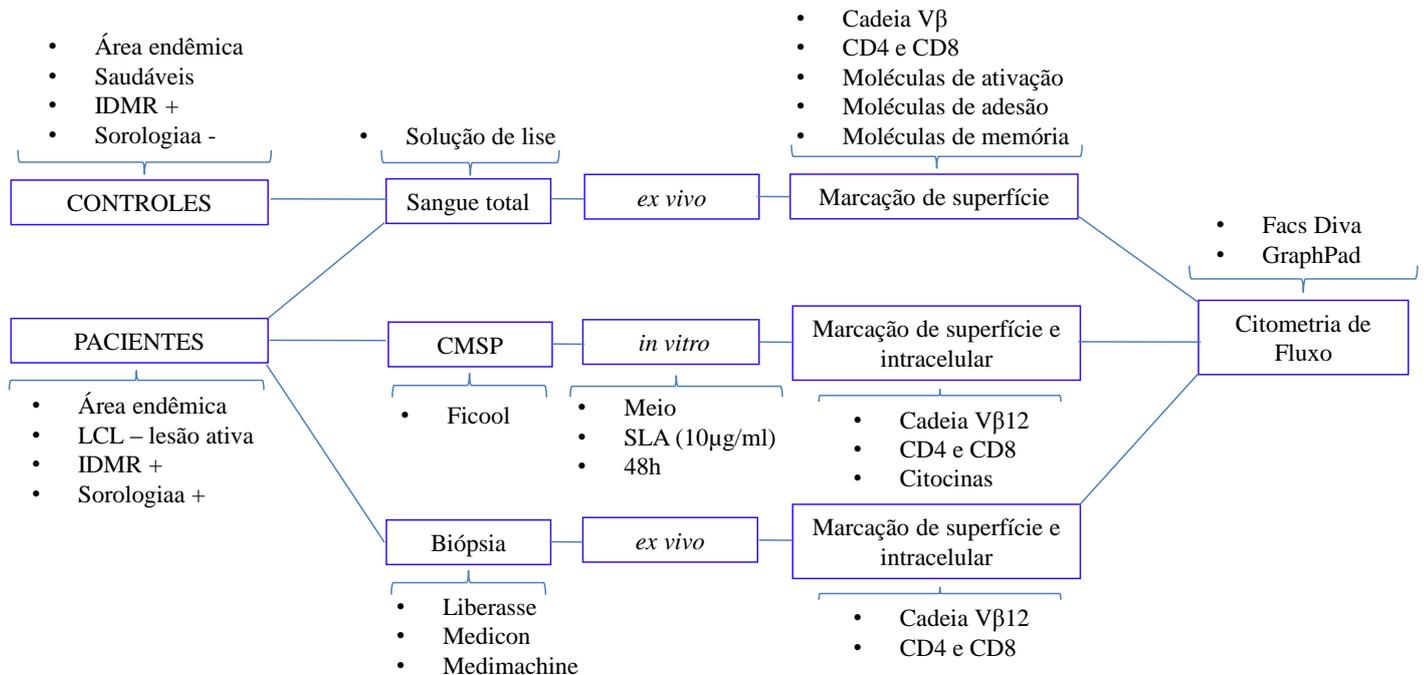
4.2.3 Comparar a frequência dos clones das células T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14) presentes no sangue periférico e biópsia em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada.

4.2.4 Avaliar a expressão das moléculas de adesão (LFA-1, VLA-4 e CD62L) e caracterização funcional (CD27, CD28, CD45RA, CD45RO e CCR7) do clone Vβ12 das células T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes com LCL.

4.2.5 Avaliar a expansão e produção de citocinas em células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 em pacientes com LCL, estimuladas com SLA.

5. MÉTODO

5.1 DESENHO DO ESTUDO



5.2 ÁREA DE ESTUDO

O estudo de campo foi realizado no município de Jequiçá, Bahia, área endêmica para Leishmaniose Cutânea causada por *L. braziliensis*. Município localizado no sudoeste baiano (a 13°15' de latitude sul e 39°35' de longitude oeste) possui como principal atividade econômica a agropecuária com população estimada em aproximadamente 15 mil habitantes. Extensão territorial de 262 Km² possui clima tropical com temperatura média de 23°C. Segundo dados apresentados pelo portal da vigilância, a região apresentou em 2014 uma média de 104 notificados e confirmados de Leishmaniose Cutânea Localizada.

5.3 GRUPO DE ESTUDO

Os pacientes foram recrutados no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (DIP) do Centro de Referência em Doenças Endêmicas do Vale do Jequiçá (CERDEJJC), localizado na

cidade de Jiquiriçá, Bahia, onde foram atendidos por médicos especializados e submetidos a testes laboratoriais, visando o diagnóstico das doenças. Foram coletadas biopsias das lesões e amostras do sangue periférico, após assinatura do termo de consentimento informado (Anexo D) pelos pacientes ou pelos seus tutores. Todos os procedimentos realizados no estudo foram aprovados pela Comissão de Ética CPqGM-FIOCRUZ (Nº 79/2005).

A população estudada constituiu de casos ativos que tiveram diagnóstico clínico de Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), confirmados com teste cutâneo (intradermoreação de Montenegro - IDRM) e sorologia para *Leishmania* positivos. Os pacientes tinham idade entre 9 e 62 anos (média de 31,5 anos), em sua maioria do sexo masculino (16/21) com tempo de lesão entre 30-60 dias, conforme relatado pelo paciente. A área total das úlceras foi em média, aproximadamente, 400 mm². Os pacientes selecionados apresentavam lesão inicial típica de LCL e não haviam começado o tratamento (Tabela 1). O paciente 9, da tabela 1, apesar de apresentar 13 lesões foi confirmado pela avaliação médica como LCL. Foram excluídos do estudo os pacientes que não apresentavam a forma clínica de interesse, que já haviam começado o tratamento e aqueles com mais de 60 dias de lesão (segundo relato do próprio participante).

Todos os voluntários para o grupo de controles saudáveis (n=15), moradores da área endêmica, que fizeram parte desse estudo não tinham história prévia de infecção por *Leishmania*, confirmado pela sorologia anti-*Leishmania* negativa (Tabela 2). Todos os voluntários foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo e os riscos inerentes aos procedimentos, e todos assinaram o termo de consentimento.

Tabela 1: Dados clínicos dos pacientes com LCL estudados Caracterização clínico dos 21 pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada selecionados para o estudo, residentes na área endêmica do Vale de Jiquiriça. Caracterização feita a partir das variáveis: sexo, idade, número de lesões, área da lesão (mm²), tempo da lesão (dias) e Teste de Montenegro (positivo).

Pacientes	Sexo	Idade	Número de lesões	Área. da lesão (mm ²)	Tempo da lesão (dias)	Teste de Montenegro	Biópsia
1	F	44	1	225	30	Positivo	
3	F	42	1	300	30	Positivo	
4	M	62	1	350	30	Positivo	
5	M	9	3	500	30	Positivo	
6	F	27	1	500	30	Positivo	
7	M	24	1	100	30	Positivo	
8	M	37	1	750	30	Positivo	Sim
9	F	12	13	500	30	Positivo	Sim
10	M	49	3	200	60	Positivo	Sim
11	M	35	1	700	30	Positivo	Sim
12	M	19	2	150	30	Positivo	Sim
13	M	25	1	200	30	Positivo	
14	M	21	1	300	60	Positivo	Sim
15	M	15	2	750	60	Positivo	Sim
16	M	44	1	500	30	Positivo	Sim
17	M	50	1	600	60	Positivo	Sim
18	F	40	4	100	30	Positivo	Sim
19	M	33	2	NSI	30	Positivo	Sim
20	M	16	1	270	60	Positivo	Sim
21	M	26	2	600	60	Positivo	Sim

Tabela 2: Dados dos controles saudáveis. Caracterização dos 15 controles saudáveis, residentes na área endêmica do Vale de Jiquiriça, a partir das variáveis: sexo, idade e Teste de Montenegro (negativo).

Controles	Sexo	Idade	Teste de Monte Negro
1	F	26	negativo
2	F	28	negativo
3	M	34	negativo
4	M	26	negativo
5	F	27	negativo
6	F	24	negativo
7	F	32	negativo
8	M	36	negativo
9	M	52	negativo
10	F	41	negativo
11	M	23	negativo
12	F	36	negativo
13	F	43	negativo
14	F	41	negativo
15	M	37	negativo

5.4 OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DO SANGUE TOTAL PARA IMUNOFENOTIPAGEM *EX VIVO*

Aproximadamente 20mL de sangue foram coletados de cada paciente e controles saudáveis através de venopunção utilizando tubos de ensaio de 10mL estéreis, com vácuo e contendo anticoagulante (heparina sódica, Liquevine® 5000U/mL - Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos AS, RJ, Brasil). Para a imunofenotipagem, *ex vivo*, foram distribuídos 100µL de sangue total de pacientes e controles em tubos de fundo redondo de poliestireno (5ml). Os anticorpos monoclonais, marcados com fluorocromo de ligação específica para antígenos de superfície, foram adicionados (conforme item 5.7) e as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidos da luz e em temperatura ambiente. Após incubação, para eliminação das hemácias, foi acrescido 1mL da solução de lise (“Lysing solution”, BD Biosciences, USA) diluída (1:10) com água destilada. Esta solução lisa os eritrócitos, sob condições hipotônicas enquanto preserva os leucócitos. Após a incubação de 10 minutos, em temperatura ambiente e na ausência de luz, as amostras foram lavadas com PBS em centrifugação de 1200rpm por 10 minutos a 4°C e ressuspendidas em 200µL de tampão de FACS (PBS 1x, 0,5% SBF, 0,01% de azida de sódio).

5.5 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS DE BIÓPSIA

Primeiramente foi feita a assepsia do local e depois um fragmento de tecido foi retirado da borda da lesão utilizando um “punch” com diâmetro de 3,5mm (Baler Cummins; pharmaceuticals, USA) e colocado em meio RPMI 1640 (Invitrogen, SP, Brasil) completo. No laboratório, o tecido obtido da lesão foi incubado na presença de meio RPMI 1640 (Invitrogen, SP, Brasil) suplementado com liberasse (0,5mg/ml) (Sigma, SP, Brasil) por 1 hora, a 37°C, 5% CO₂. Após a incubação foi acrescido 1 mL de RPMI completo ao tecido, e inserido no Medicon (Consul^{TS}, USA) por 4 minutos, para processamento no Medimachine (BD Bioscience, USA). Esse procedimento foi repedido de duas a três vezes, para obtenção da maior quantidade de células. Após o processamento as células foram lavadas duas vezes em PBS e centrifugadas a 1200rpm, a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação as células foram resuspendidas em 200µL de tampão FACS e o número de células obtidas foi calculado na câmara de Neubauer.

5.6 OBTENÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) PARA ESTIMULAÇÃO *IN VITRO*

O sangue, coletado como descrito no item 5.2.3, foi diluído a 1:1 em solução de salina estéril em tubo fundo cônico em polipropileno de 50mL (tipo falcon). Posteriormente o sangue diluído foi cuidadosamente depositada sobre um gradiente de Ficoll-histopaque (Sigma, SP, Brasil), na proporção 1:2, também em tubo tipo falcon de 50mL, de modo que a camada de Ficoll ficasse abaixo da camada de sangue. Centrifugou-se a 1500rpm (Centrifuga 5810R, Eppendorf Brasil) durante 30 minutos em temperatura ambiente. O plasma foi coletado, a camada de CMSP coletada e transferida para outro tubo tipo falcon de 15mL. As CMSP foram lavadas duas vezes por centrifugação a 1200rpm, a 4°C por 10 minutos, com solução salina estéril para retirada do Ficoll e hemácias residuais. O número de células foi calculado em câmara de Neubauer e ressuspendidas em 1mL de meio RPMI 1640 (Invitrogen, SP, Brasil) suplementado com 10% de soro AB Rh⁺ inativado (BD Biosciences, USA), L-glutamina 2mM, penicilina 100U/mL e estreptomicina 100µL/mL (Sigma, SP, Brasil).

A quantidade de CMSP, foi ajustada para $3 \times 10^6 / 500 \mu\text{l}$, por poço em meio RPMI completo. As células foram distribuídas em placas de 24 poços de fundo chato (Corning) e estimuladas com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA - 10µg/ml). Como controle negativo, as células foram mantidas na ausência de estímulo, apenas com RPMI completo (meio). As culturas foram incubadas a 37°C, com 5% CO₂ por 48h. Nas últimas 4h da incubação foi acrescentado 10 µg/mL do inibidor de transporte de proteínas intracelulares (Brefeldina A - BD Biosciences, EUA) em cada poço, para a marcação das citocinas intracelulares. Após a incubação as células foram centrifugadas (1200rpm, a 4°C por 10min), contadas em câmara de Neubauer, ajustadas para 2×10^6 células/tubo (tubo cônico de polipropileno de 1.5mL - LGC Biotecnologia), ressuspendidas em 200µL de tampão de FACS e bloqueadas com 1% de Soro AB Rh⁺ inativado (BD Biosciences, EUA).

5.7 MARCAÇÃO DE SUPERFÍCIE E INTRACELULAR DAS CÉLULAS ESTUDADAS PARA AVALIAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO

A expressão dos marcadores de superfície e citocina intracelulares, de pacientes e controles, foi determinada por citometria de fluxo nas células obtidas *ex vivo*, das amostras de sangue e biópsia, bem como nas CMSP após 48h em cultura com SLA. Aproximadamente 2×10^6 células

por 200 μ L de tampão de FACS foram distribuídas em tubos cônicos de polipropileno de 1.5mL (LGC Biotecnologia) e incubadas (30 minutos, protegidos da luz e em temperatura ambiente) com 1% de soro AB Rh⁺ inativado (BD Biosciences, EUA) e anticorpos monoclonais, conjugados as fluorescências, para moléculas de superfície e cadeias V β na diluição/concentração recomendada pelo fabricante (Tabela 3). As especificações dos anticorpos conjugados encontram-se na Tabela 4. Após a incubação, as células eram lavadas por centrifugação (1200rpm por 10 min a 4°C) e ressuspensas em 200 μ L de tampão FACS (PBS 1x, 0.5% SBF, 0.01% azida de sódio).

Para marcação de citocinas intracelulares nas células T CD4⁺ e T CD8⁺ V β 12 foi utilizado o kit Cytofix/Cytosperm Plus (BD Biosciences, USA), seguindo-se as instruções do fabricante. Este kit fornece dois reagentes: BD Cytofix - solução de fixação/ Cytosperm - permeabilização e BD Perm/Wash - tampão de lavagem que mantém a permeabilização. Após a marcação extracelular, como descrito acima, as células foram incubadas com 100 μ L de Cytofix/Cytosperm durante 20 minutos, a 4°C. Ao término da incubação as células foram lavadas, duas vezes, por centrifugação (1200rpm, 10 min, a 4°C) acrescentando 1mL da solução Perm/Wash em cada tubo e posteriormente foi feito o descarte do sobrenadante. Após a fixação e permeabilização das células foram acrescentados os anticorpos correspondentes as citocinas de interesse e incubadas a 4°C por 30 minutos e protegidos da luz. O tampão BD Perm/Wash foi utilizado para a diluição dos anticorpos, a fim de manter as células num estado permeabilização para marcação intracelular. Ao término da incubação as células foram lavadas duas vezes por centrifugação (1200rpm, 10 min, 4°C), pela adição de 1mL da solução Perm/Wash em cada ciclo da lavagem. Ao final as células foram ressuspensas em 200 μ L em tampão de FACS (PBS 1x, 0,5% SBF, 0,01% azida de sódio).

Tabela 3: Dados das moléculas de superfície e intracelulares, avaliadas no estudo, e os respectivos anticorpos fluorescentes. Composição dos painéis de marcação das cadeias V β , moléculas de superfície e citocinas intracelulares das células do sangue periférico e biópsia de pacientes e controles saudáveis nos experimentos *ex vivo* e *in vitro*.

MARCAÇÃO	FITC	PE	PECY ⁵	PECY ⁷	APC
Compensação	CompBead	CompBead	CompBead	CompBead	CompBead
Isotipos	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1
Isotipos	IgG2a	IgG2a	IgG2a	IgG2a	IgG2a
TCRV β	V β 2	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 3	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 5	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 6.1	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 8	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 11	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 12	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 13	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 14	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 16	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 17	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 20	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 21.3	CD4	CD8	-	-
TCRV β	V β 22	CD4	CD8	-	-
TCRV β 2- Ativação	V β 2	CD25	CD8	-	CD4
TCRV β 2-Ativação	V β 2	CD69	CD8	-	CD4
TCRV β 2-Ativação	V β 2	HLA-DR	CD8	-	CD4
TCRV β 5-Ativação	V β 5	CD25	CD8	-	CD4
TCRV β 5-Ativação	V β 5	CD69	CD8	-	CD4
TCRV β 5-Ativação	V β 5	HLA-DR	CD8	-	CD4
TCRV β 12-Ativação	V β 12	CD25	CD8	-	CD4
TCRV β 12-Ativação	V β 12	CD69	CD8	-	CD4
TCRV β 12-Ativação	V β 12	HLA-DR	CD8	-	CD4
TCRV β 14-Ativação	V β 14	CD25	CD8	-	CD4
TCRV β 14-Ativação	V β 14	CD69	CD8	-	CD4
TCRV β 14-Ativação	V β 14	HLA-DR	CD8	-	CD4
TCRV β 12-Adesão	V β 12	CD11a	CD8	CD18	CD4
TCRV β 12-Adesão	V β 12	CD29	CD8	CD49d	CD4
TCRV β 12-Adesão	V β 12	CD62L	CD8	-	CD4
TCRV β 12 Memória	V β 12	CD4	CD45RO	CD28	CD197 (CCR7)
TCRV β 12-Memória	V β 12	CD8	CD45RO	CD28	CD197 (CCR7)
TCRV β 12-Memória	V β 12	CD4	CD45RA	-	CD197 (CCR7)
TCRV β 12-Memória	V β 12	CD8	CD45RA	-	CD197(CCR7)
TCRV β 12-Memória	V β 12	CD4	CD45RA	CD27	-
TCRV β 12-Memória	V β 12	CD8	CD45RA	CD27	-
TCRV β 12-Citocinas	V β 12	TNF	CD4	IFN- γ	IL-2
TCRV β 12-Citocinas	V β 12	TNF	CD8	IFN- γ	IL-2

Tabela 4: Dados de caracterização dos anticorpos utilizados no estudo, a partir do conjugado fluorescente, clone, isotipo e companhia. Especificações dos anticorpos utilizados para as marcações das cadeias V β , moléculas de superfície e citocinas intracelulares das células do sangue periférico e biópsia, de controles saudáveis e pacientes, nos experimentos *ex vivo* e *in vitro*.

Anticorpo	Conjugado	Clone	Isotipo	Companhia
CompBeads	FITC/PE/PECY5/PECY7/APC	-	-	BD Biosciences-CA,EUA
IgG1a	FITC/PE/PECY5/PECY7/APC	X40	-	BD Biosciences-CA,EUA
IgG2a	FITC/PE/PECY5/PECY7/APC	6155-178	-	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-V β 2	FITC	E22E7-2	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 3	FITC	LE-89	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 5	FITC	ER-2	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 6.1	FITC	CRI3004-3	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 8	FITC	56C5	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 11	FITC	C21	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 12	FITC	VER2.32	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 12	PE	VER2.32	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 13	FITC	IMM-222	IgG2a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 14	FITC	CA51.1.3	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 16	FITC	TAMA1	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 17	FITC	E17.5	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 20	FITC	ELLI-4	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 21.3	FITC	16.125	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-V β 22	FITC	IMM.546	IgG1a	Immunotech- ME, EUA
Anti-CD4	FITC	RPA-T4	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD4	PE	SK3	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD4	PECY5	SK3	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD4	APC	SK3	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD8	PE	RPA-T8	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD8	PECY5	SK3	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD11a	PE	43-25B	IgG2a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD18	PECY7	6.7	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD25	PE	M.A251	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD27	PECY7	M.T271	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD28	PECY7	CD28.2	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD29	PE	MAR4	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD45RA	PECY5	HI100	IgG2a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD45RO	PECY5	UCHL1	IgG2a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD49d	PECY7	9F10	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD69	PE	FN50	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-CD197(CCR7)	APC	150503	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-HLA-DR	PE	646-6	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-IFN- γ	PECY7	4S.B3	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-TNF	PE	MAb.11	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA
Anti-IL-2	APC	5344.111	IgG1a	BD Biosciences-CA,EUA

5.8 AQUISIÇÃO E ANÁLISE POR CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras foram adquiridas utilizando o aparelho FACSaria ou FACS Fortessa II (BD Biosciences, USA) da Plataforma de Citometria do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, e analisadas utilizando o programa FACSDiva (BD Biosciences, USA) com 50 mil eventos/amostra. Em cada experimento foi analisado primeiramente a amostra controle não marcada (células tratadas e submetidas ao mesmo procedimento, exceto pela adição dos anticorpos conjugados aos fluorocromos). Os ajustes dos canais de detecção foram realizados de modo que as fluorescências destas células se encontrassem na região da escala considerada negativa (em torno de 10^2). Posteriormente foram analisadas as amostras controle isotópico (Figura 4), usada como controle negativo. Com essa marcação eliminamos as fluorescências inespecíficas, evitando a interferência de falsa positividade nos resultados. Para esse controle os anticorpos são do mesmo isotipo utilizado nos anticorpos testes, marcado com o mesmo fluorocromo, mas não específicos aos sítios antigênicos da amostra em análise; assim, a fluorescência emitida por este controle, que não reconhece nenhuma das moléculas de superfície das células da amostra em análise, permite estabelecer o background (linha zero), abaixo do qual os resultados não são reconhecidos, ou são inespecíficos, evidenciando apenas os eventos reais. Como os experimentos envolveram marcações simultâneas com mais de um fluorocromo, usamos as *compbeads* (BD Biosciences, USA) para corrigir a sobreposição dos fluorocromos. As *Compbeads* são micropartículas de poliestireno que se ligam a cadeia leve qualquer de imunoglobina. Procedia-se, então a aquisição das amostras testes.

Para a construção do painel de leitura foi usada uma estratégia baseada no gráfico de pontos (“dot plot”) e seleção das populações de interesse “gats” (R). Inicialmente foi definido o primeiro “dot plot” (gráfico de pontos) a partir dos parâmetros tamanho (*forward scatter* – FSC; eixo x) versus granulosidade (*side scatter* – SSC; eixo y) e realizada uma seleção particular na região dos linfócitos através de um “gate” denominado R1(Figura 3A). O gate R1 foi selecionado para individuar as populações das células T CD4⁺ e CD8⁺ em “dot plot” distintos (Figura 3B e C, respectivamente). Dentro de cada população, CD4⁺ (“gate” R2) e CD8⁺ (“gate” R3), foram analisadas as expressões dos clones e moléculas de interesse a partir da abertura de “dot plots” onde fizemos associações entre os fluorocromos (Figura 4D). Dependendo da quantidade de moléculas avaliadas a estratégia para definição dos painéis foi ajustada com o intuito de atender a necessidade da análise multiparamétrica (Figuras 5, 6, 7, 8 e 9)

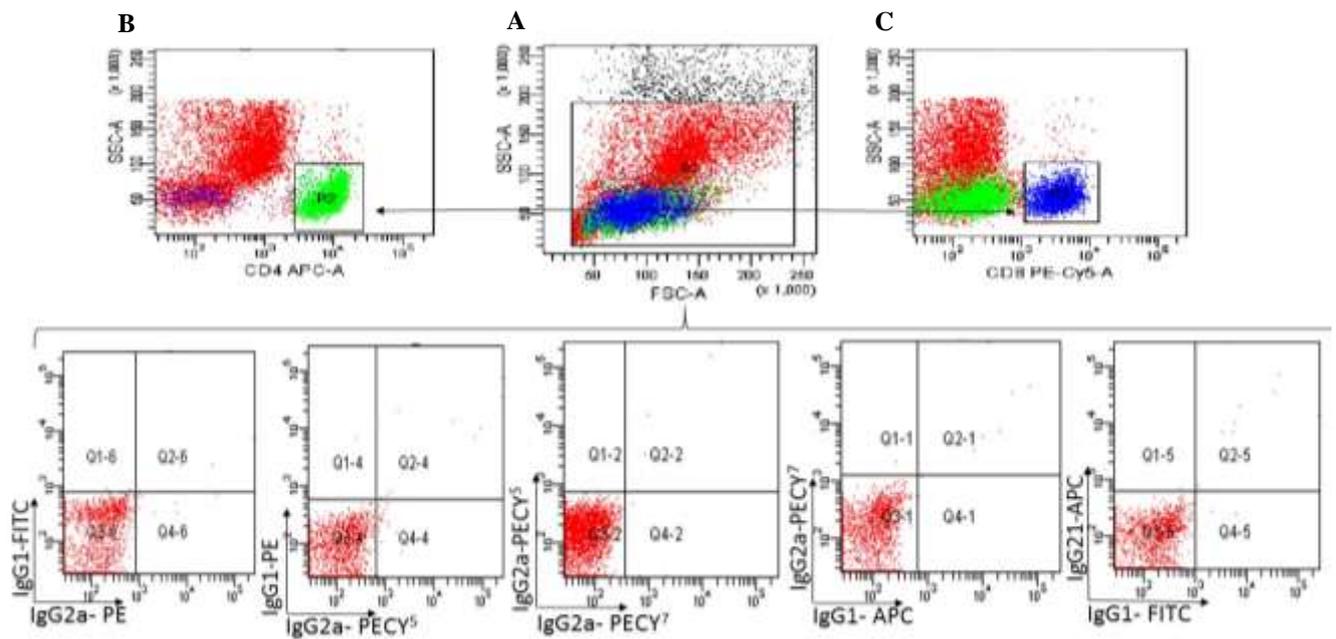


Figura 4: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para definição dos quadrantes através do controle isotípico (IgG1 e IgG2a). (A) População linfocitária tendo como base os parâmetros de tamanho (FSC) e granulocidade (SSC), gate R1. Região de marcação da subpopulação T CD4⁺ (B) e CD8⁺ (C), gate R2 e R3 respectivamente. Região de marcação do controle isotipo para os fluocromos FITC, PE, PEC⁵, PECY⁷, APC. As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, com os anticorpos isotípicos, seguido por análise de citometria de fluxo.

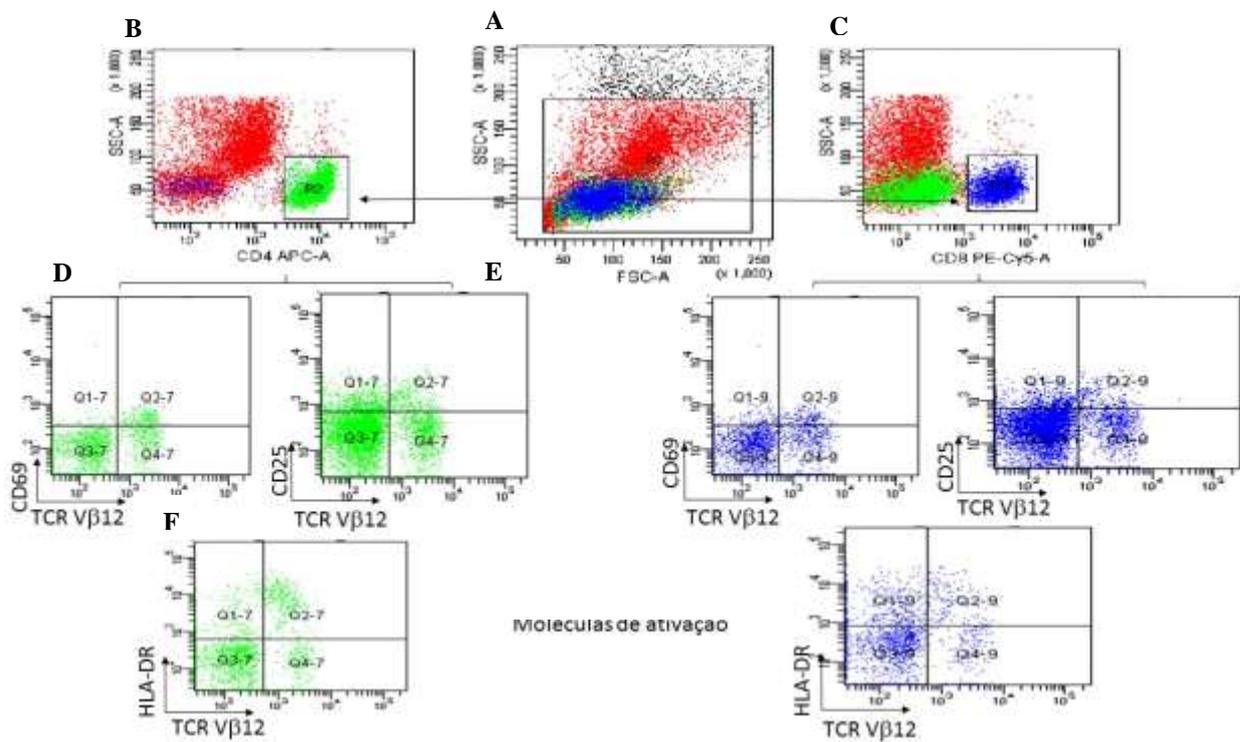


Figura 5: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para caracterização fenotípica através da expressão das moléculas de ativação. (A) População linfocitária tendo como base os parâmetros de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), “gate” R1. Região de marcação da subpopulação T CD4⁺ (B) e CD8⁺ (C), “gate” R2 e R3 respectivamente. Região de marcação da subpopulação Vβ12 mais moléculas de ativação CD69 (D), CD25, HLA-DR (E). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, para a região Vβ do receptor de células T (TCR) CD4⁺ e CD8⁺, mais as moléculas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo.

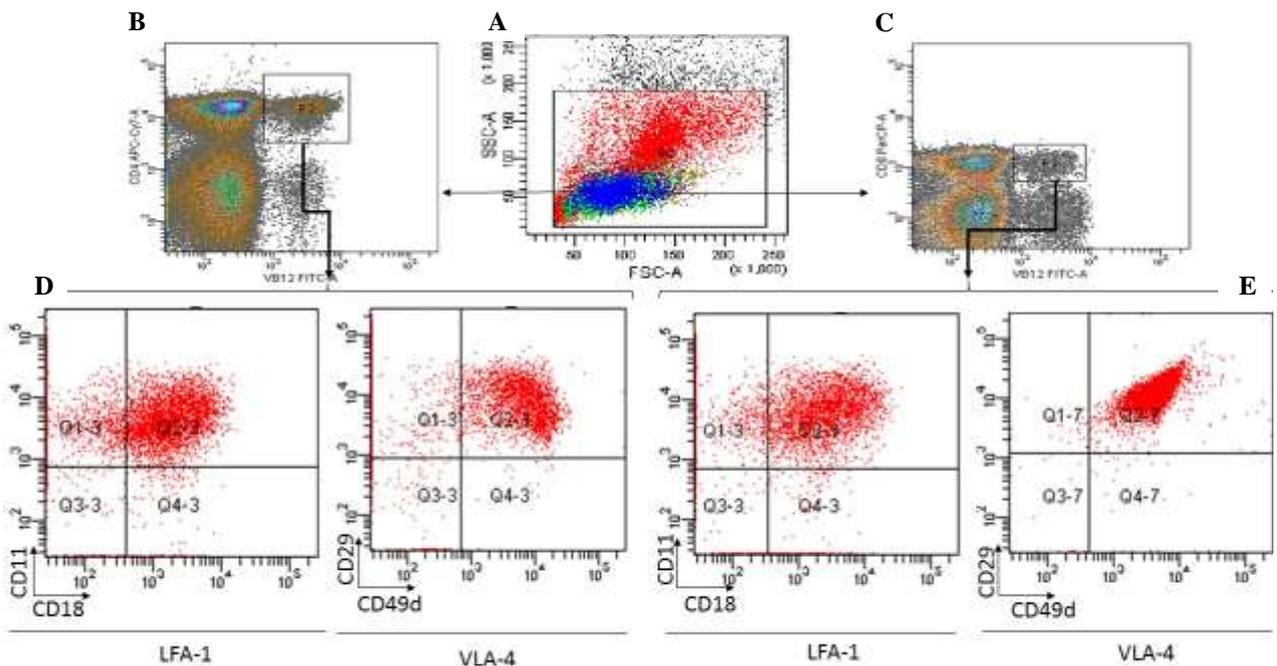


Figura 6: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para caracterização fenotípica através da expressão das moléculas de adesão. (A) População linfocitária tendo como base os parâmetros de tamanho (FSC) e granulidade (SSC), “gate” R1. Região de marcação da subpopulação T CD4⁺ Vβ12 (B) e CD8⁺ Vβ12 (C), “gate” R2 e R3 respectivamente. Região de marcação das moléculas de adesão, LFA-1 - CD11 e CD18 (D) e VLA-4 - CD29 e CD49d (E). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, para a região Vβ do receptor de células T (TCR) CD4⁺ e CD8⁺, mais as moléculas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo, tal como descrito em Métodos.

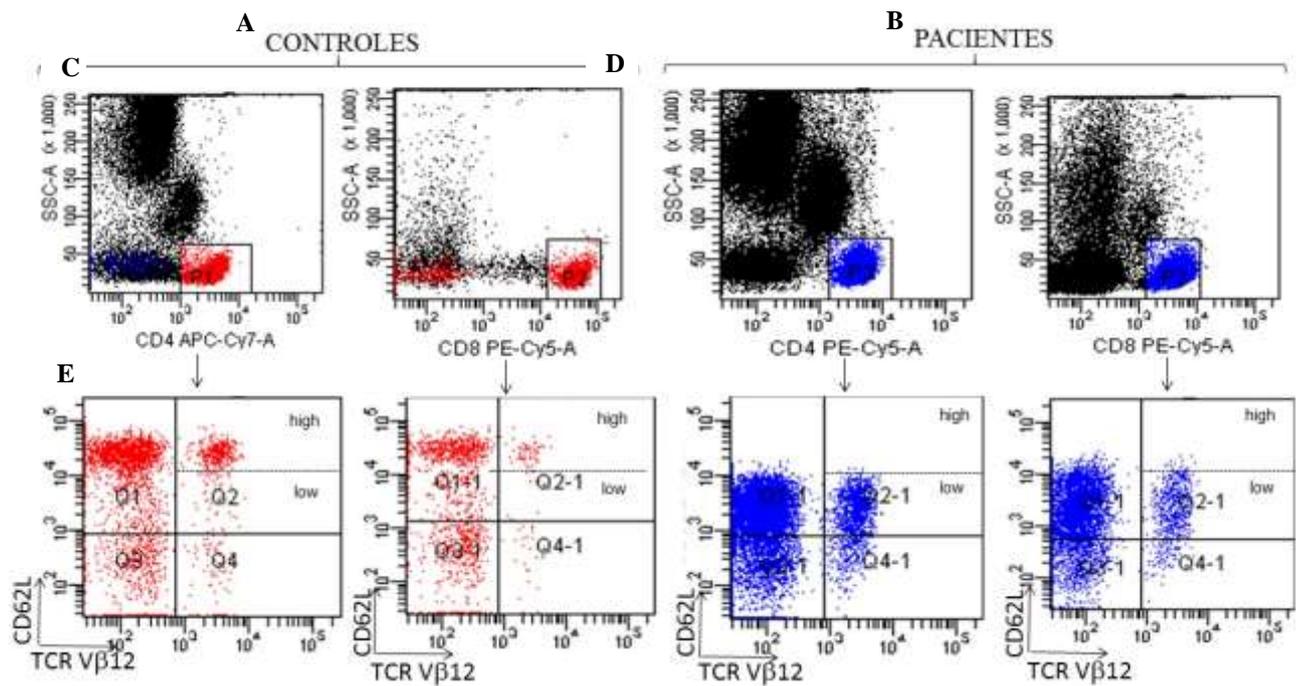


Figura 7: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para expressão das moléculas de adesão CD62L high e low. Representação gráfica da população linfocitária em controles (A) e pacientes (B). A construção dos “dot plots” foi feita igualmente para controles e pacientes. Região de marcação da subpopulação T CD4⁺ (C) e CD8⁺ Vβ12 (D), “gate” R1 e R2 respectivamente. Região de marcação da subpopulação Vβ12 mais a molécula CD62L (E). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, para a região Vβ do receptor de células T (TCR) CD4⁺ e CD8⁺, mais a moléculas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo, tal como descrito em Métodos.

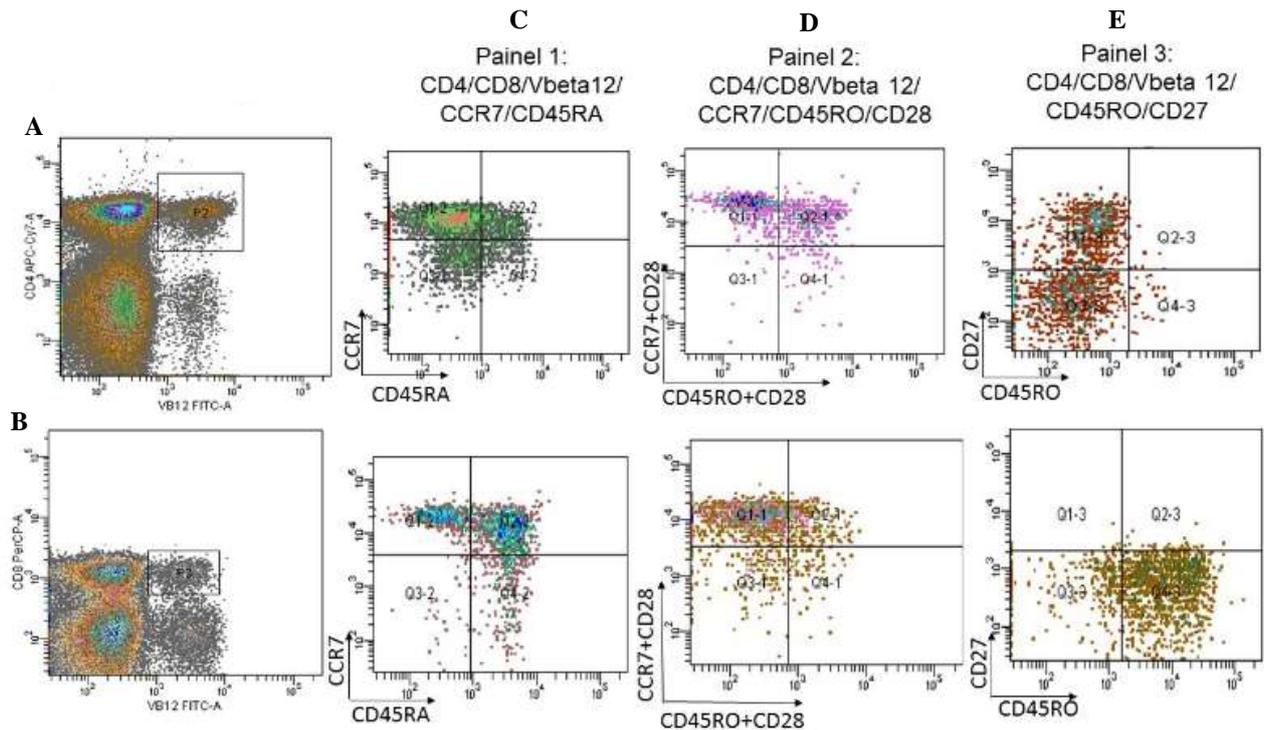


Figura 8: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para determinação dos fenótipos naive/efetor/memória. Representação gráfica da região de marcação da subpopulação T CD4⁺Vβ12 (A) e CD8⁺Vβ12 (B), “gate” R1 e R2 respectivamente. Região de marcação das moléculas de superfície: (C) Painel 1- CCR7/CD45RA; (D) Painel 2- CCR7/CD45RO/CD28; (E) Painel 3- CD45RO/CD27, em CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, para a região Vβ do receptor de células T (TCR) CD4⁺ e CD8⁺, mais as moléculas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo, tal como descrito em Métodos.

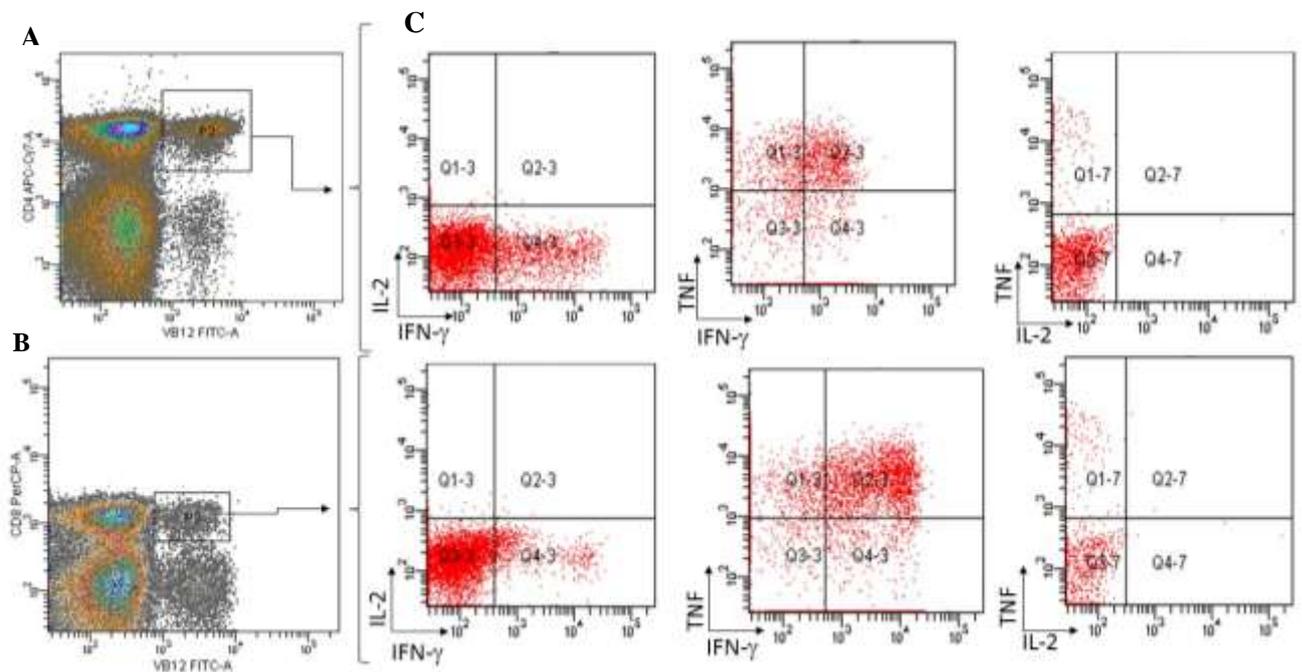


Figura 9: Representação gráfica da população linfocitária, analisada para caracterização funcional através da expressão das citocinas intracelulares (IFN- γ , TNF e IL-2). Representação gráfica da região de marcação da subpopulação T CD4⁺ V β 12 (A) e CD8⁺ V β 12 (B), gate R2 e R3 respectivamente. (C) Região de marcação da subpopulação V β 12 para as citocinas de interesse. Células mononucleares, provenientes do sangue periférico de pacientes foram mantidas em cultura por 48h sem estímulo. Após o tempo de cultura, as células foram marcadas para regiões V β 12, expressão de CD4 e CD8, e produção das citocinas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo tal como descrito em Métodos.

5.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foi utilizado o programa GraphPad – Prism (GraphPad Software, San Diego, CA-USA). Os valores estão representados com valores em médias e desvio padrão obtidas a partir da expressão das moléculas estudadas em cada população. O Teste não pareado e não paramétrico de Mann Whitney foi usado para comparar a expressão das moléculas entre pacientes e controles. Para avaliar a existência de correlação, entre a frequência dos clones das células T e o tamanho da lesão, usamos o coeficiente de correlação de Spearman. O teste pareado e não paramétrico de Wilcoxon foi usado para comparar expansão do clone V β 12 e frequência das células marcadas para as citocinas intracelulares nos ensaios *in vitro*, entre células submetidas ou não a estimulação com SLA. Os valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos.

6. RESULTADOS

6.1 AVALIAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS CLONES DAS CÉLULAS T CD4⁺ E CD8⁺ NO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA.

Inicialmente foi feita a avaliação do repertório no sangue periférico entre pacientes com LCL e controles saudáveis da mesma área endêmica, através da expressão cadeia V β do TCR. Houve menor frequência, estatisticamente significativa, dos clones V β 2, V β 5 e V β 12 em células T CD4⁺ (Figura 10A) e diminuição das células T CD8⁺ V β 5, V β 12 e V β 14 (Figura 10B), nos pacientes com LCL, quando comparados aos controles saudáveis.

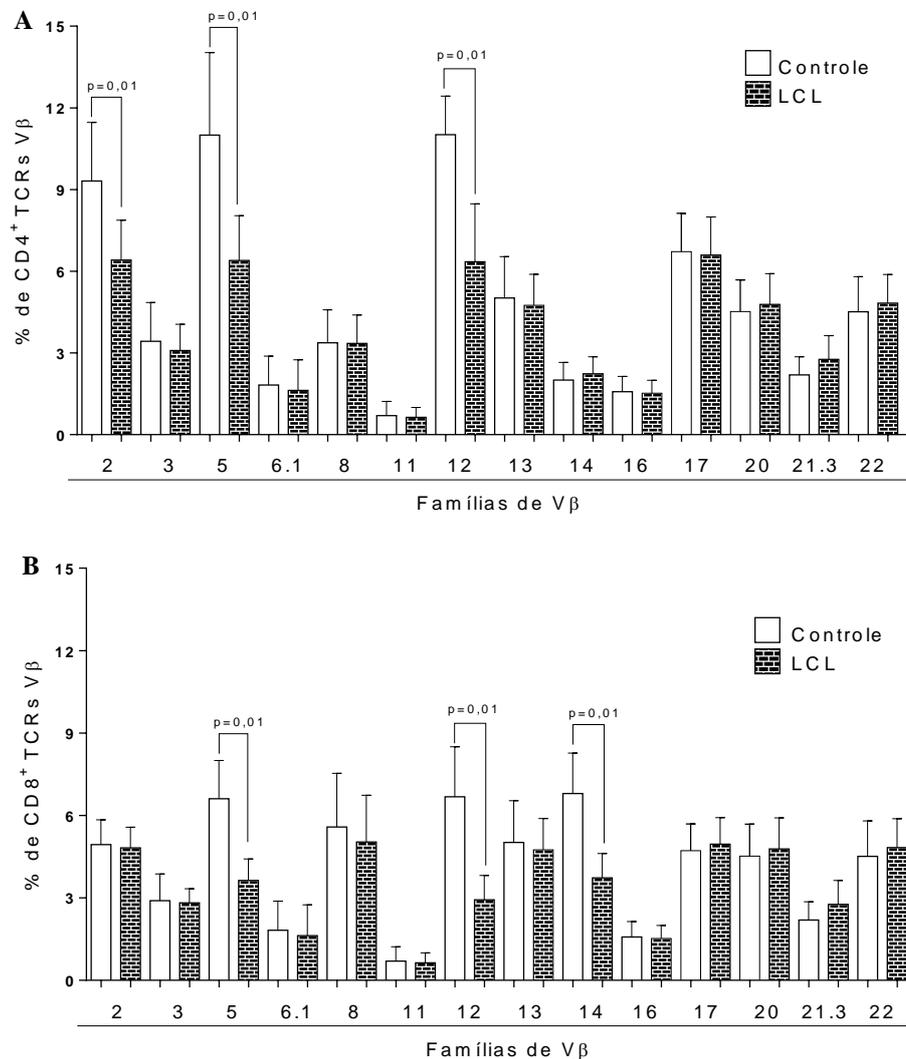


Figura 10: Os pacientes com LCL mostraram diminuição, ex vivo, na frequência dos clones Vβ2, Vβ5 e Vβ12 em células T CD4⁺ e Vβ5, Vβ12 e Vβ14 em CD8⁺ quando comparados com controles saudáveis. Frequência dos clones das células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B), de acordo com a expressão da cadeia Vβ, no sangue periférico de indivíduos saudáveis, n=15 (barras vazias) e pacientes (barras cheias), n=15. As células do sangue total de controles e pacientes com LCL foram marcadas, *ex vivo*, para a região Vβ do receptor de células T (TCR) CD4⁺ e CD8⁺, seguido por análise de citometria de fluxo. As barras representam a mediana e o desvio padrão para cada grupo, a partir dos valores que expressam o percentual em relação ao sangue total de células T CD4⁺ e CD8⁺. As médias foram comparadas através do Teste Mann Whitney com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

6.2 AVALIAÇÃO DO NÍVEL DE ATIVAÇÃO DAS CÉLULAS T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14), ATRAVÉS DA EXPRESSÃO DO CD25, CD69 E HLA-DR.

Diante da diminuição da presença dos clones Vβ2, Vβ5, Vβ12 em CD4 e Vβ5, Vβ12, Vβ14 em CD8 no sangue dos pacientes com LCL quando comparado aos controles saudáveis, foi avaliado o estado de ativação dessas células. O estado de ativação celular foi qualificado, através da expressão das moléculas CD69, CD25 e HLA-DR que indicam ativação inicial, mediana e tardia, respectivamente. Os clones CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14) nos pacientes com LCL apresentam maior estado de ativação quando comparado aos controles saudáveis, mostrados na Figura 11A e B, respectivamente. No entanto os clones CD4⁺ Vβ2, Vβ5 e CD8⁺ Vβ5, Vβ14 apresentaram marcação para ativação tardia (HLA-DR), enquanto o clone Vβ12 apresentou diferentes níveis de ativação.

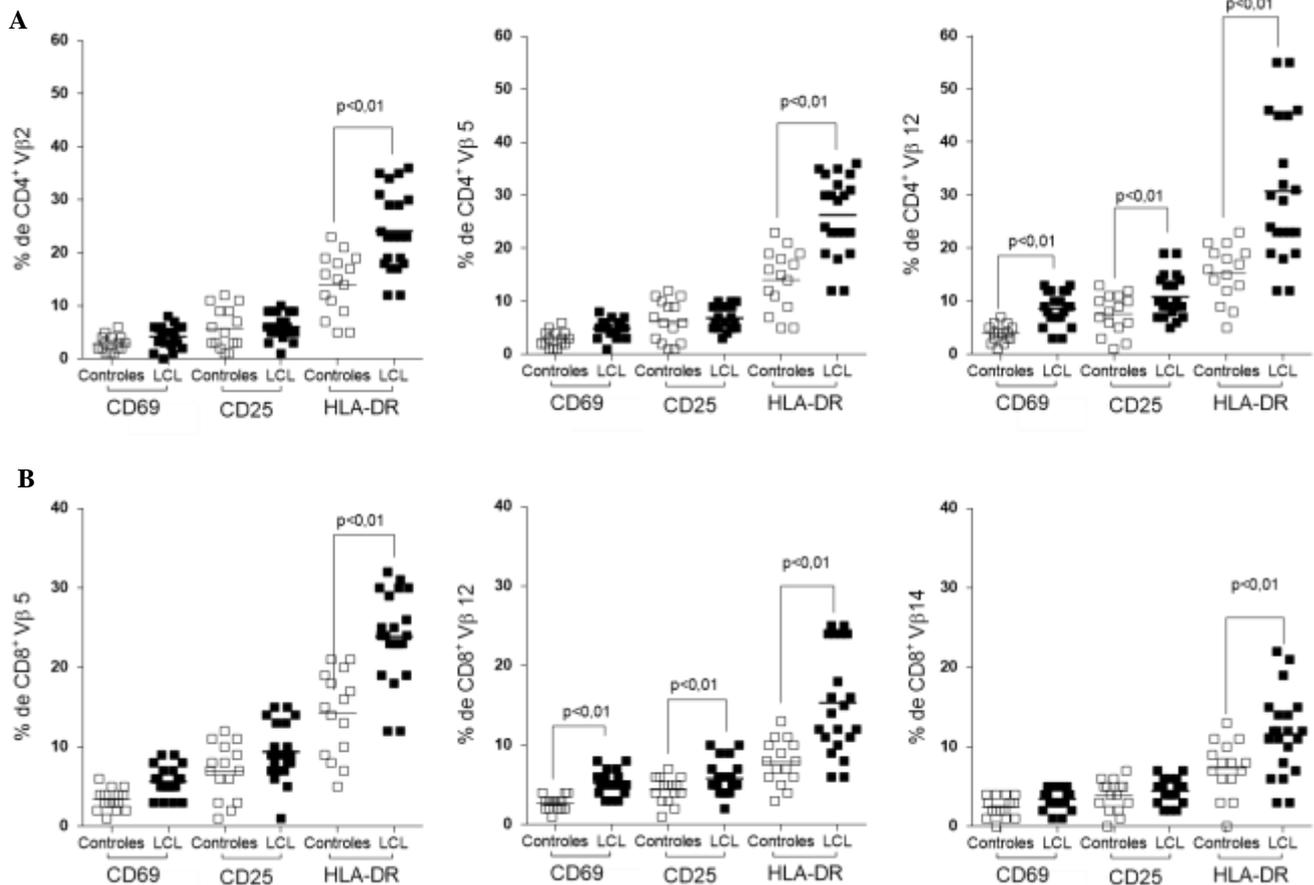


Figura 11: As células T Vβ12 apresentam diferentes níveis de ativação no sangue periférico de pacientes com LCL em relação aos controles saudáveis. Frequência de células T CD4⁺ Vβ2, Vβ5, Vβ12 (A) e T CD8⁺ Vβ5, Vβ12, Vβ14 (B) expressando os marcadores de ativação (CD25, CD69 e HLA-DR), no sangue periférico de controles saudáveis (n=15 – quadrado branco) e pacientes (n=15 – quadrado preto). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, como descrito no protocolo de utilização de solução de lise e posteriormente a expressão dos marcadores analisada por citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência de diferentes clones das células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando as moléculas de interesse. As barras representam a mediana, comparadas através do Teste de Mann Whitney, com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

6.3 COMPARAÇÃO DA FREQUÊNCIA DOS CLONES DAS CÉLULAS T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) E CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14) PRESENTES NO SANGUE PERIFÉRICO E BIÓPSIA EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA.

Os primeiros dados demonstraram que as células T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14) estão em menor frequência na corrente sanguínea dos pacientes com LCL quando comparados aos controles saudáveis, e baseado na expressão dos marcadores avaliados, se apresentam como células ativadas. Então, foi comparado a frequência dos clones de interesse entre sangue e biópsia dos pacientes selecionados (Figura 12).

As células T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5, Vβ12 – Figura 12B) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12, Vβ14 – Figura 12 D) apresentam frequência maior na biópsia quando comparado ao sangue. E a frequência dos clones avaliados apresentou correlação positiva significativa com o tamanho da lesão (Figura 12E e F). No entanto, foi observado correlação maior em relação ao tamanho da lesão e a frequência do clone Vβ12 para as células CD4 ($r^2=0,681$), enquanto para as células CD8 o clone mais relevante foi o Vβ5 ($r^2=0,697$) mostrados na Figura 12E e F, respectivamente.

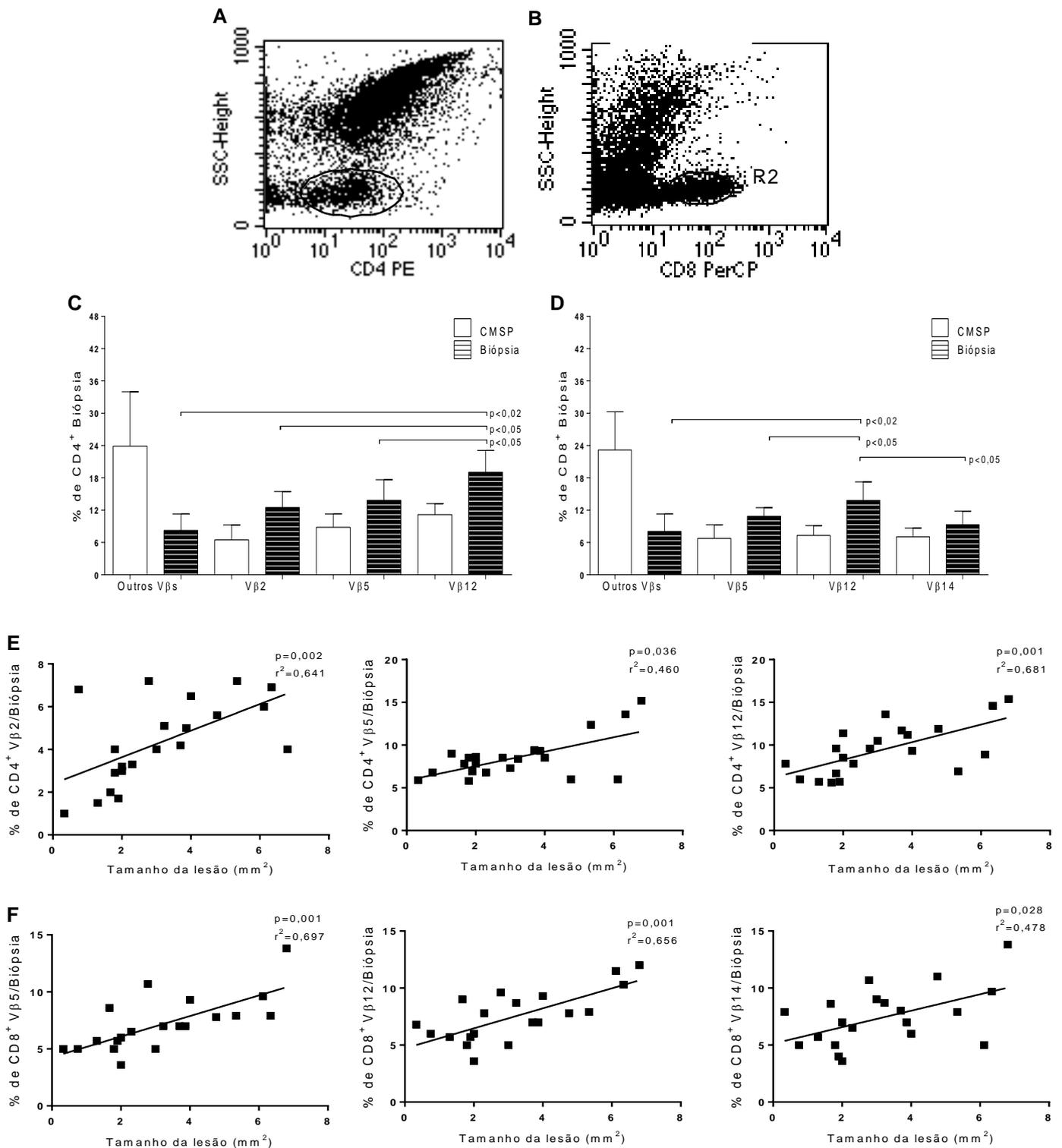


Figura 12: Os pacientes com LCL mostraram aumento, ex vivo, na frequência das populações T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 na biópsia e correlação positiva com o tamanho da lesão. Representação gráfica da população das células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) em biópsia de pacientes com LCL, analisada para determinação da frequência dos clones de interesse. Comparação da frequência dos clones Vβ2, Vβ5, Vβ12 das células T CD4⁺ (C) e Vβ5, Vβ12, Vβ14 em CD8⁺ (D), entre o sangue periférico (barras vazias, n=15) e biópsias (barras cheias, n=20) de pacientes com LCL. Correlação entre o tamanho da lesão (mm²) e a frequência dos clones Vβ2, Vβ5, Vβ12 na população de células CD4⁺ (E) e Vβ5, Vβ12, Vβ14 em CD8⁺ (F). As células do sangue e biópsia foram obtidas e marcadas como descrito no método. As médias da frequência de células de sangue e biópsia foram comparadas através do Teste de Wilcoxon. A análise de correlação foi realizada através do coeficiente de correlação de Spearman (r^2) e os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$.

6.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO CLONE V β 12 NAS CÉLULAS T CD4⁺ E CD8⁺ EM PACIENTES COM LCL.

A partir dos resultados obtidos pela análise de correlação da frequência das células T V β 12 com o tamanho da lesão e seu estado de ativação, o estudo foi direcionado para a avaliação de moléculas associadas com o endereçamento celular. Para essa caracterização foi usado a expressão das integrinas CD11a, CD18, CD29, CD49d e CD62L nas células T CD4⁺ e CD8⁺ V β 12. A expressão das moléculas de adesão foi maior estatisticamente significativa nas células T CD4⁺ e CD8⁺ V β 12 nos pacientes quando comparado aos controles saudáveis (Figura 13A e B). Essa observação sugere que as células estão sendo direcionadas para tecidos periféricos não linfóides.

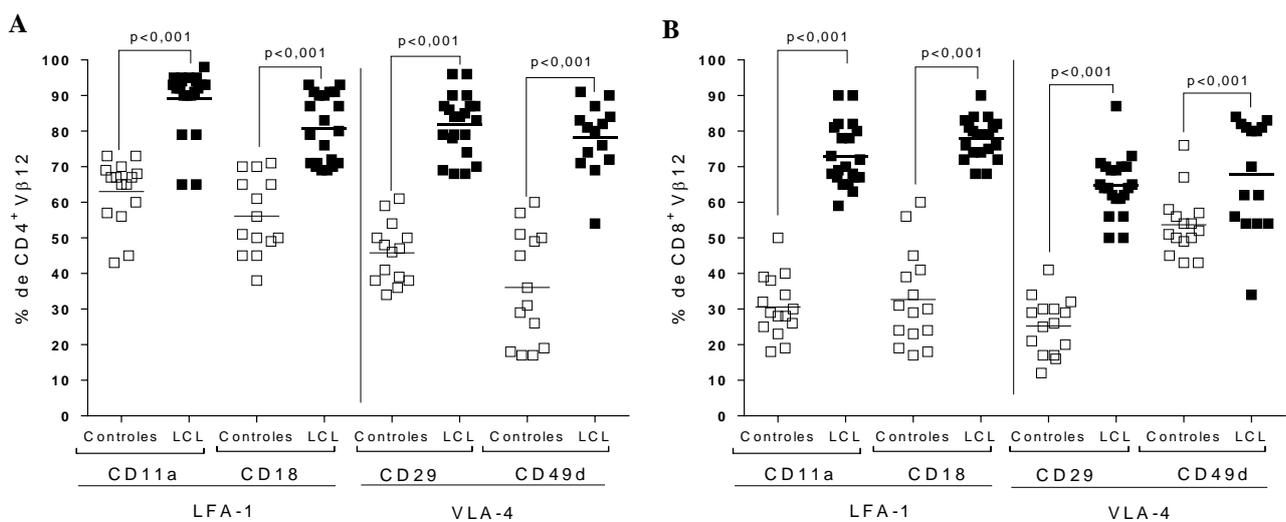


Figura 13: Células T V β 12 no sangue de pacientes com LCL expressam mais moléculas de adesão para endereçamento de tecidos lesionados. Frequência de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) V β 12 expressando as moléculas de adesão (LFA-1: CD11a, CD18; VLA-4: CD29, CD49d) no sangue periférico de controles saudáveis (n=15 – quadrado branco) e pacientes (n=15 – quadrado preto). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, como descrito no protocolo de utilização de solução de lise e posteriormente a expressão dos marcadores analisada por citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ V β 12 expressando as moléculas de interesse. As barras representam a mediana, comparadas através do Teste de Mann Whitney, com valor de p < 0,05 considerado estatisticamente significativo.

Também foi avaliado a expressão do CD62L, uma molécula que está altamente expressa em células de órgãos linfóides periféricos. Apesar da alta frequência de células expressando CD62L tanto nos pacientes quanto nos controles, duas populações com base na intensidade média de fluorescência, foram observadas: CD62L^{low} e CD62L^{high}. Como mostrado na Figura 14, os pacientes apresentaram maior frequência de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ Vβ12 (B) com expressão de CD62L do tipo *low* enquanto nos controles observamos o tipo *high*.

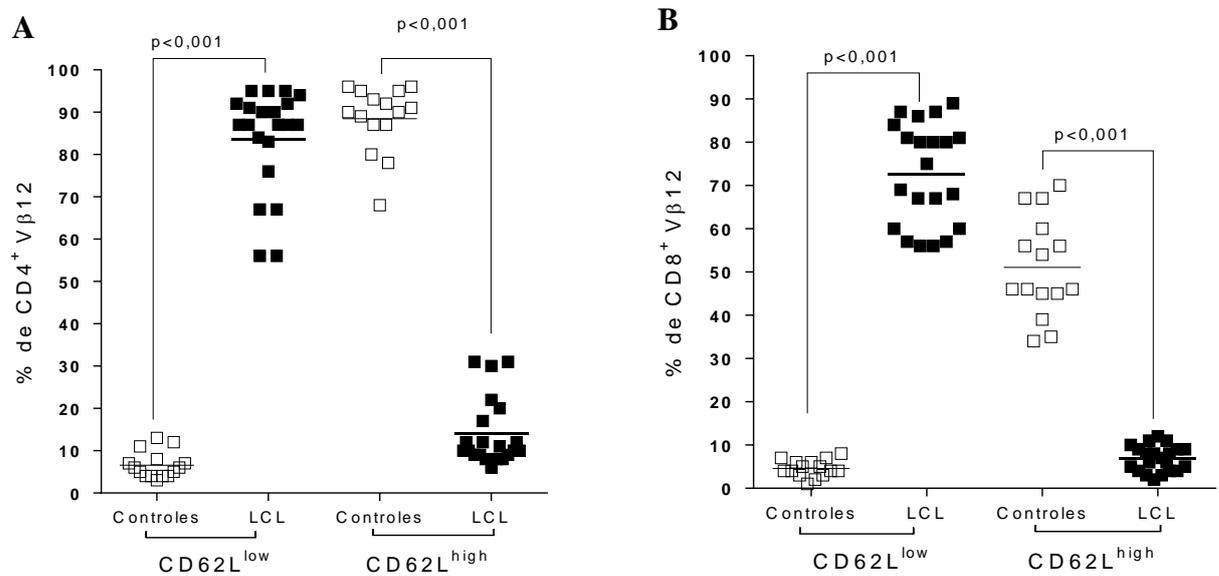


Figura 14: Células T Vβ12 possuem baixa expressão de CD62L no sangue de pacientes com LCL em relação aos controles saudáveis. Frequência de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B) Vβ12 expressando CD62L no sangue periférico de controles saudáveis (n=15 – quadrado branco) e pacientes (n=15 – quadrado preto). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, como descrito no protocolo de utilização de solução de lise e posteriormente a expressão dos marcadores analisada por citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 expressando as moléculas de interesse. As barras representam a mediana, comparadas através do Teste de Mann Whitney, com valor de p < 0,05 considerado estatisticamente significativo.

Considerando a importância da memória imunológica durante as infecções secundárias caracterizamos as subpopulações das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 do sangue periférico dos pacientes com LCL através da expressão das moléculas CCR7, CD45RA, CD45RO, CD27 e CD28. Para essa caracterização foi realizada análise das células *ex vivo* do sangue periférico de pacientes com LCL e controles saudáveis marcadas com os anticorpos específicos para cada molécula de interesses (**Painel 1:** CD4/CD8/Vβ12/CCR7/CD45RA – Figura 15A; **Painel: 2** CD4/CD8/Vβ12/CCR7/CD45RO/CD28 – Figura 16A; **Painel 3:** CD4/CD8/Vβ12/CD45RO/CD27 – Figura 17A) e as células obtidas a partir da utilização da

solução de lise e, posteriormente, a expressão dos marcadores foi determinada por citometria de fluxo.

6.4.1 Painel CCR7/CD45RA

No primeiro painel de caracterização das células de memória foi avaliado a expressão do CCR7 e CD45RA, para caracterização das células de memória. Baseado na expressão dos marcadores CCR7 e CD45RA as células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 apresentaram quatro subpopulações (Figura 15A): CCR7⁺CD45RA⁺, células *naive* (TN); CCR7⁺CD45RA⁻, células de memória central (TMC); CCR7⁻CD45RA⁻, células de memória efetora (TME); CCR7⁻CD45RA⁺, células efetoras (TE).

De acordo com a expressão das moléculas CCR7 e CD45RA os pacientes apresentam maior frequência de células T CD4 Vβ12 com características de células efetora (CCR7⁻CD45RA⁺) seguida pelas células de memória efetora (CCR7⁻CD45RA⁻) quando comparado aos controles saudáveis. Na população T CD4 Vβ12 também é observado maior frequência de células efetoras quando comparado as células de memória efetora (Figura 15B). Em relação as células T CD8 Vβ12 os pacientes apresentam maior frequência das células de memória efetora (CCR7⁻CD45RA⁻) quando comparado aos indivíduos saudáveis. Ao contrário do que é observado nas células T CD4 Vβ12, as células T CD8 Vβ12 apresentam frequência maior de células de memória efetora quando comparado a população efetora (Figura 15C). Os controles saudáveis apresentam frequência elevada de células *naive* (CCR7⁺CD45RA⁺) tanto para a população T CD4 Vβ12 (Figura 15B) quanto CD8 Vβ12 (Figura 15C) quando comparado as células de pacientes com LCL.

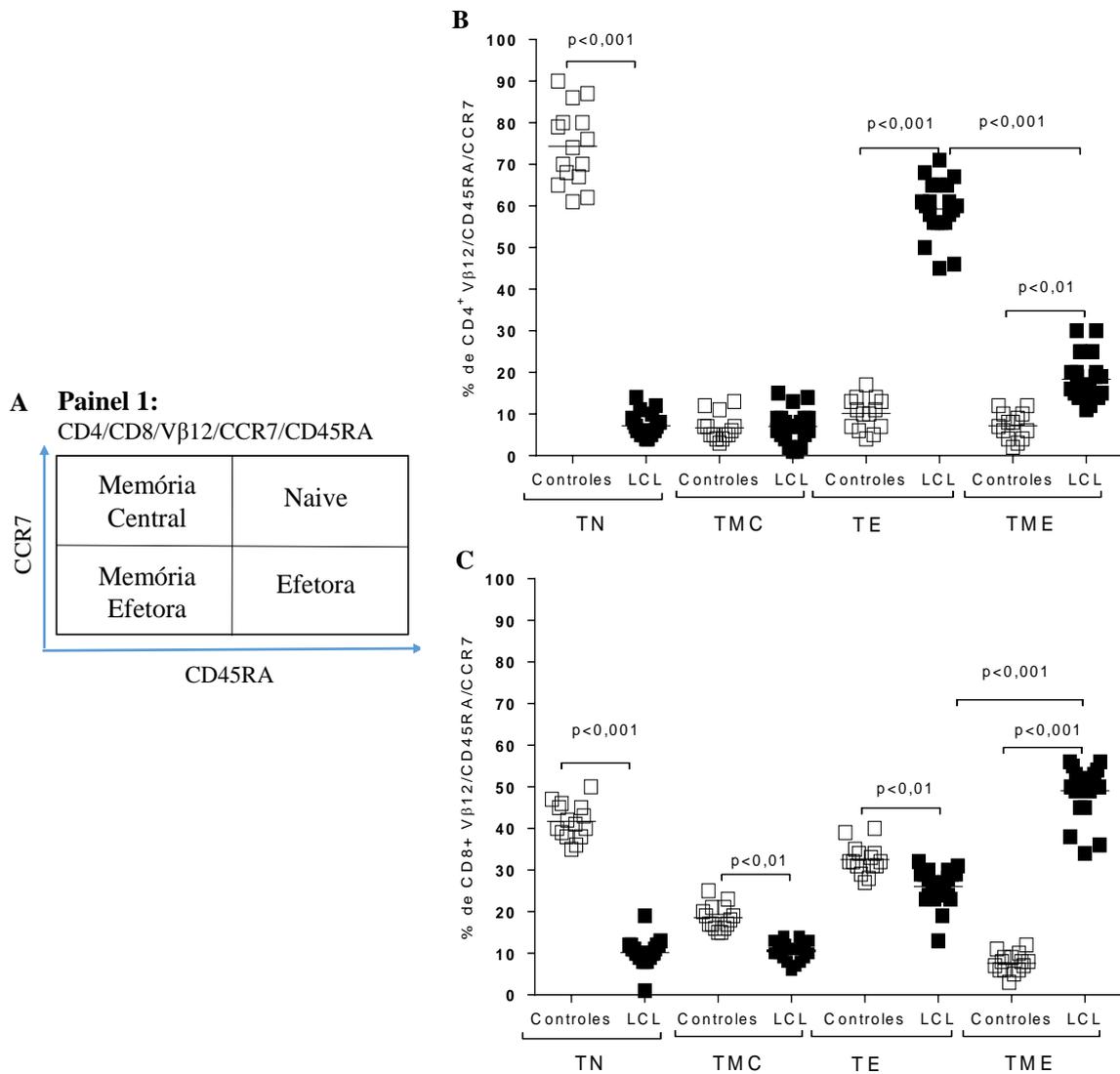


Figura 15: Células T CD4⁺ Vβ12 apresentam um fenótipo predominante de células efetoras (CCR7⁻CD45RA⁺) enquanto as células T CD8⁺ Vβ12 apresentam fenótipo predominante de células de memória efetora CCR7⁺CD45RA⁻. (A) Expressão de CCR7 e CD45RA para determinação de fenótipos *naive* / efetor / memória. Frequência de células T CD4⁺ (B) e T CD8⁺ (C) Vβ12 expressando CCR7 e CD45RA, em controles saudáveis (n=15 – quadrado branco) e pacientes (n=15 – quadrado preto). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, como descrito no protocolo de utilização de solução de lise e posteriormente a expressão dos marcadores analisada por citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 expressando as moléculas de interesse. As barras representam a mediana, comparadas através do Teste de Mann Whitney, com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significante.

6.4.2 Painel CCR7/CD45RO/CD28

Para o segundo painel de caracterização das células de memória foram utilizados os marcadores CCR7, CD45RO e CD28. Com base na expressão dos marcadores as células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 apresentam quatro subpopulações (Figura 16A): CCR7⁺CD45RO⁺CD28⁺, células de memória central (TMC); CCR7⁺CD45RO⁻CD28⁺, células *naive* (TN); CCR7⁻CD45RO⁻CD28⁻, células efetoras (TE); CCR7⁻CD45RO⁺CD28⁻, células de memória efetora (TME).

Seguindo o perfil mostrado no painel 1, o painel 2 mostra que as células T CD4 Vβ12 mantem as características de células efetora (CCR7⁻CD45RO⁺CD28⁻) seguida pelas células de memória efetora (CCR7⁻CD45RO⁻CD28⁻) quando comparado aos controles saudáveis e a frequência maior das células efetoras quando comparado as células de memória efetora (Figura 16B). Ao contrário do que é observado nas células T CD4 Vβ12, as células T CD8 Vβ12 nos pacientes apresentam frequência maior das células de memória efetora seguida das células efetora quando comparado aos indivíduos controles e frequência maior de células de memória efetora quando comparado a população efetora (Figura 16C). Os indivíduos controles, mais uma vez, apresentaram frequência maior de células *naive* (CCR7⁺CD45RO⁻CD28⁺) quando comparado as células T CD4 e CD8 Vβ12 (Figura 14B e C).

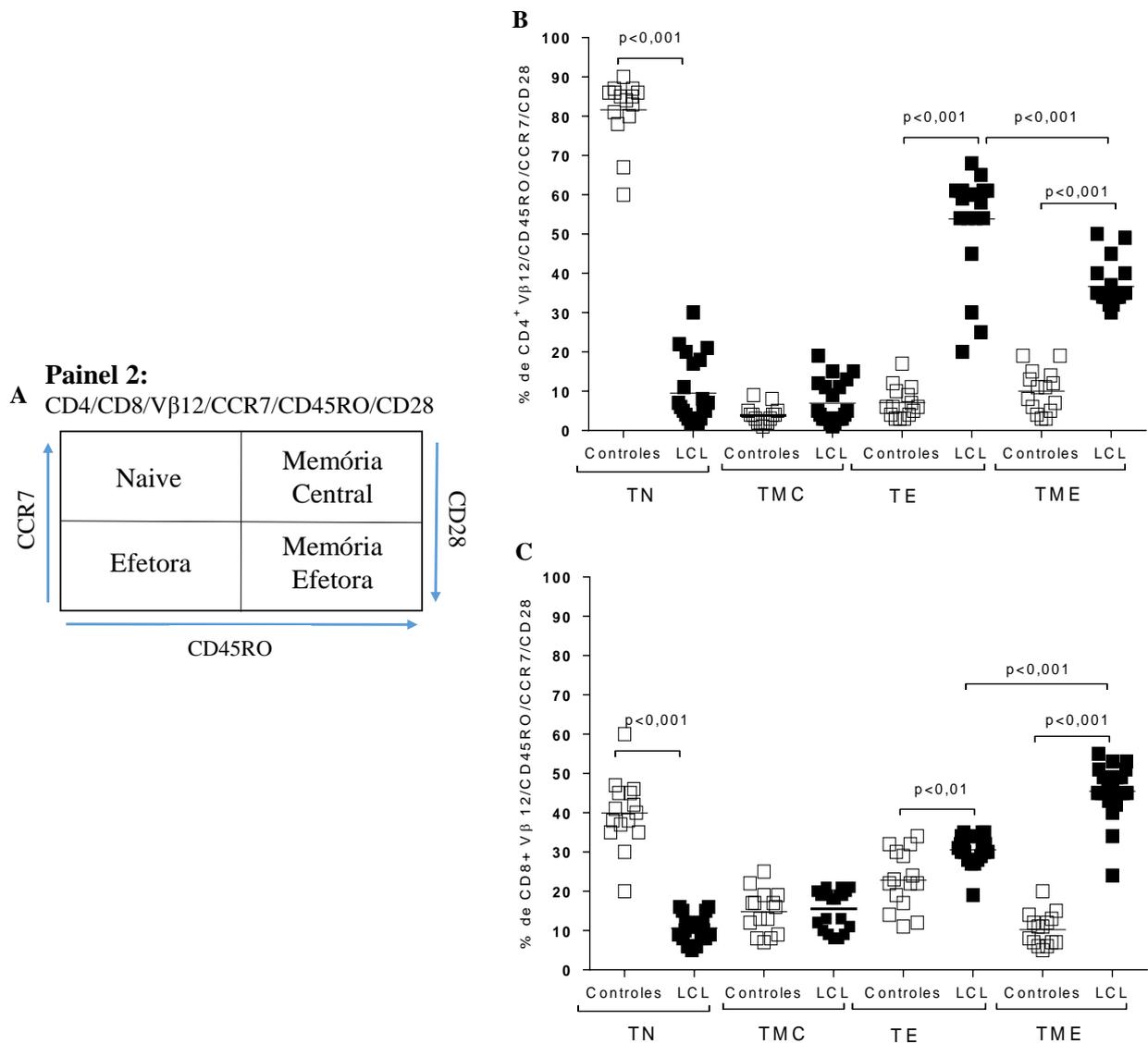


Figura 16: Células T $CD4^+$ $V\beta 12$ apresentam um fenótipo predominante de células efetoras ($CCR7^+ CD45RO^+ CD28^+$) enquanto as células T $CD8^+$ $V\beta 12$ apresentam fenótipo predominante de células de memória efetora ($CCR7^+ CD45RO^+ CD28^+$). (A) Expressão CCR7, CD45RO e CD28 para determinação de fenótipos *naive* / efetor / memória. Frequência de células T $CD4^+$ (B) e T $CD8^+$ (C) $V\beta 12$ expressando CCR7, CD45RO e CD28, *ex vivo*, de controles saudáveis ($n=15$ – quadrado branco) e pacientes ($n=15$ – quadrado preto). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, como descrito no protocolo de utilização de solução de lise e posteriormente a expressão dos marcadores analisada por citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ $V\beta 12$ expressando as moléculas de interesse. As barras representam a mediana, comparadas através do Teste de Mann Whitney, com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

6.4.3 Painel CD45RO/CD27

Para o terceiro painel de caracterização das células de memória as células foram marcadas para as moléculas CD45RO e CD27. As células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 são divididas em quatro subpopulações com base na expressão das moléculas de superfície CD45RO e CD27 (Figura 17A): CD45RO⁺CD27⁺, células de memória central (TMC); CD45RO⁻CD27⁺, células naive (TN); CD45RO⁻CD27⁻, células efetoras (TE); CD45RO⁺ CD27⁻, células de memória efetora (TME).

Assim, como mostrado nos painéis 1 (CCR7/CD45RA) e painel 2 (CCR7/CD45RO), o painel 3 mostra que as células T CD4 Vβ12 mantem maior frequência das células efetoras (CD45RO⁻CD27⁻) seguida pelas células de memória efetora (CD45RO⁺CD27⁻) quando comparado aos controles sadios (Figura 17B). No entanto, esse painel não observamos diferença na frequência das células efetoras quando comparado as células de memória efetora como na caracterização feita nos painéis 1 e 2 para as células T CD4 Vβ12. As células T CD8 Vβ12 nos pacientes apresentam frequência maior das células de memória efetora seguida das células efetora quando comparado aos indivíduos controles, ao contrário do que é observado nas células T CD4 Vβ12. A diferença na frequência de células de memória efetora, quando comparado a população efetora das células T CD8 Vβ12, foi mantida como nas análises anteriores (Figura 17C). Os indivíduos controles mais uma vez apresentaram maior frequência de células naive (CD45RO⁻CD27⁺) quando comparado as células T CD4 e CD8 Vβ12.

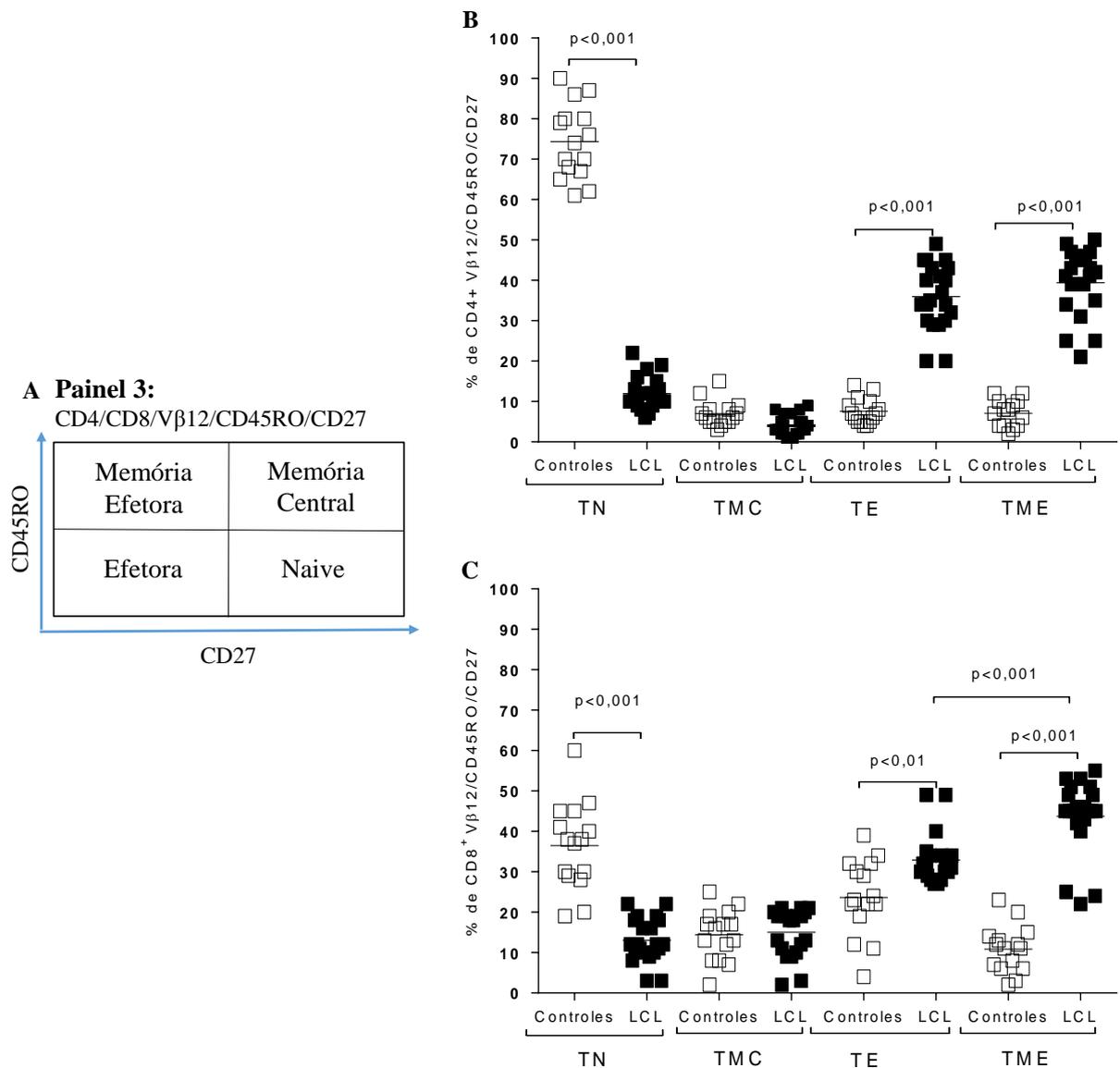


Figura 17: Células T CD4⁺ Vβ12 apresentam um fenótipo predominante de células efetoras (CD45RO⁻CD27⁻) enquanto as células T CD8⁺ Vβ12 apresentam fenótipo predominante de células de memória efetora (CD45RO⁺CD27⁺). (A) Expressão CD45RO e CD27 para determinação de fenótipos *naive* / efetor / memória. Frequência de células T CD4⁺ (B) e T CD8⁺ (C) Vβ12 expressando CD45RO e CD27, *ex vivo*, de controles saudáveis (n=15 - quadrado branco) e pacientes (n=15 - quadrado preto). As células do sangue total foram marcadas, *ex vivo*, como descrito no protocolo de utilização de solução de lise e posteriormente a expressão dos marcadores foi analisada por citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência das células T CD4⁺ e CD8⁺ Vβ12 expressando as moléculas de interesse. As barras representam a média, comparadas através do Teste de Mann Whitney, com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Foi observada correlação positiva significativa entre a frequência das células T V β 12 (efetora e memória efetora) e o tamanho da lesão (Figura 16). Em relação as células T CD4⁺ V β 12, Figura 18A, existe uma maior correlação para frequência da população de células efetoras ($r^2 = 0,774$), enquanto as células T CD8⁺ V β 12, Figura 18B, o tamanho da lesão correlaciona-se com frequência das células de memória efetora ($r^2 = 0,799$).

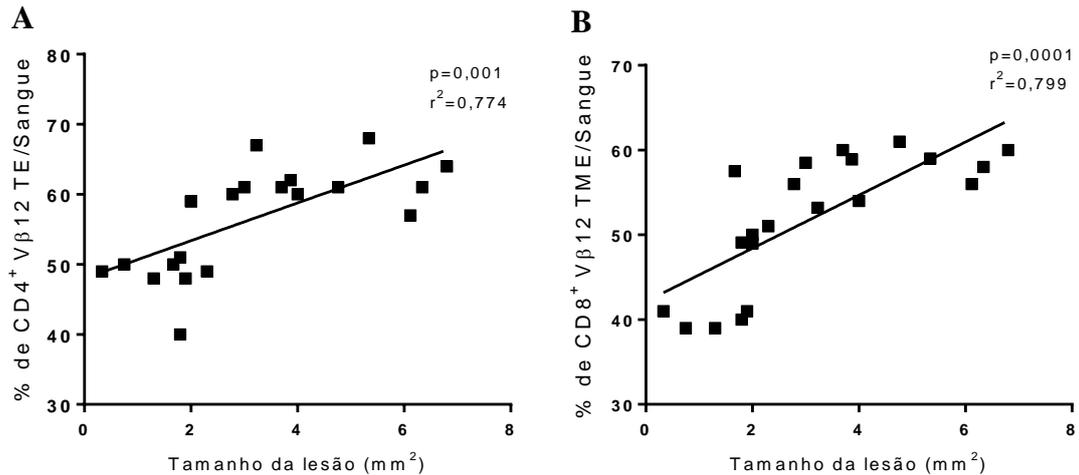


Figura 18: Frequência das células T CD4⁺ V β 12 efetora e CD8⁺ V β 12 de memória efetora estão correlacionadas ao tamanho da lesão em pacientes com LCL. Correlação entre o tamanho da lesão (mm²) e a frequência do clone V β 12 na população de células CD4⁺ efetora (A) e CD8⁺ de memória efetora (B) no sangue dos pacientes (n=20). A análise de correlação foi realizada através do coeficiente de correlação de Spearman (r^2) e os resultados foram considerados significantes com $p < 0,05$.

6.5 AVALIAÇÃO DA EXPANSÃO E PRODUÇÃO DE CITOCINAS EM CÉLULAS T CD4⁺ E CD8⁺ Vβ12 EM PACIENTES COM LCL, ESTIMULADAS COM SLA.

Para avaliar o perfil de citocinas produzidas pelas células T Vβ12, as células mononucleares de pacientes com LCL foram estimuladas *in vitro* com SLA. Para esta avaliação foi usado o potencial da citometria de fluxo para análises multiparamétricas através de marcação intracelular para as citocinas INF-γ, TNF e IL-2.

O efeito de antígenos do parasito na expansão clonal das células T Vβ12 foi avaliado, comparando a frequência das células T Vβ12 do sangue periférico de pacientes com LCL, não estimuladas e estimuladas com SLA por 48h. A presença do SLA na cultura das células de pacientes com LCL, resultou numa expansão, estatisticamente significativa, do clone Vβ12 quando comparado as células não estimuladas (meio), tanto para a população CD4⁺ (p<0,001) quanto CD8⁺ (p<0,01), representado na figura 19A e B, respectivamente.

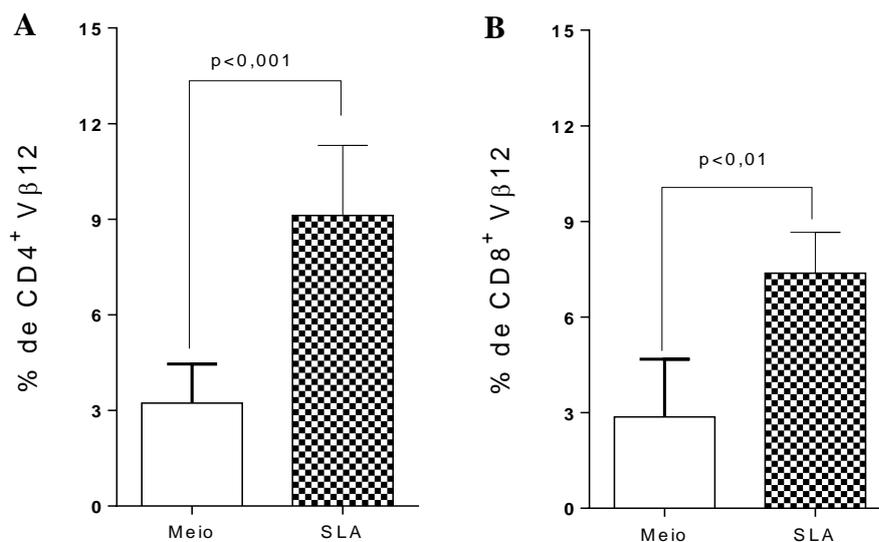


Figura 19: A estimulação, *in vitro* com SLA, das células mononucleares de pacientes com LCL induz ativação clonal das células T com expressão do Vβ12 tanto nas células T CD4⁺ quanto T CD8⁺. Expansão *in vitro* de clones das células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B), de acordo com a expressão da cadeia Vβ12. Células mononucleares provenientes do sangue periférico de pacientes foram mantidas em cultura por 48h sem estímulo, n=10 (barras vazias), bem como com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA - 10μg/ml), n=10 (barras cheias). Após o tempo de cultura, as células foram marcadas para regiões Vβ12, expressão de CD4 e CD8, seguido por análise de citometria de fluxo tal como descrito em Métodos. Os valores expressam o percentual em relação ao sangue total de células T CD4⁺ e CD8⁺. As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo, a partir dos valores que expressam o percentual em relação ao sangue total de células T CD4⁺ e CD8⁺. As médias foram comparadas através do Teste de Wilcoxon com valor de p < 0,05 considerado estatisticamente significativo.

A população das células V β 12, estimuladas com SLA, apresentou maior frequência de células marcadas para IFN- γ e TNF quando comparadas as células cultivadas na ausência de estímulo, tanto para CD4 $^{+}$ quanto para CD8 $^{+}$ (Figura 20B e D, respectivamente). Para as células T CD4 $^{+}$ V β 12 foi observado diferença, estatisticamente significativa ($p < 0,001$), entre a frequência de células positivas para IFN- γ quando comparada ao TNF (Figura 20B). A população das células CD8 $^{+}$ V β 12 apresentou frequência semelhante para a produção de IFN- γ e TNF (Figura 20D). Não foi encontrado diferença na marcação intracelular para a citocina IL-2.

A análise da população V β 12 $^{-}$ de pacientes com LCL, estimuladas com SLA, apresentou frequência maior de células marcadas positivamente tanto para INF- γ quanto TNF, quando comparadas ao meio (dados não mostrados).

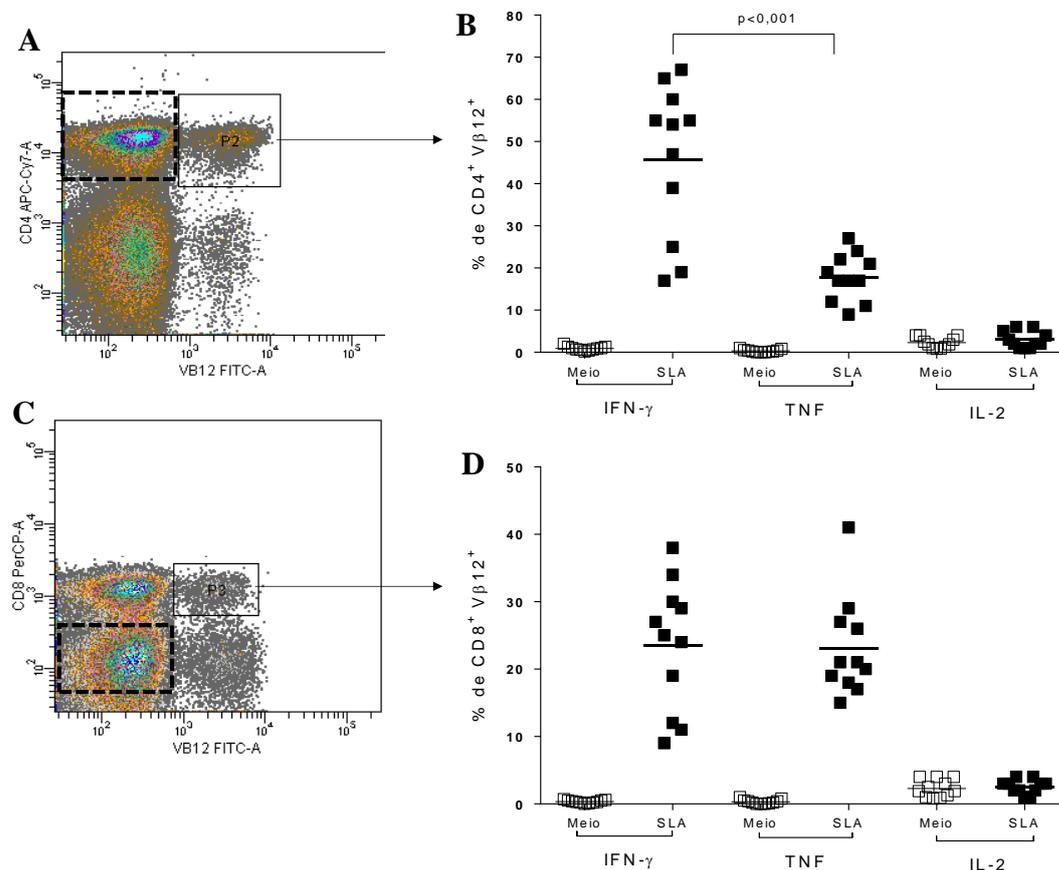


Figura 20: As células T V β 12 $^{+}$, quando estimuladas com SLA, são células produtoras de IFN- γ e TNF. Representação gráfica da população das células T CD4 $^{+}$ (A) e CD8 $^{+}$ (C) do sangue de pacientes com LCL, para definição das células V β 12 $^{+}$ (linha cheia) e V β 12 $^{-}$ (linha tracejada). Frequência da população V β 12 $^{+}$, em células CD4 $^{+}$ (B) e CD8 $^{+}$ (D), marcadas para IFN- γ , TNF e IL-2, *in vitro*. Células mononucleares, provenientes do sangue periférico de pacientes (n=11), foram mantidas em cultura por 48h sem estímulo (quadrado branco), bem como com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA - 10 μ g/ml; quadrado preto). Após o tempo de cultura, as células foram marcadas para regiões V β 12, expressão de CD4 e CD8, e produção das citocinas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo tal como descrito em Métodos. As médias foram comparadas através do Teste de Wilcoxon com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

A população $V\beta 12^+$, em células $CD4^+$ (Figura 21A) e $CD8^+$ (Figura 21B), possui maior frequência de células marcadas para IFN- γ e menor para TNF, quando comparada a população $V\beta 12^-$, sendo a diferença estatisticamente significativa ($p < 0,03$ e $p < 0,05$, respectivamente).

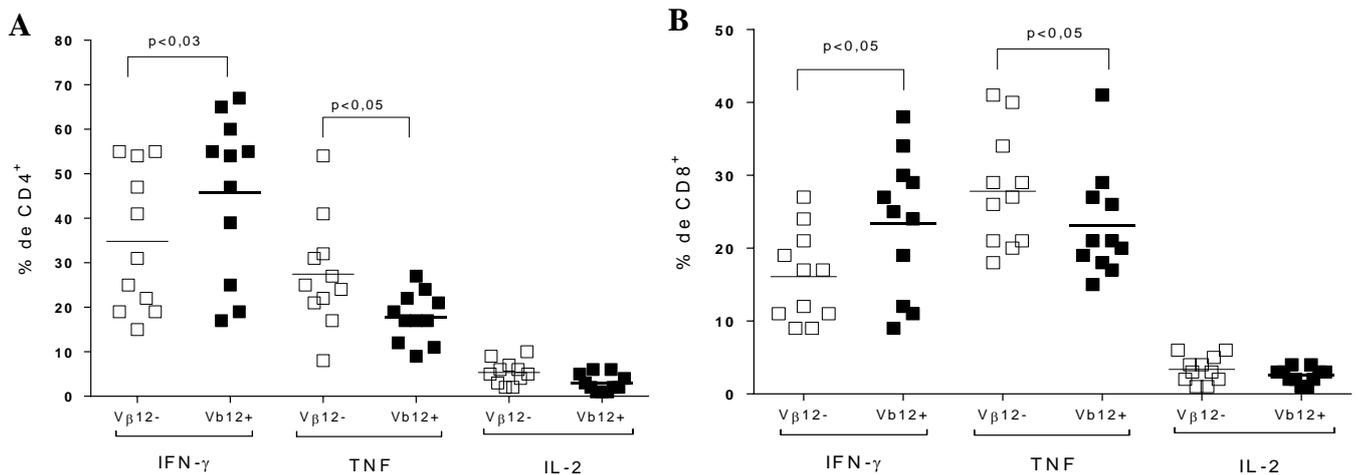


Figura 21: A população $V\beta 12^+$, quando estimuladas com SLA, possui maior frequência de células marcadas para IFN- γ , quando comparada a população $V\beta 12^-$, tanto para as células T $CD4^+$ quanto $CD8^+$. Comparação das células $V\beta 12^+$ (quadrado preto) e $V\beta 12^-$ (quadrado branco), em células $CD4^+$ (A) e $CD8^+$ (B), marcadas para IFN- γ , TNF e IL-2, *in vitro*. Células mononucleares, provenientes do sangue periférico de pacientes ($n=11$), foram mantidas em cultura por 48h sem estímulo, bem como com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA - $10\mu\text{g/ml}$). Após o tempo de cultura, as células foram marcadas para regiões $V\beta 12$, expressão de CD4 e CD8, e produção das citocinas de interesse, seguido por análise de citometria de fluxo tal como descrito em Métodos. As médias foram comparadas através do Teste de Wilcoxon com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Sabendo da capacidade funcional das células T $CD4^+$ e $CD8^+$ para a produção de IFN- γ e TNF, foi avaliado o potencial funcional definido com base em uma das possíveis combinações para a produção de IFN- γ e TNF, como apresentado na Figura 22. Através do gráfico setorial, foi observado predomínio de células T $CD4^+$ e $CD8^+$ $V\beta 12^+$ (Figura 22A e E, respectivamente) marcadas apenas para uma citocina. Avaliando as possíveis combinações, foi observado predominância, estatisticamente significativa ($p < 0,001$), das células T $CD4^+$ $V\beta 12^+$ marcadas apenas para IFN- γ^+ (Figura 22C) enquanto a população T $CD4^+$ $V\beta 12^-$ apresenta um equilíbrio na produção de IFN- γ e TNF (Figura 22D). Aproximadamente 10% da população total do clone $V\beta 12^+$ apresenta marcação positiva tanto para IFN- γ^+ quanto TNF $^+$, caracterizando seu potencial multifuncional (Figura 22A). A população T $CD8^+$ $V\beta 12^+$ (Figura 22G) mostrou maior frequência de células marcadas para ou TNF ($p < 0,001$), assim como na população T $CD8^+$ $V\beta 12^-$ (Figura 22H). Além disso, as células T $CD8^+$ $V\beta 12^+$ possuem uma subpopulação

com potencial multifuncional, com aproximadamente 30% da população total do clone V β 12⁺ (Figura 22B), estatisticamente significativa em relação a subpopulação duplo negativo (Figura 22D).

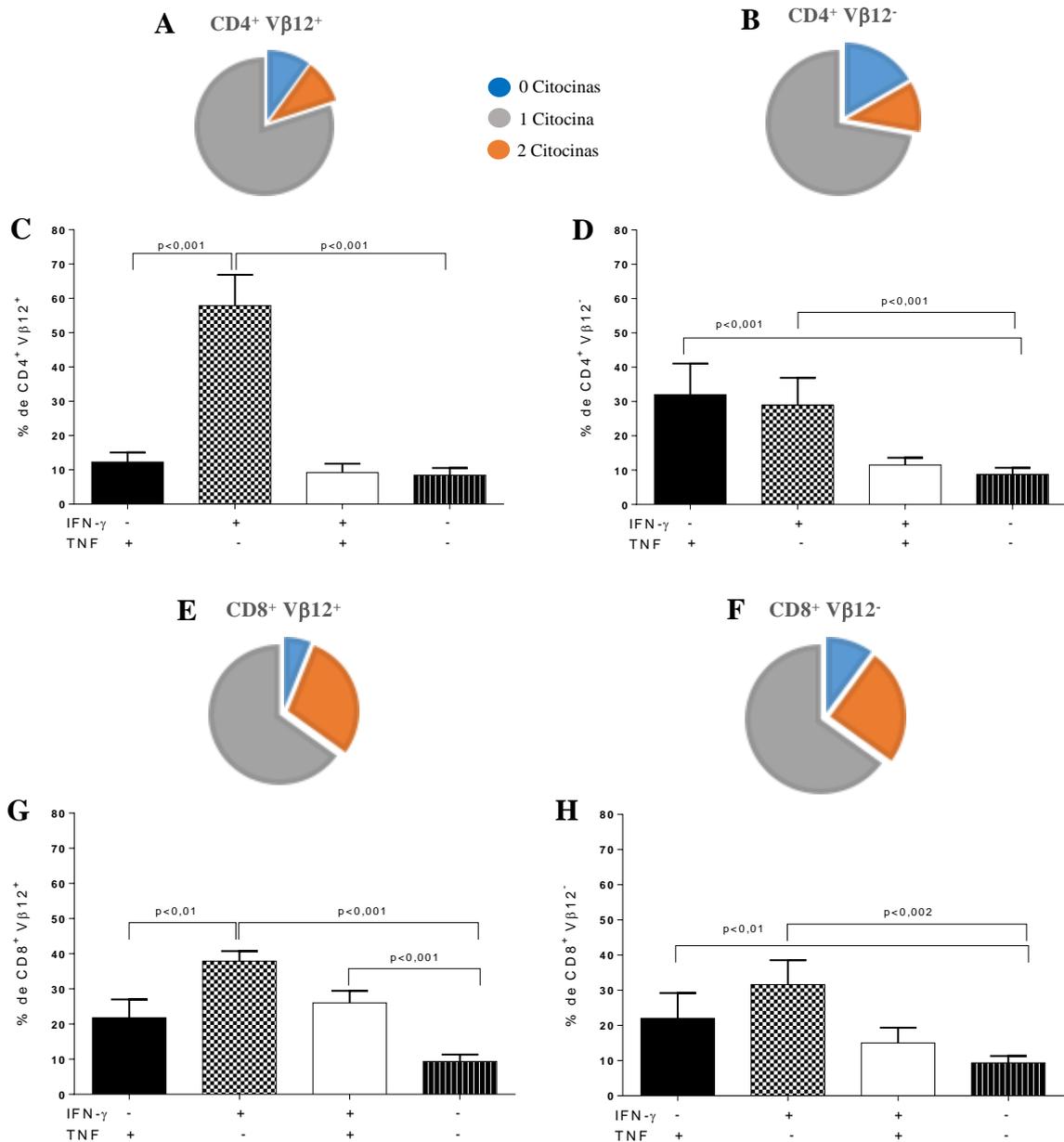


Figura 22: As células CD4⁺ e CD8⁺ V β 12⁺ são predominantemente produtoras, *in vitro*, de apenas uma citocinas. Representação em gráfico setorial, em proporções relativas, da contribuição da população V β 12⁺ (A – CD4⁺ e B – CD4⁻) e V β 12⁻ (E – CD8⁺ e F – CD8⁻) que expressam as duas citocinas (laranja - IFN- γ ⁺/TNF⁺), uma citocina (cinza - IFN- γ ⁺/TNF⁻ e IFN- γ ⁻/TNF⁺) ou negativa para as duas citocinas (azul - IFN- γ ⁻/TNF⁻). Frequência do clone V β 12 que expressa uma das quatro combinações de marcação para as citocinas IFN- γ e TNF, em V β 12⁺ (C – CD4⁺ e D – CD4⁻) e V β 12⁻ (G – CD8⁺ e H – CD8⁻). Dados obtidos a partir de ensaios *in vitro*, com células mononucleares, provenientes do sangue periférico de pacientes (n=11), mantidas em cultura por 48h sem estímulo, bem como com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA - 10 μ g/ml). As barras representam a média e o desvio padrão para cada grupo, a partir dos valores que expressam o percentual em relação ao sangue total de células T CD4⁺ e CD8⁺. As médias foram comparadas através do Teste de Wilcoxon com valor de p < 0,05 considerado estatisticamente significativo.

As células $V\beta 12^+$ são predominantemente produtoras de apenas uma citocina. Enquanto as células T $CD4^+ V\beta 12^+$ (Figura 23A) são as maiores produtoras de $IFN-\gamma$ ($p < 0,001$), como também é demonstrado para a população $V\beta 12^-$ (Figura 23B). As células T $CD8^+ V\beta 12^+$ por sua vez apresentam maior frequência para a produção de TNF em relação a $CD4^+ V\beta 12^+$ ($p < 0,01$), Figura 23A. Para a dupla marcação ($IFN-\gamma + TNF$), as células T $CD8^+ V\beta 12^+$ apresentaram maior frequência em relação a população $CD4^+ V\beta 12^+$ ($p < 0,01$). A população $V\beta 12^-$ não encontramos diferença entre $CD4^+$ e $CD8^+$ para a produção simultânea ou apenas de TNF.

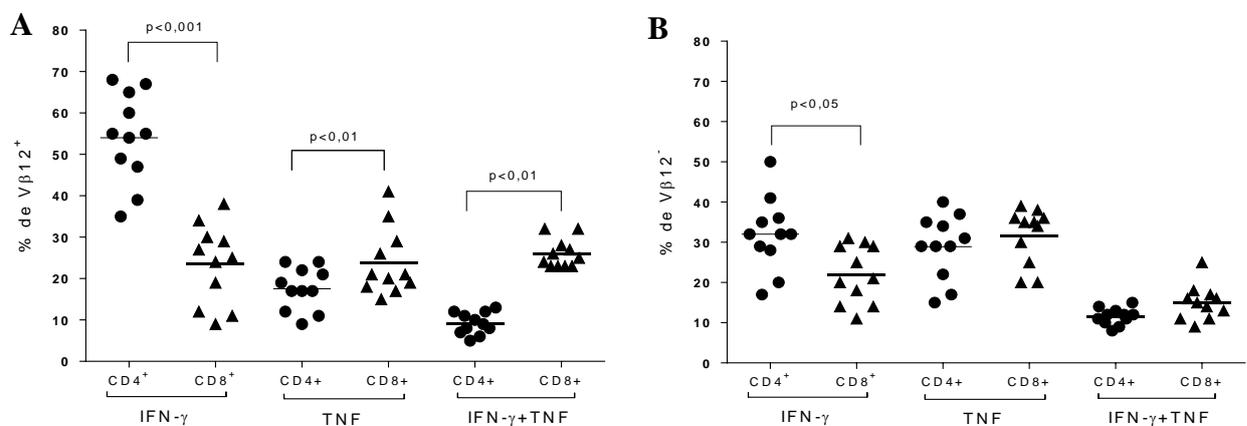


Figura 23: As células $TCD4^+ V\beta 12^+$, estimuladas com SLA, são predominantemente produtoras de $IFN-\gamma$, enquanto as $TCD8^+ V\beta 12^+$ são produtoras de $IFN-\gamma$ e TNF. Diferença na frequência entre células $CD4^+$ e $CD8^+$, nas populações $V\beta 12^+$ (A) e $V\beta 12^-$ (B) marcadas para $IFN-\gamma$ e TNF, *in vitro*. Células mononucleares, provenientes do sangue periférico de pacientes ($n=11$), foram mantidas em cultura por 48h sem estímulo, bem como com antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA - $10\mu g/ml$). As médias foram comparadas através do Teste de Wilcoxon com valor de $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

7 DISCUSSÃO

A Leishmaniose Tegumentar é uma doença causada por protozoários do gênero *Leishmania*. A maioria dos casos da forma cutânea, no Brasil, é atribuída a espécie *Leishmania brasiliensis*. As duas principais manifestações clínicas é a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) e a Leishmaniose Mucosa (LM). Os pacientes com a forma localizada, responsáveis por mais de 90% dos casos, apresentam cura espontânea e proteção imunológica duradoura ou resposta satisfatória ao tratamento com drogas leishmanicidas (COSTA, et. al., 1990; SOARES, 2014). A resposta imune celular tem papel importante tanto no processo de cura quanto de proteção na infecção por *Leishmania*, assim a avaliação das características imunológicas tem sido baseada na determinação da frequência dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e o perfil de citocinas secretadas pelos mesmos (DA-CRUZ, et al., 2002; OLIVEIRA, et.al., 2014; SANTOS, et al., 2014). A análise do repertório de células T, baseada na diversidade de expressão da cadeia V beta (Vβ) do TCR, fornece informações relevantes dos subconjuntos de células T envolvidos na resposta imune contra a *Leishmania*, para compreensão da dinâmica imunológica na LCL (KEESEN et al., 2011; FERRAZ et al., 2015). Essa compreensão é a chave para o desenvolvimento de vacinas eficazes, abordagens de imunoterapia e diagnósticos específicos.

Estudo desenvolvido por nosso grupo demonstrou existir uma expansão preferencial do clone Vβ12 nas células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue e linfonodo de pacientes com LCL, quando estimuladas com SLA. No mesmo estudo foi observado correlação positiva entre a expansão das células Vβ12⁺ com a produção rápida de IFN-γ na resposta imune *in vivo*, em indivíduos vacinados (CLARÊNCIO et al., 2006). A partir desse estudo delineamos o nosso trabalho para a caracterização fenotípica do clone Vβ12, *ex vivo*, através da expressão de moléculas de ativação, adesão e caracterização das células de memória em CMSP de pacientes com a forma localizada da LC. Essa caracterização nos fornece informações básicas relevantes sobre o estado de diferenciação dos clones envolvidos na resposta imune durante a LCL. Além disso mostramos a frequência das células T Vβ12 na biópsia de pacientes com LCL em relação a outros clones e a correlação existente entre a frequência do clone Vβ12 com o tamanho da lesão. Com o ensaio, *in vitro*, mostramos a capacidade das células Vβ12 na secreção de IFN-γ e TNF e o potencial funcional destas células na produção simultânea das citocinas. Essa caracterização funcional, nos auxilia a entender a participação e contribuição dos clones para o desenvolvimento e desfecho da patogênese. Diante da variedade de moléculas avaliadas, utilizamos a citometria de fluxo por ser uma técnica multiparamétrica, permitindo assim a análise simultânea de diferentes subconjuntos de células. A avaliação multiparamétrica foi importante para a

determinação não só das subpopulações, considerando a cadeia V β em células CD4⁺ e CD8⁺, como também para a caracterização fenotípica e funcional do clone de interesse.

Inicialmente fizemos a avaliação do repertório das células CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes com LCL da área endêmica de Jiquiriça, por ser um grupo diferente dos pacientes e vacinados estudados por Clarêncio e colaboradores em 2006. Nossos dados demonstraram que pacientes com LCL e controles saudáveis apresentam grande heterogeneidade no repertório dos clones das células T CD4⁺ e CD8⁺, assim como mostrado em estudos anteriores baseado na análise do TCR V β , avaliado tanto por citometria quanto por PCR (VAN DER BEEMD et al., 2000; MEMON et al., 2012). No entanto, observamos redução de alguns clones (V β 2, V β 5 e V β 12 em células T CD4⁺, e V β 5, V β 12 e V β 14 em células T CD8⁺) no sangue dos pacientes quando comparado aos controles saudáveis, corroborando com os dados apresentados por Clarêncio e colaboradores em 2006. Os pacientes com LCL apresentaram um repertório oligoclonal, com diminuição do clone V β 12 tanto para população de células CD4⁺, quanto CD8⁺ em relação aos controles saudáveis. Essa redução no sangue periférico pode indicar que esses clones estejam no linfonodo ou no tecido lesionado. A diminuição de determinados clones no sangue, quando comparados a outros compartimentos foram demonstrados em outros estudos. Foi observado em pacientes com esclerose múltipla que os clones diminuídos no sangue estavam presentes em maior frequência no líquido cefalorraquidiano. O mesmo foi mostrado em pacientes com tuberculose pleural quando compararam a repertório do sangue com Líquido pleural. (LI et al., 2014; DE PAULA et al., 2016).

Sugerimos, então que esses clones estão envolvidos na resposta contra a *Leishmania*. Na leishmaniose, alguns trabalhos têm correlacionado o reconhecimento dos antígenos de *Leishmania* com mudanças na expressão de moléculas de superfície e a resposta das células T (BELKAID et al., 2002; ANTONELLI et al., 2005). Observamos nas células de pacientes com LCL expressão maior das moléculas de ativação (CD25, CD69 e HLA-DR) quando comparado aos controles, nos clones das células T CD4⁺ (V β 2, V β 5 e V β 12) e CD8⁺ (V β 5, V β 12 e V β 14) do sangue periférico. No entanto, os clones CD4⁺ V β 2, V β 5 e CD8⁺ V β 5, V β 14 apresentaram marcação para ativação tardia (HLA-DR), enquanto o clone V β 12 apresentou diferentes níveis de ativação. Esses dados iniciais sugerem a existência de uma população de célula T V β 12 fenotipicamente ativa no sangue periférico de pacientes com LCL durante o desenvolvimento da lesão. Tem sido relatada a frequência de células T CD25⁺ em biópsias de lesões mais precoces em pacientes infectados com *Leishmania braziliensis* (CARVALHO et al., 2007). Células do CMSP quando estimuladas com SLA apresentaram aumento na frequência de células T

expressando CD69, e essa capacidade é mantida em pacientes curados, no entanto tende a diminuir com o tempo de cura (PEREIRA-CARVALHO et al., 2013; MENDES-AGUIAR et al., 2016).

Pacientes com LCL apresentaram correlação positiva entre a frequência de células T ativada, o tamanho e cronicidade da lesão (ANTONELLI et al., 2005; FERRAZ et al., 2015). No nosso estudo observamos frequência maior das células T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5 e Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12 e Vβ14) na biópsia quando comparado ao sangue. No entanto, a frequência do clone Vβ12 foi estatisticamente significativa em relação aos outros clones. O tamanho da lesão dos pacientes apresentou correlação positiva e significativa com a frequência dos clones avaliados para as células T CD4⁺ (Vβ2, Vβ5 e Vβ12) e CD8⁺ (Vβ5, Vβ12 e Vβ14). Resultado esperado, uma vez que a resposta imune celular em pacientes com a forma localizada da LC se apresenta como oligoclonal (UYEMURA et al., 1993, CLARÊNCIO et al., 2006; KEESEN et al., 2011). Essa resposta oligoclonal também é observada em outras doenças infecciosas, como mostrado em estudo experimental com malária e estudos em pacientes com HIV, doença de Crohn e tuberculose (LUMSDEN; CRANMER; KRZYCH, 2010; GONZÁLEZ-SERNA et al., 2013; CAMUS et al. 2013; LI et al., 2014).

Podemos especular, portanto, que o aumento da frequência das células T CD4⁺ e T CD8⁺ Vβ12 na biópsia em relação a sangue, a correlação positiva com o tamanho da lesão, o aumento na expressão dos receptores de proliferação (CD25 – IL2R) e ativação celular, está relacionada com o papel efetor exercido por essas células na resposta imune durante a infecção por *Leishmania braziliensis*. Sendo assim, concentramos nosso estudo na melhor caracterização do clone Vβ12 das células T CD4⁺ e T CD8⁺ obtidas do sangue de pacientes com LCL. A caracterização das células Vβ12 não foi feita na lesão, no presente estudo, por limitação na quantidade de células disponíveis nas biópsias para a realização das marcações necessárias para citometria. Para estudos futuros com as células da biópsia a imunohistoquímica é uma técnica que poderá ser utilizada.

A ativação das células T é acompanhada pela mudança na expressão das moléculas de adesão na superfície celular e sua subsequente migração para o tecido é essencial para a dinâmica de desenvolvimento da lesão durante a infecção por *Leishmania* (TUON et al.; 2008; SANTOS et.al., 2013). Os nossos dados mostraram células T CD4⁺ e CD8⁺Vβ12 com expressão alta das integrinas LFA-1 (CD11a/CD18), VLA-4 (CD29/CD49d) do sangue periférico de pacientes com LCL quando comparado aos controles saudáveis. Estudos também tem demonstrado a

importância dessa ligação das células T ao endotélio, através das moléculas de adesão LFA-1 e VLA-4, para reativação das células T de memória e efetoras (CHOI et al., 2004; SAGE et al., 2012; CARMAN; MARTINELLI, 2015). Ao que parece, a expressão da molécula LFA-1 nas células T e sua ligação com o CD54, presente em macrófagos, seja uma via indutora para a produção de IFN- γ . (MENDES-AGUIAR, et al., 2009).

Outra molécula avaliada que reforçou a idéia do endereçamento das células T CD4⁺ e CD8⁺V β 12 para local da lesão foi a expressão da molécula CD62L. Segundo Scott (2005), a diminuição na expressão do marcador CD62L nas células do sangue periférico dos pacientes sugere a predominância de células com endereçamento para os tecidos não linfoides, e essa expressão do CD62L é regulada de forma negativa nas células T de memória efetora. As células T CD4⁺ e CD8⁺V β 12 dos pacientes com LCL apresentaram um perfil de expressão CD62L^{low} quando comparado aos controles que apresentaram um perfil CD62L^{high}. Desta forma, os nossos dados apontam para a presença de uma população de células T CD4⁺ e T CD8⁺ que após o reconhecimento de antígenos de *Leishmania* modula negativamente a expressão desse marcador, sugerindo um fenótipo de células de memória. Dados da literatura demonstram que a população CD62L^{high} são células *naive* ou de memória central. Estas circulam entre tecidos linfoides enquanto a população CD62L^{low} são células efetoras ou de memória efetora, eficientes na secreção de citocinas no local da infecção. Células T CD4⁺ de memória central podem adquirir um fenótipo efetor depois da proliferação no linfonodo drenante para aumentar a imunidade protetora ou podem migrar para o local da infecção para manter a intensidade da resposta. (ZAPH et al., 2004; COLPITTS; DALTON; SCOTT, 2009; PETERS et al., 2014). Baseado no nosso resultado da expressão do CD62L nas células T CD4⁺ e CD8⁺V β 12 e nas moléculas usados para a caracterização de memória encontrados na literatura montamos três painéis. O objetivo de usar três painéis para a definição fenotípica do clone V β 12 foi confirmar se diferentes conjuntos de moléculas seriam capazes de manter a caracterização celular.

Para os três painéis de caracterização celular (*naive/efetora/memória*) os pacientes apresentaram um perfil predominantemente de células efetoras (CD45RO⁺CCR7⁻; CCR7⁻CD45RO⁺CD28⁻; CD45RO⁻CD27⁻) para as células T CD4⁺ V β 12 e sua frequência tem uma correlação positiva, estatisticamente significativa, com o tamanho da lesão. Nossos achados corroboram com os dados da literatura, onde os estudos vêm demonstrando que pacientes com LCL, causada por *L. braziliensis*, apresentam grande frequência das células T CD4⁺ efetoras como a principal fonte de IFN- γ e TNF, tanto sangue periférico quanto nas em lesões (FARIA et al, 2005; GAZE et al., 2006; SANTOS et. al., 2013). Em relação das células T CD8⁺V β 12

encontramos predomínio das células de memória efetora ($CD45RA^+CCR7^-$; $CCR7^+CD45RO^-CD28^-$; $CD45RO^+CD27^-$) e sua frequência tem uma correlação positiva, estatisticamente significativa, com o tamanho da lesão. As células T CD8 parecem estar diretamente relacionadas com a destruição das células infectadas, não só através de uma atividade citotóxica por meio da secreção de grânulos citotóxicos, mas também através da produção de $IFN-\gamma$ e TNF. No entanto há uma controvérsia pertencente ao papel benéfico ou prejudicial e ao momento de atuação destas células (BARRAL-NETTO et al., 1995; BERTHO et al., 2000; BOUSOFFARA et al., 2004; CARDOSO et al., 2015).

Estudos com CMSP de pacientes com LCL, após estimulação com SLA ou o parasito vivo, mostraram que a frequência de células T *naive* diminui enquanto a frequência de células T ME aumenta significativamente. O fenótipo de memória central apresenta alta capacidade proliferativa nos pacientes com elevada produção de IL-2 enquanto as células de memória efetora apresentam maior produção de $IFN-\gamma$. Essas observações estavam presentes em pacientes com lesão ativa ou curados quando comparado aos controles (KHAMESIPOUR et al., 2012; CARVALHO et al., 2013; KESHAVARZ et al., 2013).

A caracterização do clone $V\beta 12$ nos três painéis, manteve o fenótipo das células $CD4^+$, como células efectoras e células $CD8^+$, como células de memória efetora. No entanto, foi observado no terceiro painel, pequena diminuição na frequência das células T $CD4^+V\beta 12$ efectoras, que pode ser justificada pela diminuição, inicialmente da expressão do CD27 e só numa fase posterior a diminuição do CD28 (AMYES et al., 2003, VAN LEEUWEN et al., 2004). A ausência CCR7, importante marcador de endereçamento, pode ser um outro ponto que contribuiu para a diminuição na média de frequência das células *naive* e efectoras, nas células T $CD4^+V\beta 12$, no terceiro painel. O CCR7 é considerado pela literatura um importante marcador para imunofenotipagem das células *naive/efetora/memória* (DI MITRI et al, 2011; COMERFORD et al, 2013; PEREIRA-CARVALHO et al, 2013; KESHAVARZ et al., 2013).

O envolvimento das células T em resposta a um antígeno específico pode ser avaliado a partir de ensaios de expansão celular, onde a estimulação antigênica reflete na expansão de subpopulações específicas. Nossos dados, *in vitro*, mostraram que o clone $V\beta 12$, tanto em $CD4^+$ quanto $CD8^+$, apresentou expansão em resposta a estimulação antigênica, o que reforça a nossa idéia do seu envolvimento na resposta contra *Leishmania* (CLARÊNCIO, et al., 2006; KESSEN et al., 2011). Mostramos que células T $CD4^+V\beta 12$ são predominantemente marcadas apenas para $INF-\gamma$, sendo também a maior produtora quando comparada as células T $CD8^+V\beta 12$

(ANTONELLI et al., 2005; MEYMANDI et al., 2009; SANTOS et al., 2014). No estudo de Clarêncio e colaboradores, em 2006, foi demonstrado proliferação dessas células quando estimuladas com SLA e uma correlação positiva entre sua expansão e a produção rápida de IFN- γ , em células de pacientes com LCL quando imunizados com antígeno de *Leishmania amazonensis*. Esse resultado sugere existir uma resposta dominante comum entre a *Leishmania braziliensis* e *amazonenses*, decorrente da expansão de uma subpopulação semelhante de células T. No entanto, no estudo de Kessen e colaboradores, em 2011, foi demonstrado um outro clone como célula ativa durante a resposta imune. Nesse estudo, CMSP de pacientes com LCL quando estimulados com SLA, apresentaram expansão do clone V β 5.2, em células CD4⁺, fenotipicamente caracterizadas como célula de memória ativada e produtoras de INF- γ , TNF e IL10. Isso reforça da ideia da resposta oligoclonal durante a infecção por *Leishmania*.

Atualmente, a resposta Th1 é a resposta mais relevante para proteção contra parasitas intracelulares, como a *Leishmania*. No entanto, evidências demonstram que a produção elevada de IFN- γ e TNF está associada com o aumento da reação inflamatória e desenvolvimento de úlceras cutâneas. Estudos demonstraram que pacientes com LCL, causada por *L. braziliensis*, apresentam mecanismos eficazes de eliminação dos parasitas e controle da resposta inflamatória exacerbada, através do equilíbrio entre a resposta Th1 e Th2 (IL-10), associado a cicatrização das lesões (CARVALHO et al, 2012; SANTOS; BRODSKY, 2014). A qualidade de uma resposta imune Th1 tem sido relacionada com o processo de diferenciação baseado na produção de três citocinas: IL-2, IFN- γ , e TNF- α . Usamos esse perfil de citocinas para avaliar a capacidade de produção das células T CD4⁺ e CD8⁺ V β 12 e assim determinar a qualidade funcional destas células. O resultado apresentado sobre a marcação da citocina IL-2, não foi esperado, uma vez que, em ensaios *in vitro* com SLA, as células T V β 12 apresentaram expansão, ou seja, proliferação. A citocina IL-2 possui ação autócrina e parácrina no processo de proliferação celular. Essa ação parácrina, juntamente com a resposta oligoclonal apresentada pela imunidade celular contra a *Leishmania*, poderia justificar as nossas células não terem sido marcadas para IL-2. No entanto, a população V β 12⁻ que representam os outros clones também não foi marcada. Esse fato pode ser justificado pela cinética utilizada de 48h para dosagem das citocinas. A dosagem de IL-2 dev ser priorizada em tempos iniciais da cultura celular.

Estudos tem demonstrado a predominância das células T CD4⁺ para a produção de IFN- γ , no entanto é descrito uma subpopulação com perfil multifuncional. Esse perfil varia para a produção simultânea de IFN- γ /TNF ou IL-2/IFN- γ /TNF. Estudos tem associado a presença das células T CD4⁺ multifuncionais a capacidade do paciente em gerar uma resposta protetora de

longa duração (DARRAH et al., 2007; MACEDO et al., 2012; DE LUCA, 2016). Apesar da presença de uma subpopulação T CD4⁺ Vβ12 produtora de IFN-γ/TNF simultaneamente, sua frequência é muito pequena para sugerir um papel protetor. No entanto, as células T CD4⁺ Vβ12 apresentaram grande capacidade na produção do IFN-γ, caracterizando o fenótipo de ação efetora inflamatória.

Em relação a participação das células T CD8⁺, durante a resposta inume contra a *Leishmania*, ainda é controversa. O recrutamento mais tardio para o local da lesão, o aumento da produção de IL-10 após estímulo com SLA, sugerem sua participação no controle da resposta inflamatória e no processo de cicatrização (FARIA et al., 2005; DA-CRUZ et al., 2005). Entretanto, estudos tem demonstrado a sua participação na secreção de citocinas, como IFN-γ e TNF contribuindo para a eliminação do parasito e manutenção da lesão (MACHADO, 2002; DANTAS et al., 2013; CARDOSO et al., 2015). Nosso estudo, em pacientes com LCL, as células T CD8⁺ Vβ12, expandidas durante o estímulo com LCL, apresentaram produção semelhante de IFN-γ e TNF. Ferraz e colaboradores demonstraram que o clone Vβ22, para a população CD8⁺, com fenótipo de células de memória possui uma correlação positiva com o tamanho da lesão, sugerindo a oligoclonalidade para a resposta contra a *Leishmania*, também em relação as células T CD8⁺. No entanto, os autores não avaliaram o perfil funcional da célula.

A resposta de longa duração para manutenção da lesão, durante o curso de uma infecção, é determinada pela presença das células de memória, sendo estas as principais responsáveis pela produção simultânea de citocinas. As células de memória efetora apresentam um perfil duplo positivo para a produção de IFN-γ/TNF, enquanto as células de memória central são produtoras simultâneas de IL-2/IFN-γ/TNF, atendendo a capacidade de proliferação celular (PEREIRA-CARVALHO et al, 2013; THOME; FABER, 2015). Baseado na análise multiparamétrica para avaliação do potencial funcional da célula, uma subpopulação células T CD8⁺ Vβ12, apresentou marcação simultânea para IFN-γ e TNF. Dados da literatura tem demonstrado que pacientes subclínicos apresentam níveis menores na produção de INF e TNF através das células T CD8⁺, quando comparados aos pacientes com lesão ativa (KHAMESIPOUR et al., 2012). Além disso, o tratamento com bloqueadores de TNF diminuiu a frequência de células T CD8 produtoras de citocinas inflamatórias, como INF-γ e TNF (OLIVEIRA et al., 2011). Esses dados reforçam a nossa ideia de contribuição das células T CD8⁺ Vβ12 de memória efetora serem as responsáveis pela frequência de células T CD8⁺ Vβ12 que foram duplo positivo para a produção IFN-γ/TNF.

Para suprir algumas lacunas deixadas no presente estudo pretendemos avaliar os aspectos histopatológicos (características inflamatórias e a presença de necrose) e tempo de cura das

lesões dos pacientes estudados associando com a frequência das células T V β 12. Como perspectiva propomos fechar um protocolo para caracterizar as células T V β 12 na biópsia dos pacientes com LCL sintomáticos e subclínicos, seja por citometria ou imunohistoquímica. Ensaio *in vitro* para avaliar a expansão das células T CD4⁺ V β 12 efectoras e T CD8⁺ V β 12 de memória efectora e sua contribuição na destruição do parasita através da carga parasitária em macrófagos.

8. SUMÁRIO

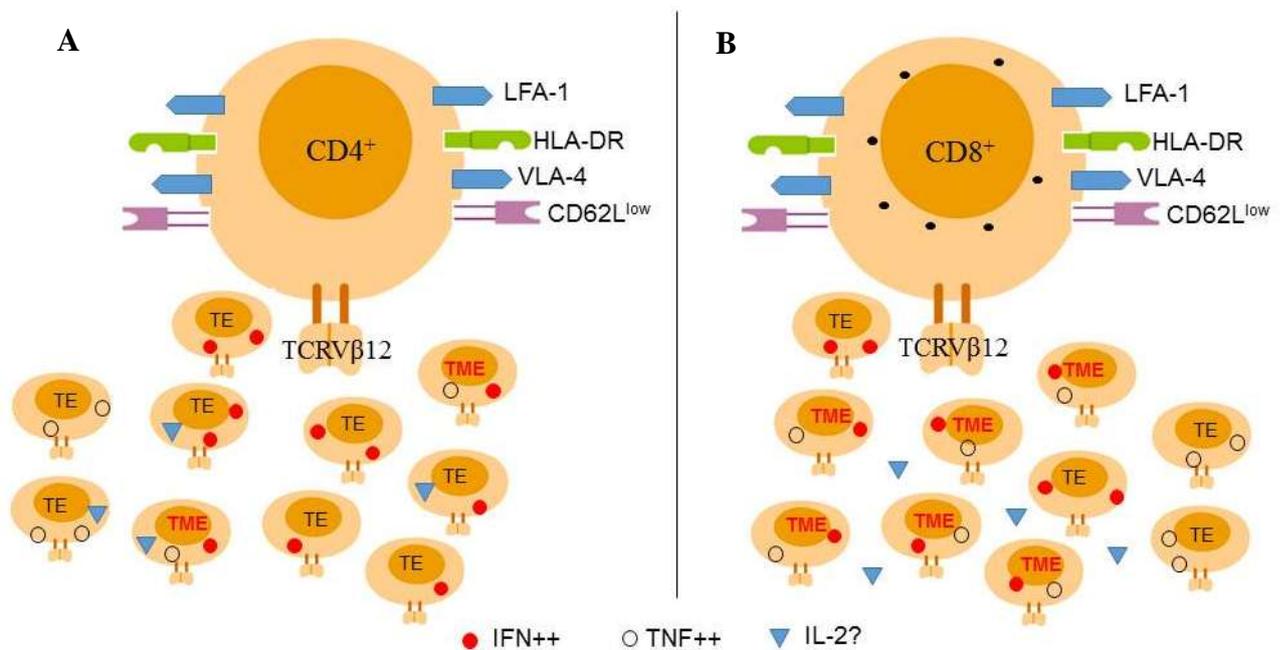


Figura 24: Modelo proposto para a caracterização fenotípica e funcional das células T CD4⁺ e CD8⁺ V β 12 durante a resposta imune em pacientes com LCL. Desenho esquemático resumindo caracterização fenotípica e funcional das células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) V β 12 na resposta imune em paciente com Leishmaniose Cutânea Localizada. As células T V β 12 ativadas com expressão das moléculas de adesão para endereçamento tecidual, sendo as células T CD4⁺ com fenótipo de célula efectora e as T CD8⁺ com característica de memória efectora. Funcionalmente com potencial para a eliminação e manutenção da lesão através da secreção de IFN- γ e TNF.

9. CONCLUSÃO

Os dados apresentados confirmam a nossa hipótese do papel fenotípico e funcional característico de células de memória em pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada apenas para as células T CD8⁺ Vβ12. A população T CD4⁺ Vβ12 são fenotipicamente células efetoras, ativadas e produtoras de IFN-γ. Enquanto as T CD8⁺ Vβ12 são fenotipicamente células de memória efetora, ativadas e produtoras de INF-γ e TNF.

Sugerimos que o clone Vβ12 contribui para a resposta inflamatória através produção de IFN-γ e TNF, assim como para manutenção da lesão devido a presença das células T CD8⁺ de memória efetora e capacidade de produção simultânea de IFN-γ e TNF.

10. REFERÊNCIAS

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis world wide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, p. 356-371, 2012.
- ANDRADE, B. B. et al. Role of sand fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand. J. Immunol.**, v. 66, n. 2, p. 122-1227, 2007.
- ANTONELLI, L. R. et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol. Lett.**, v. 101, n. 2, p. 226-230, 2005.
- ANTÔNIO, L. F. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 5, p. 375-380, 2014.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect. Immun.**, v. 70, n. 12, p. 6734-6740, 2002.
- BARRAL, A. et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, n. 3, p. 256-259, 1995.
- BARRAL-NETTO, M. et al. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 7, n. 1, p. 21-28, 1995.
- BELKAID, Y. et al. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, p. 502-507, 2002.
- BERTHO, A. L. et al. Detection of early apoptosis and cell death in T CD4⁺ and CD8⁺ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 33, n. 3, p. 317-325, 2000.
- BITTENCOURT, A. L. et al. Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. **Int. J. Dermatol.**, v.32, n. 11, p. 802-805, 1993.
- BOAVENTURA, V. S et al.. The value of the otorhinolaryngologic exam in correct mucocutaneous leishmaniasis diagnosis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 81, n. 3, p. 384-386, 2009.
- BOESTEANU, A. C.; KATSIKIS, P. D. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. **Semin. Immunol.**, v. 21, p. 69-77, 2009.
- BOMFIM, G. et al. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 5, p. 854-859, 2007.
- BORREGAARD, N.; SORENSEN, O.E.; THEILGAARD-MÖNCH, K. Neutrophil granules: a library of innate immunity proteins. **Trends Immunol.**, v. 28, n. 8, p. 340-345, 2007.
- BOUSOFFARA, T. et al. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of leishmania-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 189, n. 7, p. 1265-1273, 2004.
- BAHIA, Secretaria de Saúde do Estado. Superintendência de Vigilância Sanitária. **Taxa de incidência da leishmaniose tegumentar americana**. Salvador, 2015. Disponível

em:<<http://www3.saude.ba.gov.br/cgi/defthtm.exe?tabnet/ripsa/d0204/d0204.def>>. Acesso em: 8 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV**. Brasília, 2015. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_recomendacoes_diagnostico_leishmania_hiv.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose tegumentar americana**. 2. ed. Brasília, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_ame_ricana.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2016.

CALZADA, J. E. et al. Changes in phlebotomine sand fly species composition following insecticide thermal fogging in a rural setting of Western Panamá. **PLoS One**, v. 8, n. 1, 2013.

CAMUS, M. et al. Oligoclonal expansions of mucosal T cells in Crohn's disease predominate in NKG2D-expressing CD4 T cells. **Mucosal Immunol.**, v. 7, n. 2, p. 325-334, 2013.

CARDOSO, T. M. et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infect Immun.**, v. 83, n. 3, p. 898-906, 2015.

CARMAN, C. V.; MARTINELLI, R. T Lymphocyte-endothelial Interactions: Emerging understanding of trafficking and antigen-specific immunity. **Front. Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 603, 2015.

CARRADA, G. et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. **Parasite Immunol.**, v. 29, n. 3, p. 117-26, 2007.

CARVALHO; L. P. et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol.**, v. 29, n. 5, p. 251-258, 2007.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front. Immunol.**, v. 4, n. 3, p. 301, 2012.

CARVALHO, A. M et al. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, n. 13, p. 529, 2013.

CASTES, M. Characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin. Immunopathol.**, v. 27, n. 2, p. 176-186, 1983.

CHOW, K. V. et al. Monocyte-derived dendritic cells promote Th polarization, whereas conventional dendritic cells promote Th proliferation. **J. Immunol.**, v. 15, n. 196, p. 624-636, 2015.

CLARÊNÇIO, J. et al. Characterization of T-cell receptor vbeta repertoire in the human immune response against *Leishmania* Parasites. **Infect Immun.**, v. 74, n. 8, p. 4757-4765, 2006.

- CLARK, R. A. Skin-resident T cells: the ups and downs of on site immunity. **J. Invest. Dermatol.**, v. 130, n. 2, 362-370, 2010.
- COLPITTS, S. L.; DALTON, N. M.; SCOTT, P. IL-7 receptor expression provides the potential for long-term survival of but CD62Lhigh central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. **J. Immunol.**, v. 182, p. 5702-5711, 2009.
- COMERFORD, I. et al. A myriad of functions and complex regulation of the CCR7/CCL19/CCL21 chemokine axis in the adaptive immune system. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v. 24, n. 3, p. 269-283, 2013.
- COSTA, D. C. et al. Oral manifestations in the American tegumentary leishmaniasis. **PLoS One**, v. 11, n. 9, p. 172-184, 2014.
- COSTA, J. M. et al. Spontaneous healing of Leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in cutaneous lesions. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 23, n. 4, p. 205-208, 1990.
- COSTA, J. M. et al. Spontaneous regional healing of extensive skin lesions in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 28, n. 1, p. 45-47, 1995.
- COSTA, R. P et al. 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. **Immunol. Lett.**, v. 90, p. 155-159, 2003.
- COTA, G. F. et al. The cure rate after placebo or no therapy in American cutaneous leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PLoS One**. v. 19, n. 11, 2016.
- COUTINHO, S. G.; PIRMEZ, C.; DA-CRUZ, A. M. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 96, n. 1, p. 173-178, 2002.
- DA-CRUZ, A. M. et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clin. Diag. Lab. Immunol.**, v. 9, p. 251-256, 2002.
- DA-CRUZ, A. M. et al. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from american tegumentary leishmaniasis lesions. **Br. J. Dermatol.**, v. 153, n. 3, p. 537-543, 2005.
- DA-CRUZ, A. M. et al. Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, v. 62, n. 6, p. 2614-2618, 1994.
- DANTAS, M. L. et al. CD8⁺ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, n. 6, p. 728-734, 2013.
- DARRAH, P. A. et al. Multifunctional Th1 cells define a correlate of vaccine-mediated protection against *Leishmania major*. **Nat. Med.**, v. 13, n. 7, p. 843-850, 2007.
- DAVIS, M. M. T-cell receptors. Serial engagement proposed. **Nature**, v. 375, n. 6527, p. 104, 1995.
- DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. Cutaneous Leishmaniasis vaccination: a matter of quality. **Front. Immunol.**, v. 21, n. 7, p. 151, 2016

- DÍAZ, N. L.; ZERPA, O.; TAPIA, F. J. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 108, n.4, p. 446-452, 2013.
- DI MITRI, D et al. Reversible senescence in human CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ memory T cells. **J. Immunol.**, v. 187, n. 5, p. 2093-2100, 2011.
- DOMÍNGUEZ, M.; TORAÑO, A. Immune adherence-mediated opsonophagocytosis: the mechanism of *Leishmania* infection. **Exp. Med.**, v. 9, n. 1, p. 25-35, 1999.
- ESFANDIARPOUR I.; DABIRI S. H. Treatment of cutaneous leishmaniasis recidivans with a combination of allopurinol and meglumine antimoniate: a clinical and histologic study. **Int. J. Dermatol.**, v. 46, n. 8, p. 848-852, 2007.
- FARAJZADEH, S. et al. Comparison between intralesional injection of zinc sulfate 2 % solution and intralesional meglumine antimoniate in the treatment of acute old world dry type cutaneous leishmaniasis: a randomized double-blind clinical trial. **J. Parasit. Dis.**, v. 40, n. 3, p. 935-939, 2014.
- FARBER, D. L.; YUDANIN, N. A.; RESTIFO, N. P. Human memory T cells: generation, compartmentalization and homeostasis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 14, n. 1, p. 24-35, 2014.
- FARIA, D. R. et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. **Infect Immun.**, v. 73, n. 12, p. 7853-7859, 2005.
- FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 31, n. 8, p. 432-439, 2009.
- FAVALI, C. et al. *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of human dendritic cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 82, n. 6, p. 1401-1406, 2007.
- FEITOSA, M. A. C. et al. Diversity of sand flies in domiciliary environment of Santarém, state of Pará, Brazil: species composition and abundance patterns in rural and urban areas. **Acta Amaz.**, v. 42, n. 4, p. 507-514, 2012.
- FERRAZ, R. et al. T-cell receptor V β repertoire of CD8⁺ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 5, p. 596-605, 2015.
- FRANÇA-COSTA, J. et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, v. 211, n. 3, p. 426-435, 2015.
- FREEMAN, J. D. et al. Profiling the T-cell receptor beta-chain repertoire by massively parallel sequencing. **Genome Res.**, v. 19, n. 10, p. 1817-1824, 2009.
- GALDINO, H. JR. et al. Interleukin 32 γ (IL-32 γ) is highly expressed in cutaneous and mucosal lesions of American tegumentary leishmaniasis patients: association with tumor necrosis factor (TNF) and IL-10. **BMC Infect. Dis.**, v. 9, n. 14, 2014

- GAZE, S. T. et al. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with an unbalanced monocyte population. **Scand. J. Immunol.**, v. 63, n. 1, p. 70-78, 2006.
- GEIGER, B. et al. Resolving lesions in human cutaneous leishmaniasis predominantly harbour chemokine receptor CXCR3-positive T helper 1/T cytotoxic type 1 cells. **Br. J. Dermatol.**, v. 162, n. 4, p. 870-874, 2010.
- GLENNIE, N. D. et al. Skin-resident memory CD4⁺ T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. **J. Exp. Med.**, v. 24, n. 212, p. 1405-1414, 2015.
- GOMES, C. M. et al. Recurrent cutaneous leishmaniasis. **An. Bras. Dermatol.**, v. 88, n. 3, p. 462-464, 2013.
- GONZÁLEZ-SERNA, A. et al. CD8 TCR β chain repertoire expansions and deletions are related with immunologic markers in HIV-1-infected patients during treatment interruption. **J. Clin. Virol.**, v. 58, n. 4, p. 703-709, 2013.
- GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. **Nat. Immunol.**, v. 14, n. 5, p. 428-436, 2013.
- GROOM, J. R.; LUSTER, A. D. CXCR3 in T cell function. **Exp. Cell Res.**, v. 10, n. 5, p. 620-631, 2010.
- HARING, J. S.; BADOVINAC, V. P.; HARTY, J. T. Inflaming the CD8⁺ T cell response. **Immunity**, v.25, n.1, p.19-29. 2006.
- HUANG, W.; AUGUST, A. The signaling symphony: T cell receptor tunes cytokine-mediated T cell differentiation. **J. Leukoc. Biol.** v. 97, n. 3, p. 477-485, 2014.
- JARA, M. et al. Real-time PCR assay for detection and quantification of *Leishmania* (Viannia) organisms in skin and mucosal lesions: exploratory study of parasite load and clinical parameters. **J. Clin. Microbiol.**, v. 51, n. 6, p. 1826-1833, 2013.
- JORDAN, K. A.; HUNTER, C. A. Regulation of CD8⁺ T cell responses to infection with parasitic protozoa. **Exp. Parasitol.**, v.126, n.3, p.318-325, 2010.
- KAUTZ-NEU, K. Leishmaniasis, contact hypersensitivity and graft-versus-host disease: understanding the role of dendritic cell subsets in balancing skin immunity and tolerance. **Exp. Dermatol.**, v. 19, n. 8, p. 760-771, 2010.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat. Ver. Microbiol.**, v. 11, n. 9, p. 604-615, 2011
- KEESEN, T. S. et al. CD4(+) T cells defined by their V β T cell receptor expression are associated with immunoregulatory profiles and lesion size in human leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v.165, n. 3, p. 338-351, 2011.
- KESHAVARZ V. H. et al. CCR7⁺ central and CCR7⁻ effector memory CD4⁺ T cells in human cutaneous leishmaniasis. **J. Clin. Immunol.** v. 33, n. 1, p. 220-234, 2013.
- KHAMESIPOUR, A. et al. Phenotyping of circulating CD8⁺ T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis. **Microbes Infect.**, v. 14, n. 9, p. 702-711, 2012.

- KONING, D. et al. *In vitro* expansion of antigen-specific CD8(+) T cells distorts the T-cell repertoire. **J. Immunol Methods.**, v. 405, p. 199-203, 2014.
- KUKA, M. et al. CD70 é regulada negativamente pela interação com CD27. **J. Immunol.**, v. 91, n. 5, p. 2282-2289, 2013.
- LACY, P. The role of Rho GTPases and SNAREs in mediator release from granulocytes. **Pharmacol. Ther.**, v. 107, n. 3, p. 358-376, 2005.
- LAUNOIS, P. et al. IL-4 rapidly produced by Vbeta4 Valpha8 CD4⁺ T cell instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALBC/c mice. **Immunity**, v. 6, n. 5, p. 541-549, 1997.
- LI, D. et al. Profiling the T-cell receptor repertoire of patient with pleural tuberculosis by high-throughput sequencing. **Immunol. Lett.**, v. 162, n. 1, p. 70-80, 2014.
- LIU, Z. et al. Prevention of type 1 diabetes in the rat with an allele-specific anti-T-cell receptor antibody: Vβ13 as a therapeutic target and biomarker. **Diabetes**, v. 61, n. 5, p. 1160-1168, 2012.
- LUMSDEN, J. M.; CRANMER, M.A.; KRZYCH, U. An early commitment to expression of a particular TCR Vbeta chain on CD8(+) T cells responding to attenuated *Plasmodium berghei* sporozoites is maintained following challenge with infectious sporozoites. **Parasite Immunol.**, v. 32, n. 10, p. 644-55, 2010.
- LUO, W. et al. Changes of TCR repertoire diversity in colorectal cancer after Erbitux (cetuximab) in combination with chemotherapy. **Am. J. Câncer. Res.**, v. 19, n. 4, p. 924-933, 2014.
- LUO, W. et al. Limited T cell receptor repertoire diversity in tuberculosis patients correlates with clinical severity. **PLoS One.**, v. 7, n. 10, p. 481-490, 2012.
- LYTHE, G. et al. How many TCR clonotypes does a body maintain? **J. Theor. Biol.** v. 21, n. 389, p. 214-224; 2015.
- MACEDO, A. B. et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with american cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 167, n. 3, p. 505-513, 2012.
- MACHADO, P. et al. Evidence of in situ cytotoxicity in american cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Dermatol.**, v. 12, n. 5, p. 449-451, 2002.
- MACKAY, C. R. Dual personality of memory T cells. *Nature*, v. 14, n. 401, p. 659-660, 1999.
- MARSDEN, P. D. Mucosal Leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 6, p. 859-876, 1986.
- MEMON, S. A. et al. Quantitative analysis of T cell receptor diversity in clinical samples of human peripheral blood. **J. Immunol. Methods.** v. 375, n. 2, p. 84-92, 2012.
- MENDES-AGUIAR, C. O. et al. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. **Clin. Exp. Immun.**, v. 157, v. 3, p. 377-384, 2009.

- MENDES-AGUIAR, C. O. et al. Effector memory CD4(+) T cells differentially express activation associated molecules depending on the duration of american cutaneous leishmaniasis lesions. **Clin. Exp. Immunol.**, v. 185, n. 2, p. 202-209, 2016.
- MENDONÇA, S. C. et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Am. Jour. Trop. Med. Hyg.**, v. 53, p. 195-201, 1995.
- MEYMANDI, S. et al. Immunophenotypic pattern and cytokine profiles of dry type cutaneous leishmaniasis. **Arch. Iran. Med.** v. 12, n.4, p. 371-376, 2009.
- MIGNOGNA, M. D. et al. Mucosal leishmaniasis with primary oral involvement: a case series and a review of the literature. **Oral Dis.**, v. 21, n. 1, p. 70–78, 2015.
- MILES, J. J.; DOUEK, D. C.; PRICE, D. A. Bias in the $\alpha\beta$ T-cell repertoire: implications for disease pathogenesis and vaccination. **Immunol. Cell Biol.**, v. 89, n.3, p. 375-387, 2011.
- MUELLER, S. N. et al. Memory T cell subsets, migration patterns, and tissue residence. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 31, p. 137–161, 2013.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet.** v. 366, p. 1561–1577, 2005.
- NOGUEIRA, M. F. et al. Cytokine profile in Montenegro skin test of patients with localized cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 50, n. 6, p. 333-337, 2008.
- NOVAIS, F. O. et al. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **J. Immunol.**, v. 15 n. 183, p.8088-8098, 2009.
- OKADA, R. et al. Phenotypic classification of human CD4 T cell subsets and their differentiation. **Int. Immunology**, v.20, n. 9, p.1189–1199, 2008.
- OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127-132, 2014.
- O'SHEA, J. J.; PAUL, W. E..Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. **Science**, v. 26, n. 327, p. 1098-1102, 2010.
- PALMEIRO, M. R. et al. Comparative study of the in situ immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, v. 34, n. 1, p. 23-31, 2012.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, v. 22, n. 1, p. 1–13, 1996.
- PEPERZAK, V. et al. CD8⁺ T cells produce the chemokine CXCL10 in response to CD27/CD70 costimulation to promote generation of the CD8⁺ effector T cell pool. **J. Immunol.**, v. 15, n. 6, p. 3025-3036, 2013.
- PEPPER, M.; JENKINS, M.K. Origins of CD4(+) effector and central memory T cells. **Nat. Immunol.**, v. 12, n. 6, p. 467–471, 2011.
- PEREIRA-CARVALHO R. et al. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. **PLoS One**, v. 8, n. 11, p. e81529, 2013.

- PETERS, N. C. et al. Chronic parasitic infection maintains high frequencies of short-lived Ly6C⁺CD4⁺ effector T cells that are required for protection against re-infection. **PLoS Pathog.**, v. 4, n. 12, 2014.
- Qi, H.; POPOV, V.; SOONG, L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions in vitro and the priming of parasite-specific CD4(+) T cells *in vivo*. **J. Immunol.**, v. 167, p. 4534-4542, 2001.
- REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4⁺ subsets in leishmaniasis. **J. Cell Biochem**, v. 5, p. 323-328, 1993.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. et al. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 2, p.1025-1036, 2012.
- RITTER, U.; OSTERLOH, A. A new view on cutaneous dendritic cell subsets in experimental Leishmaniasis. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 196, n. 1, p. 51-59, 2007.
- ROBISON, M. A. et al. Organization of human T-cell receptor beta-chain genes: clusters of V beta genes are present on chromosomes 7 and 9. **Proc. Nat. Acad. Sci. USA**, v. 90, n. 6, p. 2433-2437, 1993.
- ROSALES-CHILAMA, M. et al. Parasitological confirmation and analysis of *Leishmania* diversity in asymptomatic and subclinical infection following resolution of cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 11, n. 12, 2015.
- SAGE, P. T. et al. Antigen recognition is facilitated by invadosome-like protrusions formed by memory/effector T cells. **J. Immunol.**, v. 15, n. 8, p. 3686-3699, 2012.
- SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, v. 401, n. 6, p. 708–712, 1999.
- SALLUST, O F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 22, p. 745-763, 2004.
- SANCHEZ-LOCKHART, M. et al. T cell receptor signaling can directly enhance the avidity of CD28 ligand binding. **PLoS One**. v. 24, n. 2, 2014.
- SANTOS, C. S. et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNγ(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Invest. Dermatol.** v. 133, n. 6, p. 1533-40, 2013.
- SANTOS C. S. et al. Proteome profiling of human cutaneous leishmaniasis lesion. **J. Invest. Dermatol.**, v. 135, n. 2, p. 400-410, 2014.
- SATHALIYAWALA, T. et al. Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. **Immunity**. v. 38, n. 1, p.187-197, 2013.
- SAULE, P. et al. Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4(+) versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8(+) compartment. **Mech. Ageing. Dev.**, v. 127, n. 3, p. 274-278, 2006.

- SCHENKEL, J.M.; MASOPUST, D. Tissue-resident memory T cells. **Immunity**, v. 18, n. 6, p. 886-897, 2014.
- SCHMITT, N.; UENO, H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 34, p. 130–136, 2015.
- SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol.**, v. 7, n. 12, p. 1707-1713, 2005.
- SHARIFI, I. et al. Leishmaniasis recidivans among school children in Bam, South-east Iran, 1994-2006. **Int. J. Dermatol.**, v. 49, n.5, p. 557-561, 2010.
- SOARES, M. E. et al. Epidemiological profile of individuals with american cutaneous leishmaniasis in Jequitinhonha Valley, Brazil. **East. Mediter. Health J.**, v. 19, n. 3, p. 81-88, 2014.
- SOUSA, A. P. A. et al. Intrathecal T-cell clonal expansions in patients with multiple sclerosis. **Ann. Clin. Transl. Neurol.**, v. 20, n. 6, p. 422-433, 2016.
- SURH, C. D.; SPRENT, J. Homeostasis of naive and memory T cells. **Immunity**, v. 19, n. 29, p. 848-862, 2008.
- TAVARES N. M. et al. Understanding the mechanisms controlling *Leishmania amazonensis* infection in vitro: the role of LTB4 derived from human neutrophils. **J. Infect. Dis.**, v. 210, n. 4, p. 656-666, 2014.
- TELES, C. B. et al. Phlebotomine sandfly (Diptera: Psychodidae) diversity and their *Leishmania* DNA in a hot spot of American cutaneous leishmaniasis human cases along the Brazilian border with Peru and Bolivia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 111, n. 7, p. 423–432, 2016.
- THOME, J. J. et al. Spatial map of human T cell compartmentalization and maintenance over decades of life. **Cell**, v. 159, n. 4, p. 814-828, 2014.
- THOME, J. J.; FARBER, D.L. Emerging concepts in tissue-resident T cells: lessons from humans. **Trends Immunol.**, v. 36, n. 7, p. 428-35, 2015.
- TUON, F. F. et al. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. **Clin. Immunol.**, v. 128, n. 3, p. 442-446, 2008.
- UNGER, A. et al. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 80, n. 4, p. 574-579, 2009.
- UYEMURA, H. et al. CD4⁺ type 1 and CD8⁺ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor repertoires. **Immunol.** v. 15, p. 7095-7104, 1993.
- VAN DEN BEEMD, R. et al. Flow cytometric analysis of the Vbeta repertoire in healthy controls. **Cytoetry**, v. 40, n. 4, p. 336-345, 2000.
- VAN DER MERWE, P.A.; CORDOBA, S.P. Late arrival: recruiting coreceptors to the T cell receptor complex. **Immunity**, v. 34, n. 1, p. 1-3, 2011.

- WATANABE, R. et al. Human skin is protected by four functionally and phenotypically discrete populations of resident and recirculating memory T cells. **Sci. Transl. Med.**, v. 7, n. 279, 2015.
- VENTURI, V. et al. Sharing of T cell receptors in antigen-specific responses is driven by convergent recombination. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, v. 5, n. 103, p. 1891-1896, 2006.
- WEIGLE, K.; SARAVIA, N. G. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in new world cutaneous leishmaniasis. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p. 433–450, 1996.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Wkly. Epidemiol. Rec.**, n. 22, n. 91, p. 285–296, 2016.
- WINTERBOURN, C. C. Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species. **Nat. Chem. Biol.**, v. 4, n. 5, p. 278-286, 2008.
- XIAO, Y. et al. CD27 instructs CD4⁺ T cells to provide help for the memory CD8⁺ T cell response after protein immunization. **J. Immunol.**, v. 181, n. 2, p. 1071–1082, 2008.
- XIONG, Y.; TAN, Y.; SONG, Y.G. Analysis of T cell receptor V β diversity in peripheral CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes obtained from patients with chronic severe hepatitis B. **Hepat. Mon.**, v. 14, n. 2, 2014.
- YANG, H. et al. Broad TCR usage in functional HIV-1-specific CD8-T cell expansions driven by vaccination during highly active antiretroviral therapy. **J. Immunol.**, v. 179, p. 597-606, 2007.
- ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nat. Med.**, v. 10, n. 10, p. 1104–1110, 2004.

11. ANEXOS

ANEXO I: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu _____, fui informado que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é caracterizar células T CD4 e CD8 V β na leishmaniose cutânea localizada. A parte neste estudo prece a doação de sangue e biópsia tecidual, a que serei submetido.

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

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

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

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

Ass. Voluntário

Data: ___/___/___

ANEXO II: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE IDADE

Eu _____, representante legaldo menor _____, fui informado que este estudo é uma pesquisa e que seu objetivo é caracterizar células T CD4 e CD8 V β na leishmaniose cutânea localizada. A parte neste estudo prece a doação de sangue e biópsia tecidual, a que serei submetido.

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

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

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

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

Ass. Do Representante legal

Ass. Voluntário menor

Data: ___/___/___