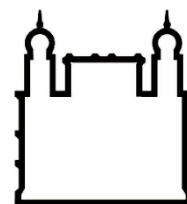




UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE
RECIDIVA CÚTIS**

LAILLA THAYSE MACEDO FARIAS

Salvador – Bahia

2020

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA
LEISHMANIOSE RECIDIVA CÚTIS**

LAILLA THAYSE MACEDO FARIAS

Orientador: Prof. Dr. Jorge Clarêncio Andrade

Dissertação apresentada ao Curso
de Pós-Graduação em Patologia
Experimental para a obtenção do
grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2020

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

F224c Farias, Lailla Thayse Macedo.
Caracterização dos aspectos imunológicos em Leishmaniose Recidiva Cútis. /
Lailla Thayse Macedo Farias. - 2020.
58 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Clarêncio Andrade, Laboratório de Inflamação e
Biomarcadores.

Dissertação (Mestrado em Patologia) – Faculdade de Medicina,
Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo
Cruz, 2020.

1. Leishmaniose. 2. Citocinas. 3. Imunidade Celular. I. Título.

CDU 616.993.161

“CARACTERIZAÇÃO DOS ASPECTOS IMUNOLÓGICOS NA LEISHMANIOSE RECIDIVA CÚTIS”.

Laila Thayse Macedo Farias


FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 13 de janeiro de 2020.


COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Jaqueline França Costa
Professora
UFBA



Dr. Thiago Marconi de Souza Cardoso
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ



Dr. Jorge Clarêncio de Souza Andrade
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001”

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia – FAPESB

A Roberta Macedo, minha mãe, pela parceria e
dedicação para realização dos meus sonhos. A
minha tia “Cleia” Farias por sempre acreditar
que essa conquista seria possível e estar
presente nas horas mais difíceis d
caminhada. Sou grata pelo amor sem medida
pelos ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Dr. Jorge Clarêncio Andrade pela parceria, compreensão, dedicação, carinho, acolhimento e por estar ao meu lado em meio a tantos desafios.

A Dra. Daniela Rodrigues Andrade pelo companheirismo desde a Iniciação Científica e co-orientação. A qual pude contar nos momentos difíceis e nas vitórias.

A Dra. Aldina Barral, Dra. Viviane Boa Ventura, Dra. Juqueline Cristal e a Msc. Manuela Costa pelas colaborações.

Aos colegas do LIB e LEITV pelo ambiente de aprendizagem e contribuições.

A estudante de iniciação científica Evelyn Farias pela oportunidade de trabalharmos juntas.

Aos colegas do curso de Pós-graduação pelo apoio diário, superação e compreensão. Com os quais pude desenvolver o aprendizado.

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

As minhas amigas Emanuelle Simões, Rafaela Dantas e Samilla Ferreira pelo companheirismo, mesmo na minha ausência e as aventuras desde o início da vida acadêmica.

A Rafael Caldas por ser luz e proteção.

A minha família, em especial vovó Valdeme Pires, tia Zoraide Farias, tio Jeovane Macedo, tia Lindaura Oliveira, meus padrinhos Miguel Souza e Rose Souza pela compreensão nos momentos em que estive ausente, pelo apoio e todo amor.

Ao CPqGM, seus funcionários e Coordenação de Ensino do curso de Pós-Graduação em Patologia e a Biblioteca de Ciências Biomédicas Eurydice Pires de Sant'Anna.

Ao CNPq e FAPESB pelo incentivo financeiro.

FARIAS, Lailla Thayse Macedo. Caracterização dos aspectos imunológicos em Leishmaniose Recidiva Cútis. 58 f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2020.

RESUMO

INTRODUÇÃO: Considerada uma forma rara da Leishmaniose Tegumentar, a Leishmaniose Recidiva Cútis (LRC) é caracterizada por lesões nodulares em torno ou no interior da cicatriz de uma úlcera previamente produzida por *Leishmania* spp., de aparecimento tardio e longa duração. **OBJETIVO:** Caracterizar citocinas, quimiocinas e células T de memória imunológica em pacientes com LRC e LCL. **MATERIAIS E MÉTODOS:** O grupo amostral é representado por 36 pacientes com LRC e 36 com LCL, diagnosticados como positivos pelo teste parasitológico e pelo teste de Montenegro. Foram dosadas as citocinas dos kits “inflamatório” (IL-1 β , IL-8, IL-10, e IL-12p40), “Th1/Th2/IL 17” (IL2, IL-4, IL-6, TNF, IFN e IL17) e “quimiocinas” (Rantes, MIG, MCP-1 e IP-10) utilizando kits Cytometric Bead Array (CBA) no plasma e *in vitro*. Para a marcação extracelular de células de memória foram utilizados anticorpos monoclonais específicos, conjugados com fluorescências para moléculas de caracterização celular (CD4⁺ ou CD8⁺). Para o painel foi inserida a marcação para células de memória CD45RO⁺ e CCR7⁺ (naive, memória efetora (TME), memória central (TMC) e células efetoras); moléculas de ativação celular (CD25, CD69 e HLA-DR) e moléculas de adesão (CD62L^{low} e CD62L^{high}). As amostras foram adquiridas no FACSFortessa (BD) e analisadas no *Graph Pad*. **RESULTADOS:** As citocinas plasmáticas dos kits “inflamatório” e “Th1/Th2/IL-17” em LRC e LCL estavam mais elevadas entre os indivíduos de lesão ativa ou curados em relação aos controles sadios. Em LRC IL-8 e IL-12p40 apresentaram significância somente dos curados em relação aos controles sadios. *In vitro*, no kit “Th1/Th2/IL-17” não foram evidenciadas diferenças ao analisar as formas clínicas isoladamente (ativos versus curados) e nem entre si (LRC versus LCL). Os níveis de IL-8 em LRC e LCL estiveram mais elevados entre os ativos e curados após estímulo com *Leishmania braziliensis*. Ao comparar LRC versus LCL MIG (CXCL9) e IP-10 (CXCL10), responsáveis pelo recrutamento celular para o local da infecção, apresentaram-se diminuídas no plasma de indivíduos com lesão ativa. Não foi detectada diferença entre as formas clínicas na expressão de CD45RO⁺ em linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória imunológica. Já os marcadores de ativação CD25 (ativação intermediária) e HLA-DR (ativação tardia) apresentaram menor expressão em pacientes com LRC em relação aos ativos por LCL, e as células T, tanto CD4⁺ quanto CD8⁺, de pacientes com LRC em relação aos pacientes LCL apresentaram menor expressão CD62L^{low}, maior quantidade de CD62L^{high} e menor quantidade de células TME no sangue periférico. **CONCLUSÕES:** Nossos dados sugerem que na LRC, a diminuição de IP-10 poderia caracterizar-se como biomarcador para identificação precoce desta forma clínica e que possa estar relacionada aos demais eventos da resposta celular (ativação, migração e memória efetora), associada a difícil resposta terapêutica e resistência ao tratamento.

Palavras-chave: Leishmaniose, Citocinas, Imunidade Celular.

FARIAS, Lailla Thayse Macedo. Characterization of immunological aspects in Cutaneous Recurrence Leishmaniasis. 58 f. Dissertation (Master in Pathology) - Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2020.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Considered a rare condition of Cutaneous Leishmaniasis, Cutaneous Recurrent Leishmaniasis (LRC) is characterized by nodular lesions around or within the scar of an ulcer previously produced by *Leishmania* spp., with late onset and long lasting. **OBJECTIVE:** To characterize cytokines, chemokines and immune memory T cells in patients with LRC and LCL. **MATERIALS AND METHODS:** The sample group is represented by 36 patients with LRC and 36 with LCL, diagnosed as positive by the parasitological test and the Montenegro test. Cytokines from the "inflammatory" (IL-1 β , IL-8, IL-10, and IL-12p40), "Th1/Th2/IL-17" (IL2, IL-4, IL-6, TNF, IFN and IL17) and "chemokines" (Rantes, MIG, MCP-1 and IP-10) using plasma and *in vitro* Cytometric Bead Array (CBA) kits. For extracellular labeling of memory cells specific fluorescence-conjugated monoclonal antibodies were used for cell characterization molecules (CD4⁺ or CD8⁺). For the panel was inserted the marking for memory cells CD45RO⁺ and CCR7⁺ (*naive*, effector memory (TME), central memory (TMC) and effector cells); cell activation molecules (CD25, CD69 and HLA-DR) and adhesion molecules (CD62L^{low} and CD62L^{high}). Samples were purchased from FACS Fortessa (BD) and analyzed on *GraphPad*. **RESULTS:** The plasma cytokines dosed in the "inflammatory" and "Th1/Th2/IL-17" kits in LRC and LCL were higher among active or healed individuals than healthy controls. In LRC IL-8 and IL-12p40 presented significance only of the cured in relation to healthy controls. *In vitro*, in the "Th1/Th2/IL-17" kit, no differences were evidenced when analyzing the clinical forms alone (active versus cured) and neither (LRC versus LCL). IL-8 levels in LRC and LCL were higher among active and cured after stimulation with *Leishmania braziliensis*. Comparing LRC versus LCL MIG (CXCL9) and IP-10 (CXCL10), responsible for cellular recruitment to the site of infection, were decreased in the plasma of individuals with active lesion. No difference was detected between clinical forms in CD45RO⁺ expression in immune memory T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺). The markers of CD25 activation (intermediate activation) and HLA-DR (late activation) showed lower expression in patients with LRC compared to those active by LCL, and CD4⁺ and CD8⁺ T cells of patients with LRC compared to patients. LCL showed lower CD62L^{low} expression, higher amount of CD62L^{high} and lower number of TME cells in peripheral blood. **CONCLUSÕES:** Our data suggest that in LRC, the decrease in IP-10 could be characterized as a biomarker for early identification of this clinical form and may be related to other cellular response events (activation, migration and effector memory), associated with difficult therapeutic response. and resistance to treatment.

KEYWORDS: Leishmaniasis, Cytokines, Cellular Immunity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	14
Figura 2	Espectro de formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	22
Figura 3	Resposta das células de memória imunológica após infecção por <i>Leishmania</i> spp.....	23
Figura 4	Representação do desenho experimental do estudo.....	28
Figura 5	Marcação de citocinas plasmáticas.....	32
Figura 6	Estratégia de <i>gates</i> para marcação extracelular de células de memória em citometria de fluxo.....	34
Figura 7	Perfil de citocinas plasmáticas do kit “inflamatório” em lesão ativa ou curados em LRC e LCL.....	36
Figura 8	Perfil de citocinas kit “TH1/TH2/IL-17” (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ , e IL-17) em lesão ativa ou curados em LRC e LCL.....	38
Figura 9	Perfil de quimiocinas (IP-10 e MIG) no plasma de pacientes com LRC e LCL em lesão ativa ou curados.....	39
Figura 10	Perfil de IL-1 β e IL-8 em plasma de pacientes com LRC e LCL com lesão ativa ou curados.....	40
Figura 11	Perfil de IP-10 e MIG em plasma de pacientes com LRC e LCL com lesão ativa ou curados.....	41
Figura 12	Perfil de citocinas (IL-8) em sobrenadante de cultura de células de pacientes com com lesão ativa ou curados por LRC e LCL.....	42
Figura 13	Perfil de quimiocinas (IP-10, MIG e MCP-1) em sobrenadante de cultura de células de pacientes com com lesão ativa ou curados por LRC e LCL.....	43
Figura 14	Expressão de CD45RO em células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do sangue periférico de pacientes com LRC e em LCL com lesão ativa.....	44
Figura 15	Expressão de CD69 (ativação inicial), CD25 (ativação intermediária) e HLA-DR (ativação tardia) e CD45RO em células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do sangue periférico de pacientes com LRC e em LCL com lesão ativa....	45
Figura 16	Expressão de CD62L e CD45RO em células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do sangue periférico de pacientes com LRC e em LCL com lesão ativa.....	45
Figura 17	Expressão de CD45RO e CCR7 em células CD4 ⁺ e CD8 ⁺ do sangue periférico de pacientes com LRC e em LCL com lesão ativa.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estratificação dos pacientes por estágio da infecção, sexo e faixa etária na LRC e LCL.....	30
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CBA	Cytometric Bead Array
CLA	Antígeno Leucocitário Cutâneo
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
ConA	Concavalina A
DC	Células Dendríticas
FL3	Detector de fluorescência 3
IDRM	Intradermoreação de Montenegro
LCC	Leishmaniose Cutânea Crônica
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose Mucosa
LRC	Leishmaniose Recidiva Cútis
LT	Leishmaniose Tegumentar
MFI	Intensidade Média de Fluorescência
MMII	Membros inferiores
MMSS	Membros superiores
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PBS	Solução tampão fosfato
SLA	Antígeno Solúvel de <i>Leishmania</i>
SBF	Soro Bovino Fetal
TMC	Célula T de Memória Central
TME	Célula T de Memória Efetora

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	13
1.2	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE RECIDIVA CÚTIS.....	16
1.3	IMUNOPATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA E RECIDIVA CÚTIS.....	21
2	JUSTIFICATIVA	26
3	HIPÓTESE	27
4	OBJETIVOS	27
4.1	OBJETIVO GERAL.....	27
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
5	MATERIAIS E MÉTODOS	27
5.1	ASPECTOS ÉTICOS.....	27
5.2	ÁREA DE ESTUDO.....	28
5.3	TIPO DE ESTUDO E ESTRATÉGIA DE ANÁLISE.....	28
5.4	GRUPO AMOSTRAL.....	29
5.5	OBTENÇÃO DO PLASMA E DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) PARA ESTIMULAÇÃO <i>IN VITRO</i>	31
5.6	IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS E <i>IN VITRO</i>	31
5.7	OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DO SANGUE TOTAL E IMUNOFENOTIPAGEM <i>EX VIVO</i>	33
5.8	AQUISIÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	34
6	RESULTADOS	35
6.1	NÍVEL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS EM PACIENTES COM LCL (FORMA CLÍNICA ATIVA, VERSUS CURADOS E VERSUS OS CONTROLES SADIOS) E LRC (FORMA CLÍNICA ATIVA, VERSUS CURADOS E VERSUS OS CONTROLES SADIOS).....	35
6.2	NÍVEL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS <i>IN VITRO</i> EM PACIENTES COM LCLL (FORMA CLÍNICA ATIVA VERSUS CURADOS) E LRC (FORMA CLÍNICA ATIVA VERSUS CURADOS).....	41

6.3	MARCAÇÃO EXTRACELULAR DE CÉLULAS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA EM LRC E LCL.....	44
7	DISCUSSÃO	47
8	CONCLUSÕES	53
	REFERÊNCIAS	54

1. INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

As leishmanioses constituem um complexo de doenças com uma ampla diversidade clínica e epidemiológica, causada pelo protozoário do gênero *Leishmania* spp. Transmitida ao hospedeiro vertebrado pela picada do flebotomíneo pertencente ao gênero *Lutzomyia* (Novo Mundo), atinge cerca de 102 países, 350 milhões de pessoas em risco, 1,3 milhões de novos casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) por ano (OPS, 2019). Consideradas um problema de saúde pública, as leishmanioses ainda estão inseridas no grupo das doenças negligenciadas, juntamente com a dengue, doença de Chagas, hanseníase, malária, esquistossomose e tuberculose (BRASIL, 2017). Cerca de 95% dos casos de LT ocorrem nas Américas, a bacia do Mediterrâneo, o Oriente Médio e Ásia Central (OPS, 2019). E mais de dois terços dos novos casos de LT ocorrem em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e a Síria. Estima-se que 0,7 milhões a 1,3 milhões de novos casos ocorrem em todo o mundo anualmente (WHO, 2016).

Esta antropozoonose tropical é predominante em zonas rurais com variabilidade desde florestas tropicais a regiões áridas, entretanto sua incidência vem aumentando em áreas urbanas e periurbanas no Novo e Velho Mundo (BRASIL, 2017). Estão entre os fatores relacionados a disseminação geográfica dos flebotomos do gênero *Lutzomyia* e sua adaptação ao ambiente urbano resultante de fatores climáticos, ambientais e socioculturais relatados em diferentes áreas endêmicas do mundo (ARAUJO *et al.*, 2016; MANOMAT *et al.*, 2017; SILVINO *et al.*, 2017; COSTA, 2018; GHATEE *et al.*, 2018). Além da importação de casos em países desenvolvidos e não endêmicos, relacionados ao turismo internacional e operações militares para áreas tropicais onde os indivíduos são expostos ao vetor sem as devidas orientações, e afluxo de imigrantes de países endêmicos, emergindo assim, novos desafios para o manejo da Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) em países não endêmicos (PÉREZ-AYALA *et al.*, 2009; KHAN *et al.*, 2019). A maior incidência está concentrada em países com condições geográficas que predispõem a continuidade do ciclo devido não apenas a fatores ambientais, mudanças climáticas e devastação de florestas, mas também associados a migrações maciças, urbanização, novos esquemas de irrigação, além dos fatores de risco individuais: HIV, desnutrição, resposta imune e genética do indivíduo (BRASIL, 2017).

A LT possui grande polimorfismo clínico (figura 1) e amplo espectro, podendo variar desde a forma difusa (LCD) (polo anérgico), infecção inaparente, cutânea localizada (LCL),

recidiva cútis (LRC), disseminada (LD) ou mucosa (LM) (polo hiperérgico) (SCORZA *et al.*, 2017). O diagnóstico é baseado em critérios clínicos (aspecto e localização das lesões), laboratoriais (IDRM, PCR, sorologia), anatomopatológicos (biópsia e esfregaço da lesão). Além destes critérios, também é possível observar diferenças entre as formas através da evolução clínica para cura espontânea, resposta terapêutica eficaz (ausência de lesão) ou resistência ao tratamento (COSTA *et al.*, 2009).

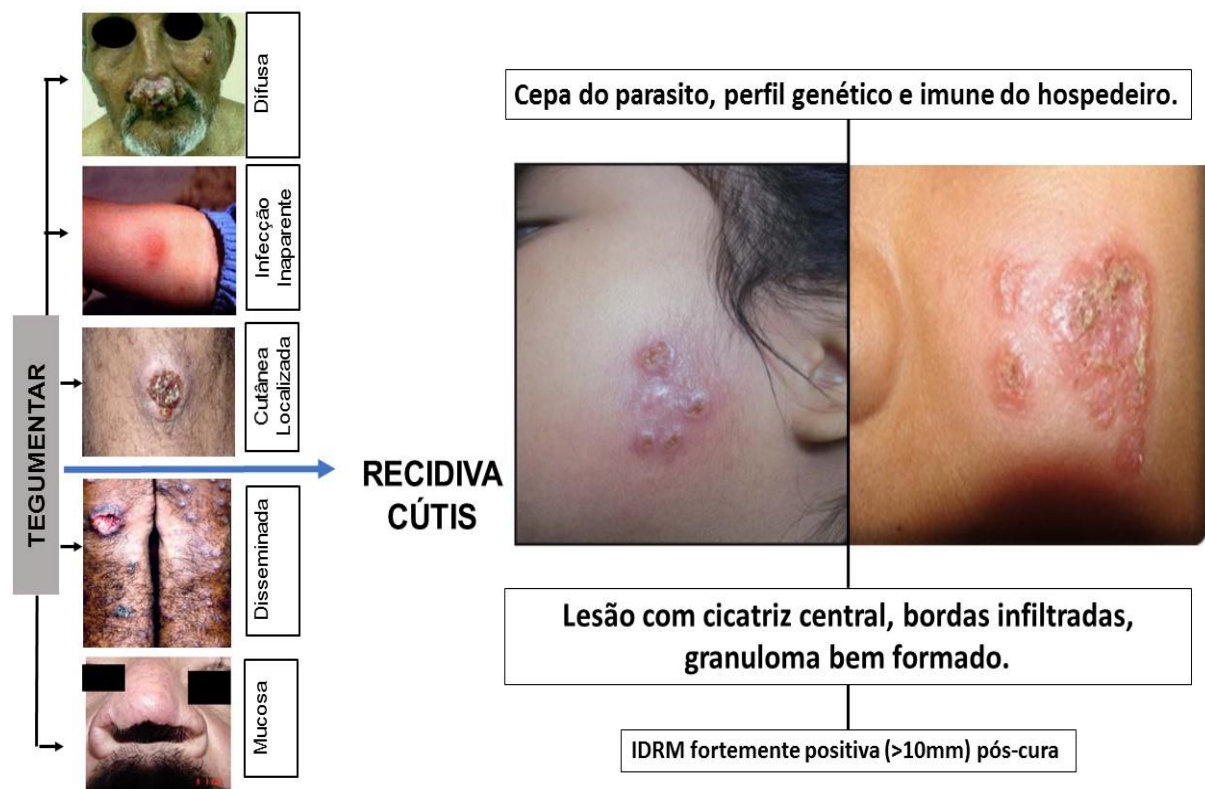


Figura 1. Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar. Adaptado de Clarêncio, *et al.*, 2008; Bacellar, 2011; Silva, 2011; Brasil, 2017; Machado *et al.*, 2019; Calvopiña, 2013.

Entre as formas clínicas a Leishmaniose Tegumentar pode apresentar-se como:

Infecção inaparente - sem manifestações clínicas, acomete indivíduos aparentemente saudáveis residentes em áreas de transmissão de LT, com história prévia negativa para a doença e ausência de cicatriz cutânea sugestiva de LT. Sendo identificada através de sorologia ou IDRM (GONTIJO; CARVALHO, 2003; COSTA *et al.*, 2009).

Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) - com presença de lesões na pele, que supostamente se iniciam pelo ponto de inoculação do parasita a partir da picada do vetor (flebotomíneos), de caráter úlcero-crostosa e posteriormente assumindo o aspecto de úlcera de contornos circulares, bordas infiltradas, em moldura, indolor e fundo com granulações

grosseiras, caracterizadas por boa resposta à terapêutica e com tendência à cura espontânea (GONTIJO; CARVALHO, 2003; COSTA *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

Disseminada (LD) – É uma forma rara caracterizada por mais de 10 lesões cutâneas papulares e de aparência acneiforme, de fundo granuloso e bordas elevadas, que acometem mais frequentemente o tronco e a face, podendo chegar a centenas de lesões em vários segmentos corporais não contíguos (CARVALHO *et al.*, 1994). Podendo ocorrer comprometimento de mucosas e eventos sistêmicos como mialgia, anorexia e astenia. Apresentando IDRMM positivo em 83% dos casos (MACHADO *et al.*, 2019).

Difusa (LCD) - Inicia-se com lesão única insidiosa de má resposta ao tratamento, que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrando grandes extensões do tegumento cutâneo do corpo indivíduos que também apresentam deficiência na resposta imune celular aos antígenos da *Leishmania* (COSTA *et al.*, 2009; BRASIL, 2017).

Leishmaniose Mucosa (LM) - Caracterizada por apresentar aspectos de cronicidade, latência e por desenvolver metástases em mucosas de vias aéreas superiores, inicialmente mucosa nasal, podendo afetar palato e faringe, evoluindo para quadros clínicos desfigurantes. Em geral esses pacientes apresentam história clínica anterior de LCL. Esse agravamento pode comprometer estruturas da face causando insuficiência respiratório de difícil manejo e consequente óbito (COSTA *et al.*, 2009; CARVALHO; MACHADO, 2017).

É importante salientar que na leishmaniose cutânea difusa (LCD), o déficit na resposta imune celular está relacionado com lesões nodulares, não ulceradas, carga parasitária aumentada, IDRMM não reator e sem formação de granuloma. Enquanto que na forma mucosa (LM) ocorre resposta imune celular exacerbada, responsável pela destruição tecidual (septo nasal ou palato) e relacionada a escassez parasitária nas lesões e a IDRMM apresentando-se flictenular (BRASIL, 2017).

Leishmaniose Recidiva Cútis (LRC) - Além destas formas clínicas, há uma apresentação rara da LT que é caracterizada por lesões nodulares em torno ou no interior da cicatriz de uma úlcera previamente produzida por *Leishmania* spp. Usualmente ocorre dois anos após a lesão inicial, possui longa duração com refratariedade à terapêutica e maior ocorrência em crianças (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998; COSTA *et al.*, 2009). Definida de acordo com os critérios de Berlin (1940), que estudou 13 casos de crianças com presença de nódulos, inicialmente isolados e em seguida confluentes em torno de uma cicatriz prévia, de aparecimento tardio. Onde foi evidenciada presença de *Leishmania* sp. nas lesões em três casos e granulomas bem formados (BERLIN, 1940).

1.2 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DA LEISHMANIOSE RECIDIVA CÚTIS

A Leishmaniose Recidiva Cútis (LRC), considerada uma afecção rara, onde os indivíduos inicialmente desenvolvem um quadro de LCL, e no período de 1-2 anos após a cura são identificadas novas lesões na cicatriz da úlcera inicial que foi produzida por *Leishmania tropica* no Velho Mundo e por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania guyanensis* no Novo Mundo. A LRC é caracterizada por lesão única em cicatriz atrófica central, e nódulos verrucosos na periferia, estendendo continuamente seus limites, geralmente no segmento superior (face, tronco MMSS e MMII) com granulomas bem formados (BERLIN, 1940; SILVA, 2011; GOMES *et al.*, 2013). Além das lesões clássicas da LRC, também há relatos de dois casos de acometimento mucocutâneo produzidos após infecção por *Leishmania aethiopica*, em região endêmica da Etiópia, África em indivíduos do sexo masculino de 16 e 17 anos com lesões em face nas margens das cicatrizes anteriores com expansão para mucosa nasal, acometimentos de lábio e mucosa oral, apresentando teste negativo para HIV (DASSONI *et al.*, 2017).

Diante da variabilidade nas lesões e relacionadas e diferentes cepas de *Leishmania*, o diagnóstico diferencial através de uma eficiente avaliação clínica e histórico do paciente é de suma relevância devido a semelhança às lesões do lúpus eritematoso discoide, lúpus vulgar ou leishmaniose lupóide, com o intuito de iniciar o tratamento precoce e reduzir a prevalência desta patologia (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998; MASOOD *et al.*, 2012). A microscopia tem apresentado baixa sensibilidade na identificação de amastigotas possivelmente relacionada a baixa densidade parasitária ou ao processo de cicatrização atribuídos a forma recidiva, o que tem dificultado o diagnóstico precoce através de biópsias de pele. Tendo em vista que a utilização de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), técnica mais eficaz na identificação do patógeno, é mais onerosa e que esta é uma morbidade que atinge classes sociais desfavorecidas financeiramente (OLIVEIRA-NETO *et al.*, 1998; SHARIFI *et al.*, 2010; GITARI *et al.*, 2018).

Diante de diversas formas clínicas com perfil de resposta diversificado, o tratamento deve ser manejado de acordo com as manifestações clínicas, número e localização das lesões, espécie de *Leishmania*, estado geral do paciente e disponibilidade de medicamentos. As respostas ao tratamento tem sido heterogêneas, dependendo da espécie do parasito, localização geográfica, perfil imune e genético do hospedeiro e da interação entre estes fatores (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2013). O uso de antimoniais pentavalentes caracteriza-se como a primeira linha para o tratamento. O efeito cardiotoxico, nefrotóxico, hepatotóxico desta droga implica que seja utilizada com cautela principalmente

em pacientes acima de 40 anos de idade. O uso de pentamidinas tem ocorrido como drogas de segunda escolha, para o tratamento de formas pouco responsivas à terapêutica, por meio das diferentes formulações de Anfotericina B, pentoxifilina, miltefosina e cetoconazol (COSTA *et al.*, 2009; ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2013).

Alguns relatos descrevem ausência de linfadenopatias e alterações laboratoriais, identificando infiltrado granulomatoso na derme constituído por linfócitos, histiócitos e células gigantes multinucleares após realização de biópsia por punção (3 mm de diâmetro). Com evolução para cura após tratamento com injeção intralesional de 1 mL de antimoniato de Glucantime duas vezes por semana, durante três semanas, apresentando redução gradual e progressiva do edema e infiltrado da lesão. Após um mês, restringindo-se a uma placa eritematosa leve (MASOOD *et al.*, 2012).

Os primeiros casos de LRC relatados no Equador foram em crianças, infectadas por *Leishmania (Viannia) panamensis* (CALVOPINA *et al.*, 2005, 2006). Em uma amostra de 132 pacientes com histórico de LCL até dois anos, apenas uma criança foi identificada com LRC (CALVOPINA *et al.*, 2005). Posteriormente, o mesmo grupo avaliou uma amostra de seis crianças com lesões papulares em cicatriz anterior produzida previamente de 1-3 anos, com diâmetro médio de 3,3 cm e 18,2 meses de evolução em média. Ao exame histopatológico apresentando hiperplasia epidérmica e um infiltrado dérmico granulomatoso composto por células linfocíticas, algumas células plasmáticas e células de Langerhans. Foi observada formação de tubérculos com células epitelioides e ausência de áreas de necrose e amastigotas (CALVOPINA *et al.*, 2006). Como alternativa a refratariedade ao tratamento de LRC, em uma criança de sete anos, com Glucantime intramuscular por 15 dias consecutivos, sem melhora das lesões, acometida por *Leishmania guyanensis*. Foi proposto tratamento tópico com Glucantime plus Merthiolate® (concentração de 50% e 50%), apresentando cicatrização das lesões após dois meses de uso (CALVOPINIÑA *et al.*, 2013). Levando em consideração o tempo prolongado do tratamento com Glucantime intramuscular, a alta toxicidade e o abandono do tratamento antes da conclusão, culminando em falha terapêutica e reativação das lesões. Foi realizado estudo com 21 pacientes com diagnóstico de LRC confirmados por esfregaço, cultura ou teste cutâneo com o intuito de avaliar a resposta à infiltração intralesional de antimoniato de meglumina. Não foi identificada a espécie de *Leishmania* envolvida. Cada paciente recebeu 1mL da medicação por quatro semanas. Após 30 dias 19 pacientes apresentaram cura clínica com resolução das lesões, podendo ser essa uma estratégia ao tratamento convencional (CALVOPINIÑA *et al.*, 2017). Na Bolívia há estudos que apontam impacto econômico e social com a mudança do uso de antimoniais pentavalentes sistêmicos para intralesional, como a

redução do custo do tratamento e menor ocorrência de eventos adversos sistêmicos (EID RODRÍGUEZ *et al.*, 2019)

A casuística da Turquia no período de 14 anos com 8786 pacientes, em foram observados apenas 2 casos de LRC, reforça a raridade dessa patologia. Dos pacientes pediátricos com LCL por *Leishmania tropica*, mais comumente no grupo de 0 a 5 anos, 29% evoluíram para LRC (ARDIC *et al.*, 2017). Em estudo desenvolvido em aldeias do Quênia-África, foram identificados cinquenta e dois casos suspeitos de LRC em indivíduos infectados por *Leishmania tropica*, predominantemente no sexo feminino (60%) e menores de 18 anos (75%), residentes na zona rural em habitação de madeira, tendo a atividade agrícola e criação animal como principal ocupação, destes casos 44% foram confirmados para LRC. O tratamento realizado através de infiltração intralesional de estibogluconato de sódio, que é o medicamento de primeira linha recomendado no Quênia, na dose de 1–5 ml (100 mg / ml) com uma dose de 20 mg / kg / dia por 6 a 12 semanas até a cicatrização, teve duração variável de 1-36 meses, onde 48% dos casos tratados de LRC foram curados no período de 1-6 meses (GITARI *et al.*, 2018).

De forma pouco frequente, também há ocorrência em mulheres idosas fora das Américas. Em indivíduo de 62 anos de sexo feminino, apresentando lesão em região temporo-malar direita, com 4 cm de diâmetro, extensa área atrófica e pápulas satélites. Nesse estudo desenvolvido na Itália, foi mantido o padrão histológico dos demais estudos com infiltrado dérmico granulomatoso composto por células linfo-histiocíticas, algumas células plasmáticas e células gigantes epiteliais de Langerhans sem áreas de necrose e exames laboratoriais normais. Não foi identificada a espécie de *Leishmania* relacionada. A paciente foi tratada com antimonato de meglumina intralesional (Glucantime) duas vezes por semana durante três semanas, evoluindo para cicatrização das lesões e manutenção de placa atrófica (CANNAVÒ *et al.*, 2000). Na Índia houve LRC no vale Caxemira, área não endêmica, próxima ao Paquistão, em idosa com 85 anos apresentando nódulos e placas na face com evolução de dois anos. Não ocorreram alterações sistêmicas e sem relatos de viagem antes do surgimento da lesão. A paciente possuía histórico de lesão no mesmo local há cinco anos, sendo tratada com estibogluconato de sódio intralesional, duas vezes por semana durante quatro semanas. Após melhora das lesões não deu continuidade ao tratamento, culminando na recidiva. Na biópsia da lesão foram encontradas amastigotas de *Leishmania Donovanii*, assim como no aspirado de linfonodos. A paciente foi tratada com estibogluconato de sódio intramuscular diário por quatro semanas (RATHER *et al.*, 2017).

Enquanto na literatura internacional há predominância em crianças, no Brasil há relatos de LRC em adultos jovens. No estado do Espírito Santo, indivíduo do sexo masculino, 39 anos, com ulceração em face associada a lesões satélites, inicialmente teve diagnóstico equivocado e tratado com antibióticos e corticoides. Após análise histológica das lesões foi identificada hiperplasia pseudoepiteliomatosa, infiltrado inflamatório acentuado com numerosas células plasmáticas e eosinófilos, distribuição perivascular e intersticial superficial e profunda na derme superficial. A seguir foi iniciado o tratamento com Glucantime (15 mg Sb/ kg/ dia por 20 dias), evoluindo com melhora clínica (FACCINI-MARTÍNEZ; FALQUETO, 2016). Apesar do antimoniato-N-metilglucamina ser padrão-ouro para LT no Brasil, observa-se que não existe na literatura nenhum tratamento considerado padrão-ouro para LRC. Até o momento não foi observada influência do tipo de tratamento para surgimento de LRC, quando comparado o uso de antimoniato-N-metilglucamina e outras drogas, como anfotericina B (GOMES *et al.*, 2015).

No estudo desenvolvido por Silva (2011), em área endêmica na região do Vale do Jequiriçá no estado da Bahia, com indivíduos infectados por *L. braziliensis*, foi proposto avaliar aspectos clínicos e evolutivos da LRC. No ano de 2001 a fevereiro de 2010, 838 casos de LT foram cadastrados e acompanhados evolutivamente no Centro de Referência em Doenças Endêmicas do Vale do Jequiriçá (CERDEJJC), sendo que 43(5,1%) destes apresentaram evolução para a LRC. Os pacientes com LRC (93%) foram diagnosticados em até dois meses do relato do surgimento da lesão. 70% (30) realizaram o teste de IDRM que apresentaram resultado positivo. A ocupação mais prevalente (58%) entre os pacientes com LRC foi de lavrador. Em relação à distribuição por faixa etária, a LRC foi mais prevalente em adultos jovens, 11 (25%) pacientes de 21-30 anos e 10 (23%) pacientes de 11-20 anos, a faixa etária de 0-10 anos correspondeu a 6 (13%) nos portadores de LRC e apenas 1 paciente idoso. Em relação ao sexo composta predominantemente por 22 (51,1%) do sexo feminino, e 21 (48,8%) do masculino, 13 (30,3%). O tamanho da lesão 0,9 cm x 0,9 cm até 11,0 x 3,0 cm, com tamanho mediano em sua maioria (de 1 a 6 cm), portadores de lesões únicas (> 75%). Apresentando lesões caracterizadas por placa infiltrada ao redor de cicatriz, eritematosa, múltiplas pápulas confluentes, violáceas, ao redor de uma cicatriz, pápulas e tubérculos róseos, ao redor de cicatriz apergaminhada, e placa ao redor de cicatriz atrófica (SILVA, 2011). Em relação aos critérios de Berlin (1940) os pacientes desse grupo amostral distinguiram-se por possuir tubérculos associados a placas confluentes, presença de lesões verrucosas e vegetantes, lesões róseas, eritematosas ou violáceas, com predomínio em adultos e lesões no segmento superior. Além disso poucos granulomas mal formados e poucas *Leishamania*s encontradas no exame histopatológico (SILVA, 2011). Enquanto que no estudo de Berlin (1940) houve predomínio

em crianças, lesões na face, presença de granulomas bem formados e ausência de *Leishmania* no material histopatológico (BERLIN, 1940).

Todos os pacientes com LRC apresentaram refratariedade ao tratamento, com média de 8,5 meses de acompanhamento e posterior evolução para cura clínica (82%). Entre os pacientes tratados, as melhores respostas terapêuticas (cura em pacientes com LRC) foram obtidas com os esquemas de Glucatime + Pentoxifilina, com 4,1 meses e Glucantime +Azitromicina + Pentoxifilina com 5,1 meses. A pior resposta foi obtida no esquema Glucantime+ Pentamidina, com 9,1 meses na obtenção da cura, podendo chegar até um ano. Ocorrendo diminuição dos casos a partir dos 50 anos de idade, possivelmente devido a menor exposição destes em áreas de risco (SILVA, 2011).

Dando continuidade aos estudos desenvolvidos por Silva (2011) na área endêmica do Vale do Jiquiriçá, Costa (2014) buscou caracterizar os aspectos clínico-imunológicos e terapêuticos da LRC. Desenvolvendo estudo retrospectivo de 13 anos, com início em 2001. Atingindo 65 pacientes cadastrados com LRC o equivalente a 5% dos pacientes com LC (1491) no mesmo período. Foi realizada IDRMM em 43% (28) do total de pacientes com LRC. Dos 65 casos de LRC a maioria tratava-se de adultos jovens, portadores de lesões únicas e de tamanho mediano (de 1 a 6 cm) com acometimento de diversos segmentos corporais (face, tronco MMSS e MMII). Entre as características das lesões estavam: placas, nódulos infiltrados, descamação, eritema, lesões satélites ao redor das cicatrizes e relatos de prurido no local. Houve predomínio entre o sexo masculino (53,8%). A terapia de 1ª escolha foi a associação das drogas Antimoniato-N-metilgucamina (405mg/Sb5+) + Azitromicina (500mg) + Pentoxifilina (400mg), sendo que nos casos de falha terapêutica instituiu-se o uso de Anfotericina B como terapia de 2ª escolha. Em 98% dos casos (63) evoluíram com refratariedade ao tratamento com posterior cura clínica (lesões totalmente cicatrizadas). O tempo médio de cicatrização total após terapia variou entre 2 a 5 meses. Apresentando IDRMM fortemente positiva (>10mm) pós-cura e tempo médio de cicatrização total após terapia que pode variar entre 2 a 5 meses (COSTA, 2014).

1.3 IMUNOPATOGÊGESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA E RECIDIVA CÚTIS

A infecção por *Leishmania* spp ocorre concomitantemente ao dano tecidual induzido pela picada do flebotomíneo, gerando uma resposta inflamatória. O parasito é abrigado majoritariamente por macrófagos, entretanto, os neutrófilos são as primeiras células inflamatórias a migrarem para o local e iniciam a resposta avidamente, fagocitando os parasitas que tem sua sobrevivência favorecida por fatores presentes na saliva dos flebotomíneos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012; CONCEIÇÃO *et al.*, 2016). A disseminação e persistência do parasita no hospedeiro dependem de estratégias capazes de modular e subverter a resposta imune inata e adaptativa (RITTER *et al.*, 2009). Posteriormente é observada a migração de células dendríticas, importantes para controlar a disseminação da infecção através da apresentação do antígeno às células T, modulando a resposta imune e induzindo o recrutamento celular (REIS E SOUSA, 2004; TAVARES *et al.*, 2014; FEIJÓ *et al.*, 2016). Ao mesmo tempo, essas células interagem com as células T, promovendo a ativação de uma resposta imune protetora, necessária para controlar a infecção (FAVALI *et al.*, 2007). A resposta imune na Leishmaniose Tegumentar envolve citocinas/ quimiocinas que desempenham papel fundamental no recrutamento de células polimorfonucleares para o local da infecção, tendo seus níveis modulados de acordo com a cepa do parasita e a das formas clínicas (KUMAR *et al.*, 2010).

Os macrófagos, após serem infectados, produzem IL-1 β , TNF- α e IL-12 que conduzem a resposta inflamatória Th1, predominante na LCL e LRC (MEYMANDI *et al.*, 2009), e as células Th2 produzem IL-10. Células dendríticas (DC), produtoras de IL-12 também participam da produção de citocinas pró-inflamatórias e atuam na apresentação do antígeno às células Th0 no linfonodo, acarretando na diferenciação de células CD4⁺ *naive* em Th1 ou Th2 (RITTER; KÖRNER, 2002; TEIXEIRA *et al.*, 2006). Concomitantemente, há expansão clonal de células TCD4⁺ e TCD8⁺, apresentando perfil de citocinas Th1, onde IL-2, IFN- γ , TNF- α e IL-12 serão produzidas com o intuito de promover ativação ou um padrão anti-inflamatório induzido por células Th2, com predomínio de IL-4 e IL-10, associadas à resistência do parasita e desenvolvimento de formas crônicas, caracterizadas por lesões disseminadas (SCOTT; NOVAIS, 2016). O equilíbrio na produção de citocinas contribui para a regulação imune de macrófagos desencadeando diferentes estados patológicos da Leishmaniose Tegumentar, variando do polo anérgico (LCD) ao hiperérgico (LM) (figura 2). Através de sinais inflamatórios do tipo Th1, conduzidos pelo aumento na produção de IFN- γ , TNF, iNOS, quimiocinas e

citocinas é que ocorrerá o recrutamento celular para o sítio de infecção associada a menor replicação do parasita no interior do fagolisossoma. A exarcebação da resposta Th1 (polo hiperérgico), apesar de baixa carga parasitária na lesão, está relacionada a maior dano tecidual como ocorre na LM. Já o predomínio da resposta Th2, com perfil regulatório, conduzida por citocinas como IL-4, IL-10 e TGF- β está associada a formas anérgicas como a LCD, em que há elevação da replicação parasitária no fagolisossoma com refratariedade ao tratamento (SCOTT; NOVAIS, 2016; SCORZA *et al.*, 2017). Entre os polos do espectro clínico produzido por *Leishmania spp.* encontram a LCL e LRC com perfil de citocinas mais equilibrado e predomínio de resposta Th1 em dosagens *in situ* (SCORZA *et al.*, 2017).

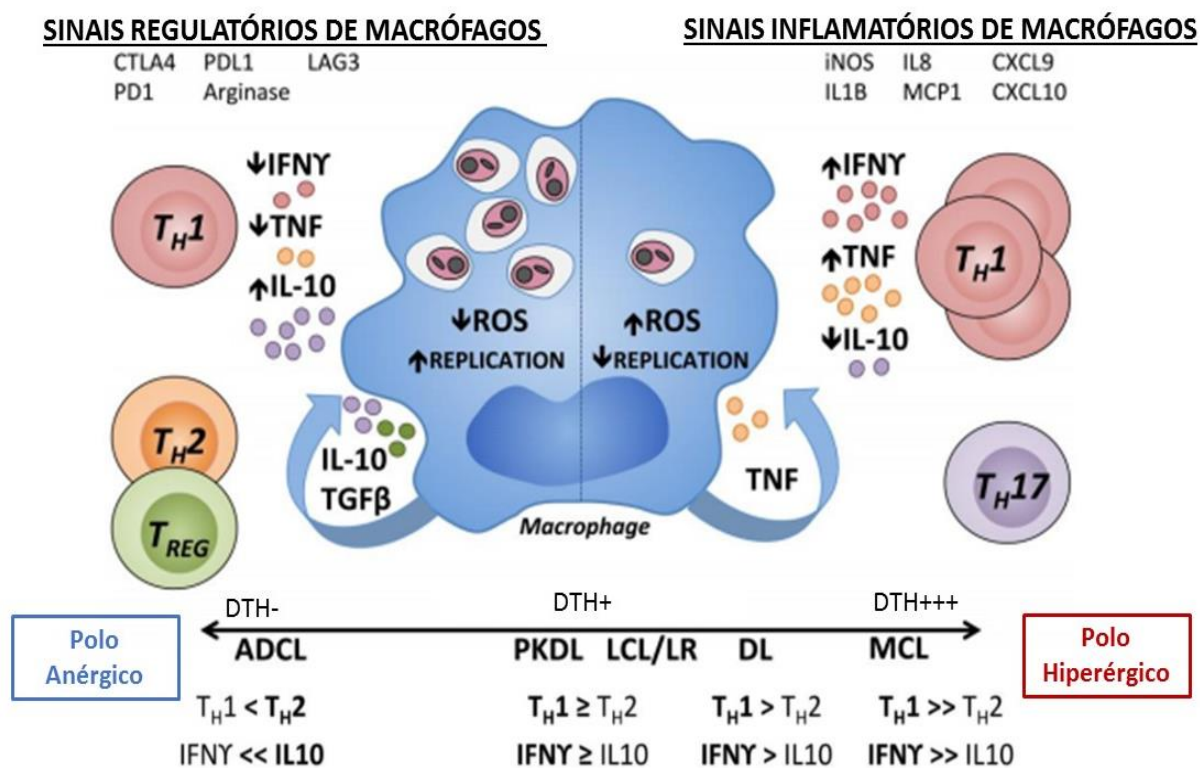


Figura 2. Espectro de formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar. ADCL: Leishmaniose cutânea difusa anérgica; PKDL: Leishmaniose dérmica pós-Kala-Azar; LCL: Leishmaniose cutânea localizada; LR: Leishmaniose recidiva; DL: Leishmaniose disseminada; MCL: leishmaniose mucocutânea; DTH: hipersensibilidade tardia tipo 1. Adaptado de Scorza, *et al.*, 2017.

Durante a resposta a uma infecção primária (figura 3A) por *Leishmania spp.* algumas células T se diferenciam em células de memória central (TMC) e células T de memória efetora (TME), permitindo o desenvolvimento de uma resposta mais rápida e com maior intensidade, induzindo resistência a uma reinfecção (PAKPOUR *et al.*, 2008). As células dendríticas presentes no sítio de infecção serão responsáveis por apresentar o antígeno no linfonodo de drenagem, induzindo que as células TCD4⁺ naive se diferenciem em TCD4⁺ efetoras (Teff) ou

de memória central (TMC). As células efetoras, por sua vez irão migrar para o local da lesão com o intuito de mitigar ou controlar a infecção. Assim como, migrarão para outros tecidos se diferenciando em células T de memória residentes (TRM), também conhecidas como células T de memória efetora (TME) responsáveis por montar respostas mais rápidas diante de infecções secundárias (figura 3B) (GLENNIE; SCOTT, 2016). No entanto, mesmo com a eliminação total dos parasitas, uma população é mantida nos linfonodos: as TMC, as quais mediante reestimulação e na presença continuada da IL-12 se diferenciam em T efetoras do tipo Th1, migram para o local da infecção e coordenam o controle da carga parasitária intracelular através da produção de IFN- γ (ZAPH *et al.*, 2004; GLENNIE; SCOTT, 2016). Em relação à sobrevivência as células TMC mostram-se dependentes do contato com a IL-7 e isso ocorre devido ao aumento na expressão do receptor para IL-7 (IL7R) (COLPITTS *et al.*, 2009). Contudo a importância da persistência do parasita ainda é controversa. Uma característica importante da infecção por *Leishmania* é a presença, em níveis muito baixos, de parasitas após a resolução da infecção. Esse fato se deve a regulação da resposta imune celular pelas células T regulatórias, contribuindo assim para a manutenção das células de memória dependentes da presença do parasita, as TME (BELKAID *et al.*, 2002; GLENNIE; SCOTT, 2016).

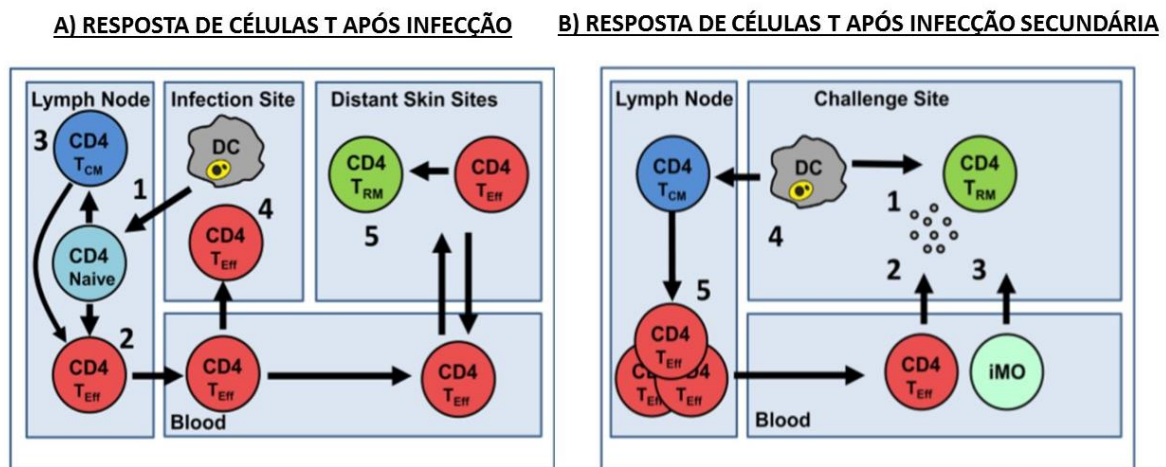


Figura 3. Resposta das células de memória imunológica após infecção por *Leishmania* spp. Adaptado de Glennie; Scott, 2016.

As células de memória foram originalmente definidas pelo fenótipo CD45RA⁻CD45RO⁺ e com base na baixa ou alta expressão de moléculas coestimulatórias (CD27 e CD28) e migração celular (CD62L e CCR7). Pacientes com LCL apresentaram correlação positiva entre a frequência das células T CD4⁺45RO⁺ e a produção de IFN- γ pelas células T CD4⁺ específicas após estimulação com SLA (ANTONELLI *et al.*, 2004). A expressão de CD62L^{low} foi associada as populações de TME com rápida produção de INF- γ após ré-estimulação, nos tecidos periféricos, enquanto a expressão CCR7 e CD62L^{high} associou-se as TMC com

produção de IL-2 e migração para os linfonodos (PAKPOUR *et al.*, 2008).

Diaz *et al.*, (2002), através de técnica imunohistoquímica avaliou a expressão de antígenos leucocitários (CD4, CD8, CLA, CD69, CD83, CD1a) e citocinas (IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1) nas lesões de 18 pacientes com Leishmaniose Cutânea Crônica (LCC) comparando com a resposta de pacientes da forma tegumentar localizada (LCL) e difusa (LCD). O número de células T CD4⁺ e CD8⁺ das lesões de pacientes com LCC foi similar à encontrada em pacientes com LCL. Pacientes com LCC apresentavam o maior número de células T CD69⁺, mas apenas um terço expressava o CLA, sugerindo que apesar de boa resposta leucocitária, não há migração suficiente destas células ativadas para a epiderme, gerando uma resposta imune aberrante. Há também nos pacientes com LCC, células positivas para IL-10, TGF- β 1, IL-4 e INF- γ , assumindo, portanto, um padrão misto. As células de Langerhans (CD1a⁺) estavam diminuídas assim como as CD83 (importantes na resposta apropriada Th1), e esta diminuição das células de Langherans causa um defeito na sinalização epidérmica, gerando um estado de dano tecidual (DIAZ *et al.*, 2002).

Na LCL a atuação equilibrada do sistema imune é importante para a contenção do parasito sem destruição tecidual, fazendo com que, embora possa continuar presente, o agente infectante não cause doença no homem (MACHADO *et al.*, 2004). É conhecido que em pacientes com LCL, no sangue periférico, a expressão de células TCD4⁺ é superior às células TCD8⁺ e que há presença de células e interleucinas envolvidas na imunidade celular: TGF- α , IFN- γ , células Langherans, macrófagos, neutrófilos, linfócitos (MACHADO *et al.*, 2004). Do ponto de vista comparativo entre os achados imunológicos da LRC versus LCL, foi observado na LRC um padrão misto na distribuição das células TCD4⁺ e TCD8⁺, presença de células TCD69⁺, porém com apenas um terço dessas expressando o CLA⁺, diminuição das células de Langherans e padrão misto também na expressão das interleucinas IL-10, TGF- β 1, IL-4, IFN- γ (misto), dados estes descritos na pele *in situ* (DIAZ *et al.*, 2002). Na LRC o percentual médio de células mononucleares imunomarcadas positivamente (CD4, CD8 e CD14) *in situ*, são proeminentes em relação as formas agudas e crônicas não recidivas da LCL. No entanto, células NK e linfócitos B (CD56 e CD19) são raramente observadas na LRC (MEYMANDI *et al.*, 2009).

Estudos escassos sobre o perfil imunológico da LRC, busca ativa de pacientes na área endêmica, difícil identificação desta forma clínica relacionada também ao treinamento da equipe multidisciplinar cuminaldo em subnotificação de casos e tratamento inapropriado tem sido barreiras que tornam os dados referentes à LRC ainda restritos e pouco publicados na literatura.

2. JUSTIFICATIVA

Considerada negligenciada, esta antropozoonose tropical ainda requer aperfeiçoamento dos instrumentos de controle. Apresenta dificuldade na resposta ao tratamento clássico com evolução clínica heterogênea, dependendo da espécie do parasito, localização geográfica, perfil imune e genético do hospedeiro e da interação entre estes fatores (BRASIL, 2017). A falta de conhecimento da população sobre as leishmanioses associada a diversas atividades laborais em áreas de floresta ou regiões próximas, também tem elevando a exposição ao vetor e configuram um fator relevante para a infecção (GITARI *et al.*, 2018). Além de alterações na resposta imune mediada por células, desencadeando lesões localizadas ou difusas (SILVA, 2011; MASOOD *et al.*, 2012; GITARI *et al.*, 2018).

Em relação à LRC é possível que a sua etiologia esteja relacionada a persistência de anticorpos em residentes de áreas endêmicas, onde a exposição continuada causaria estímulo antigênico; a espécie de *Leishmania* spp. envolvida; o diagnóstico tardio, a imunidade do hospedeiro, ou tratamento inapropriado como por exemplo a falta de adesão ou exposição prolongada a medicação, associadas a mecanismos de evasão e resistência do patógeno, possam desencadear a doença. Seria a ocorrência da LRC relacionada a um desequilíbrio na produção de citocinas, quimiocinas ou a frequência de células de memória?

Pesquisadores do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – BA vem atuando no programa de controle da LT do Centro de Referência em Doenças Endêmicas do Vale de Jiquiriçá – CERDEJJC, onde foram cadastrados 1.491 pacientes de 2001 até fevereiro de 2013, procedentes dos 11 municípios da região do Vale de Jiquiriçá, com diagnóstico confirmado de LT, cujo agente etiológico, tratava-se da *L. braziliensis*. Destes, 65 pacientes evoluíram para LRC, caracterizando uma das maiores, senão a maior, casuística do Brasil. Onde foram desenvolvidos estudos para avaliar aspectos clínicos e evolutivos da LRC (SILVA, 2011) e caracterizar os aspectos clínico-imunológicos e terapêuticos da LRC (COSTA, 2014). E tento em vista que os estudos imunopatológicos publicados até então sobre LRC tratam-se de análises *in situ*, e estudos de caso com grupo amostral reduzido em função da raridade desta patologia, com predomínio em crianças na Ásia e Oriente Médio tornando-se esta uma oportunidade inédita para rastreamento de possíveis biomarcadores da LRC no plasma e sobrenadante com o intuito de nortear o tratamento e auxiliar na identificação precoce da patologia em população com perfil epidemiológico diferente dos dados já publicados.

3. HIPÓTESE

A hipótese deste estudo é que existe diferença entre o perfil de resposta imune em indivíduos com LRC em relação à LCL na fase ativa e curados da doença.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar a produção de citocinas, quimiocinas e o fenótipo de células T na LRC e LCL.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Dosar as citocinas inflamatórias, Th1/Th2/IL-17 e quimiocinas no plasma e sobrenadante de paciente com LRC e LCL;
- Avaliar a expressão de marcadores de memória, ativação e migração celular, e os subtipos de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória imunológica.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto intitulado “Estudo das formas de difícil tratamento da Leishmaniose Tegumentar: Leishmaniose Mucosa e da Leishmaniose Recidiva Cútis”, tendo como pesquisadora responsável Aldina Maria Prado Barral, submetido em 26 de novembro do ano de 2013, aprovado sob o CAAE: 18113113.2.0000.0040.

A pesquisa obedeceu aos princípios da Resolução N.º 466/12 que se refere aos aspectos sobre pesquisa envolvendo seres humanos abordando os quatro referenciais básicos da bioética: autonomia, não maleficência, beneficência e justiça, preservando em caráter confidencial todas as informações coletadas e analisadas no estudo. Os resultados serão utilizados pela autora exclusivamente no âmbito acadêmico ou institucional.

5.2 ÁREA DE ESTUDO

O estudo foi desenvolvido na região do Vale do Jiquiriçá, no município de Jiquiriçá, latitude: 13°15'24"S e longitude: 39° 34' 20" W, localizado na região Sudoeste do estado da Bahia, situado a 258 km da capital Salvador e limitado pelos municípios de Laje, Mutuípe, Teolândia e Ubaíra. Caracterizada por ser região endêmica de LT produzida por *L. braziliensis*. As amostras são provenientes do Centro de Referência em Doenças Endêmicas do Vale de Jiquiriçá – CERDEJJC e foram processadas no Laboratório de Inflamação e Biomarcadores– Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz- FIOCRUZ, na Bahia.

5.3 TIPO DE ESTUDO E ESTRATÉGIA DE ANÁLISE

Trata-se de um estudo descritivo, retrospectivo, onde são caracterizadas variáveis de determinada população (GIL, 2008; ARAGÃO, 2011), utilizando o método experimental (PROVDANOV; FREITAS, 2013), análise quantitativa e transversal. Iniciado a partir da obtenção de células do sangue periférico, do plasma e sobrenadante para estímulo *in vitro* e *ex vivo* por meio dos Kits CBA de dosagem de citocinas e quimiocinas (BD BIOSCIENCES, 2011), e imunofenotipagem de linfócitos através de marcação *ex vivo*, prosseguindo com a aquisição das amostras em citometria de fluxo e análise dos dados (figura 4).

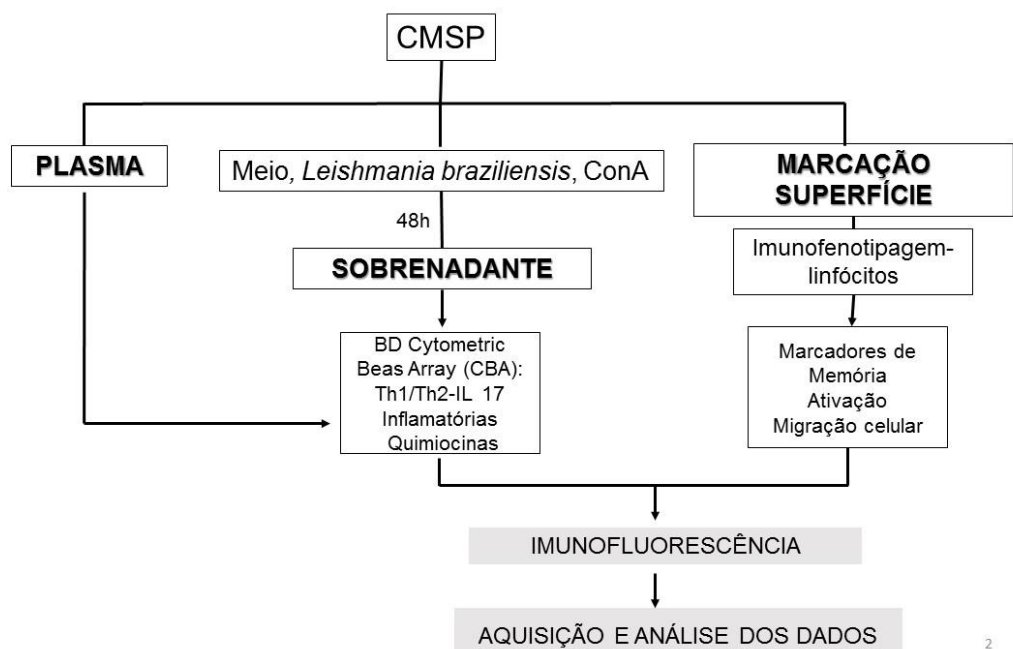


Figura 4. Representação do desenho experimental do estudo.

5.4 GRUPO AMOSTRAL

O grupo amostral foi constituído por 36 pacientes com LRC e 36 com LCL, totalizando 72 indivíduos, além de 10 indivíduos controles saudáveis, provenientes da área endêmica com teste de Montenegro negativo no período de 2010-2013. Os pacientes selecionados com LCL na fase ativa apresentavam lesão inicial típica (máximo de 60 dias do início da lesão, segundo relato do paciente), com exame anatomopatológico, teste cutâneo (Intradermorreação de Montenegro) e sorologia anti *Leishmania* positivos e haviam iniciado o tratamento. Os pacientes com LRC incluídos no estudo foram aqueles que apresentavam lesões eritematosas localizadas ao redor da cicatriz de uma úlcera produzida anteriormente por *L. braziliensis* e teste cutâneo positivo que estivessem de acordo com os critérios de Berlim (1940): pápulas, ou pequenas placas amareladas, ou violáceas, brilhantes, pápulas confluentes em face e os critérios de Silva (2011): tubérculos ou placas confluentes, presença de lesões verrucosas ou vegetantes e lesões eritematosas localizadas ao redor da cicatriz de uma úlcera anterior produzida por *Leishmania* ssp no segmento superior. Foram excluídos pacientes que tiveram mudança de diagnóstico ao longo do tempo de acompanhamento ou não compareceram para as revisões.

Os pacientes curados por LCL e LRC selecionados foram aqueles que apresentaram completa cicatrização das lesões e ausência total de sinais de atividade (edema, eritema e infiltração), registradas em até 3 meses após o término do tratamento e controles. Foi realizada IDRMs pós-cura das lesões, sendo que 78% dos pacientes com LRC foram classificados com endureção >10 mm (forte positivo). Entretanto, 74% os pacientes com LCL, 74% foram classificados com endureção cutânea entre 5 a 10 mm (positivos), conforme protocolo executado pelo médico patologista Dr. Jackson Maurício Costa, responsável pela assistência aos pacientes do centro.

Todos os voluntários para o grupo de controles saudáveis (n=10), residentes da área endêmica, com média de idade 32,6 anos, desvio padrão de 8,2, com idade mínima de 24 anos e máxima de 52 anos, quanto ao sexo foram seis do sexo feminino (60%) e quatro do sexo masculino (40%), sem história prévia de infecção por *Leishmania*, confirmado pela sorologia anti-*Leishmania* negativa. Todos os voluntários foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo e os riscos inerentes aos procedimentos, e todos assinaram o termo de consentimento.

Os esquemas terapêuticos definidos para nosso estudo foram: 1ª escolha, com a associação das drogas Antimoniato-N-metilgucamina (405mg/Sb5+) + Azitromicina (500mg) + Pentoxifilina (400mg), sendo que nos casos de falha terapêutica instituiu-se o uso de Anfotericina B como terapia de 2ª escolha. As melhores respostas foram obtidas com a

associação Glucantime®- 15mg/Sb+5 /kg/dia durante 20 dias (3 séries) + Pentoxifilina 800mg/dia durante 20 dias (3 series) onde seis(17%) dos pacientes que foram submetidos a este esquema obtiveram tempo médio de cura de 4,1 meses; Glucantime® - 15mg/Sb+5 /kg/dia durante 20 dias (até 4 séries) + Azitromicina 500mg/dia durante 10 dias (até 3 séries) onde treze (34%) dos pacientes que foram submetidos a este obtiveram tempo médio de cura de 5,5 meses e Glucantime® 15mg/Sb+5 /kg/dia durante 20 dias (3 séries) + Azitromicina 500mg/dia durante 10 dias (3 séries) + Pentoxifilina 800mg/dia durante 20 dias (até 3 séries) onde seis (17%) dos pacientes que foram submetidos a este esquema obtiveram tempo médio de cura de 5,1 meses conforme Costa (2014).

Posteriormente, procedeu-se à classificação dos grupos quanto aos estágios de infecção ativo (lesão ativa após início do tratamento) e curado (cicatrização completa das lesões), sexo e faixa etária (Tabela 1).

Tabela 1. Estratificação dos pacientes por estágio da infecção, sexo e faixa etária na LRC e LCL.

	LRC		LCL	
	n	%	n	%
Estágio de infecção				
Ativo	7	43,7	9	56,3
Curado	29	51,7	27	48,3
Subtotal	36	100	36	100
Sexo				
Feminino	20	55,5	14	39,0
Masculino	16	44,5	22	61,0
Subtotal	36	100	36	100
Faixa etária				
0-10	0	0	1	2,7
11-20	13	36	6	16,6
21-30	7	19,4	2	5,5
31-40	7	19,4	4	11,1
41-50	4	11,1	8	22,2
>50	5	14	7	19,4

LRC= Leishmaniose Recidiva Cútitis, LCL= Leishmaniose Cutânea Localizada

5.5 OBTENÇÃO DO PLASMA E DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (CMSP) PARA ESTIMULAÇÃO *IN VITRO*

Foram coletados 20 ml de sangue periférico de cada paciente e dos controles, utilizando tubos de ensaio de 10 mL e contendo anticoagulante (Heparina sódica, Liquevine® 5000 UI/mL – Roche Produtos Químicos e Farmacêuticos AS, RJ, Brasil). A diluição do sangue foi realizada de 1:1 com salina estéril, e posteriormente esta composição foi cuidadosamente depositada sobre o gradiente de Ficoll- histopaque (Sigma) na proporção 1:2 com sangue. Centrifugou-se a 1500 rpm (cetrífuga 5810R, Eppendorf Brasil) durante 30 minutos a temperatura ambiente. O plasma foi coletado, distribuído em 3 alíquotas de 1 ml e armazenados na temperatura de -20°C. A camada de Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) foi coletada e lavada 3 vezes por centrifugação a 1500 rpm, 4°C por 10 minutos, com solução salina estéril para retirada do Ficoll residual. A concentração de células foi ajustada para 3×10^6 /mL em meio RPMI 1640 (Invitrogen) suplementado com 10% de soro AB RH+ inativado (BD PharMaingen), L- glutamina 2mM, penicilina 100U/mL, e estreptomicina 100µL/mL (Sigma). As células foram distribuídas em placas de 24 poços e submetidas a 3 condições: meio, *L. braziliensis* (proporção de 1:5) e ConA. Após incubação (37°C, 5% CO₂). Após incubação de 48 horas o sobrenadante foi coletado, distribuído em tubos de microcentrífuga (Eppendorf) armazenados em temperatura de -20°C.

5.6 IMUNOFLUORESCÊNCIA PARA ANÁLISE DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS E *IN VITRO*.

As citocinas e quimiocinas foram dosadas no sangue periférico e sobrenadante dos pacientes e controles através do kit Cytometric Bead Array - CBA (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). O kit possui beads de captura específica (FL3) para cada citocina de interesse, que são esferas ligadas a um anticorpo específico com intensidades de fluorescência distintas, e um anticorpo de detecção conjugado a ficoeritrina (PE - FL2). Os anticorpos emitem um sinal fluorescente proporcional a quantidade de citocinas capturadas. Uma curva padrão (*standart*) para cada citocina é utilizada como referência de concentração conhecida, e abrange um conjunto definido de concentrações de 20 a 5.000 pg/mL. Na construção da curva padrão (figura 5A) faz-se uma diluição seriada, para isso foi utilizado um tubo falcon de 15mL (Top *Standart*), para o qual foram transferidas as esferas do *standart* (citocinas liofilizadas) e acrescentados 2 mL do *Assay Diluent*, posteriormente incubados por

15 minutos em temperatura ambiente. Foram identificados oito tubos de microcentrífuga (Eppendorf) (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:264), nos quais foram acrescentados 300 μ L do *Assay* diluente para a realização da diluição seriada. Após a diluição seriada, foram acrescentados 25 μ L em cada poço da placa (96 poços, fundo U) de aquisição.

As amostras foram distribuídas nos poços, seguintes aos da curva padrão, no volume de 25 μ L. Para a realização da dosagem, as amostras e os padrões foram incubados com as beads e o PE por três horas. Para a distribuição das *beads* foi feito um mix, constituído por uma alíquota de 5 μ L de cada bead de captura para cada poço de ensaio a ser analisado, incluído os padrões. (ex. 5 μ L da Bead Capture IL-8 \times 20 poços = 100 μ L). Seguindo a distribuição do mix de beads foram adicionados 25 μ L do PE (anticorpo de detecção) a cada poço e incubados por três horas a 4°C e protegido da luz. Após a incubação foi feita a lavagem com 200 μ L de *Wash Buffer* (centrifugação refrigerada, 1500 rpm, 10min), em seguida o sobrenadante foi descartado e as amostras e padrões foram ressuspensos com 200 μ L do o tampão de lavagem, para posterior aquisição das amostras (figura 5B).

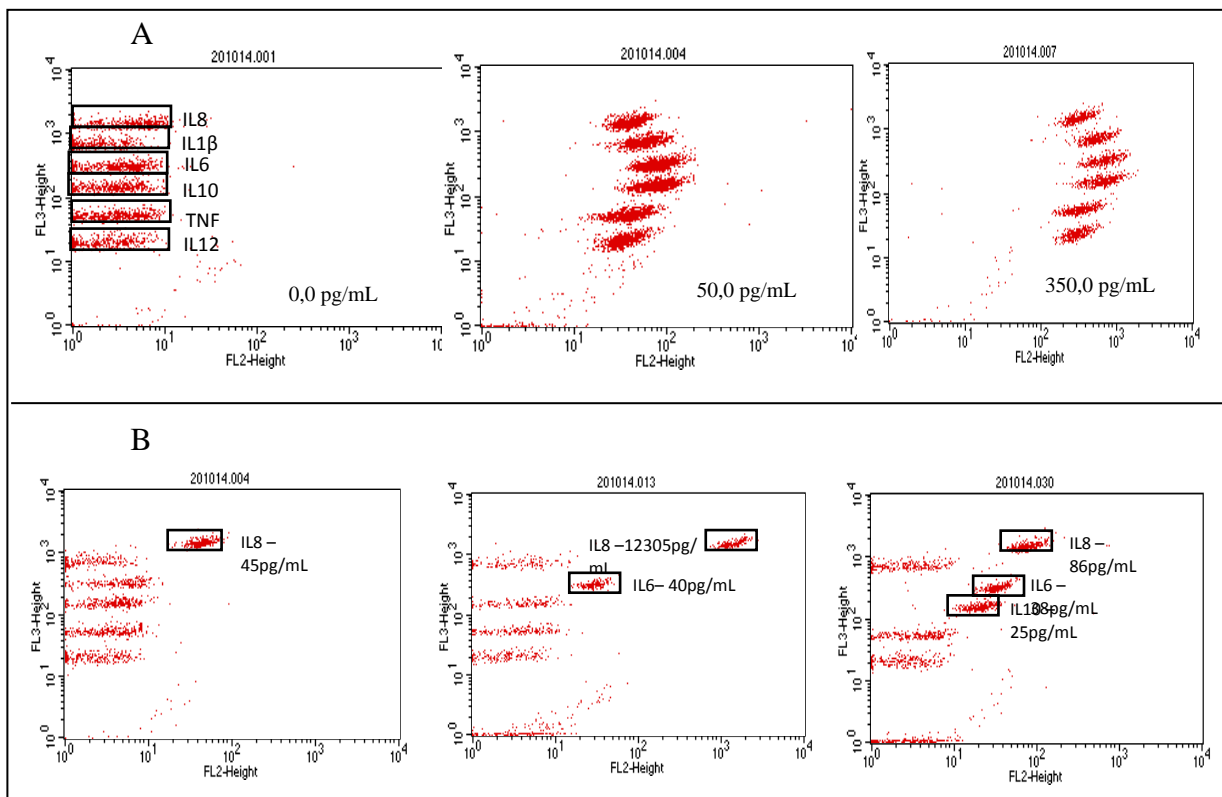


Figura 5. Marcação de citocinas plasmáticas. A – Aquisição dos padrões em concentrações determinadas previamente. B- Aquisição das amostras em citometria de fluxo.

5.7 OBTENÇÃO DOS LINFÓCITOS DO SANGUE TOTAL E IMUNOFENOTIPAGEM *EX VIVO*.

Aproximadamente 20mL de sangue foram coletados de cada paciente, na fase ativa da infecção, após o início do tratamento através de punção venosa utilizando tubos de ensaio de 10mL estéreis, com vácuo e contendo anticoagulante (heparina sódica, Liquemine® 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). Na realização das marcações, foram utilizados anticorpos monoclonais, conjugados com fluorocromo de ligação específica para antígenos de superfície, para caracterização celular (CD4 ou CD8). Para o painel foi inserida a marcação para células de memória - CD45RO e CCR7 (naive, memória periférica, memória central e células efectoras); moléculas de ativação em células de memória- CD45RO, CD25, CD69 e HLA-DR e moléculas de adesão CD62L^{low} (memória) e CD62L^{high} (naive). Após adicionar os anticorpos, as amostras foram incubadas por 30 minutos, protegidas 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 na proporção de 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) e logo foram adquiridos os dados em citometria utilizando o painel de imunofenotipagem com isotipos (marcação inespecífica), marcadores de ativação (CD25, CD69 e HLA-DR), migração (CD62^{low} e CD62^{high}) e memória (CCR7) em células CD4⁺ e CD8⁺ (figura 6).

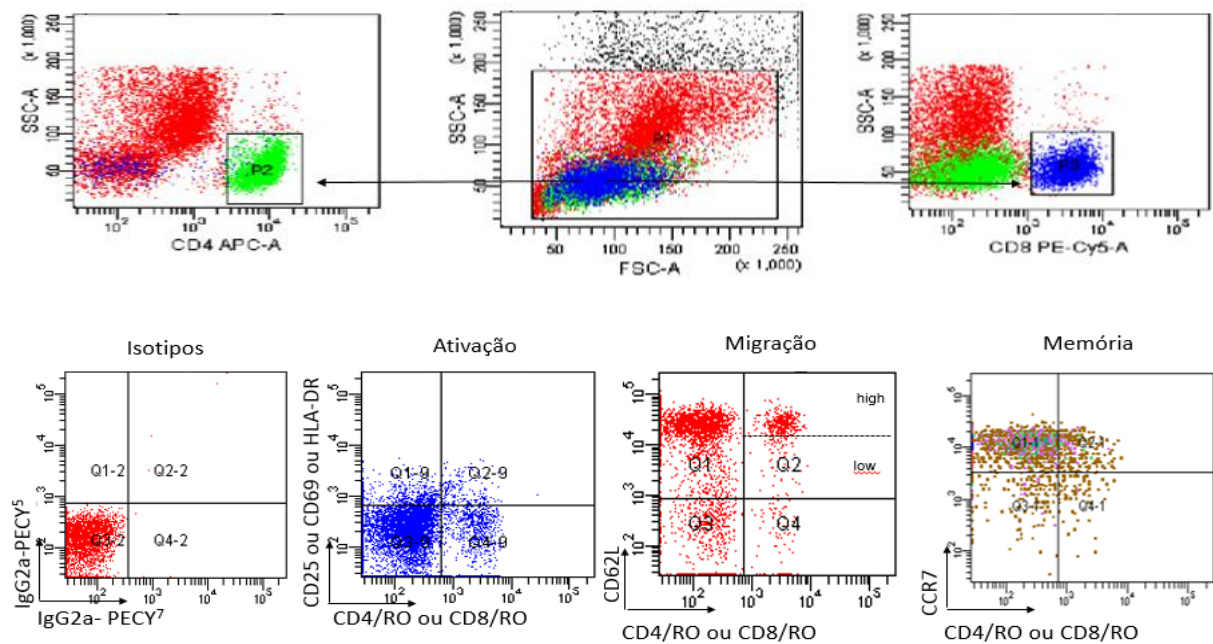


Figura 6. Estratégia de gates para marcação extracelular de células de memória em citometria de fluxo, utilizando painel de imunofenotipagem com isotipos (marcação inespecífica), marcadores de ativação (CD25, CD69 e HLA-DR), migração (CD62^{low} e CD62^{high}) e memória (CCR7) em células CD4⁺ e CD8⁺.

5.8 AQUISIÇÃO E ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

As amostras foram adquiridas no FACS LSRFortessa™ (BD), utilizando o software Diva (BD) (figuras 5 e 6), posteriormente os resultados disponibilizados foram convertidos através do software Flowjo em MFI (Intensidade Média de Fluorescência) de cada amostra para as citocinas dosadas. Os valores em MFI foram convertidos em pg/mL no Graph Pad Prism 7.01 (GraphPad, San Diego, CA), assim como a comparação não pareada entre os grupos (pacientes e controles), utilizando o teste estatístico de Kruskal-Wallis por tratar-se de uma análise não paramétrica. Foram considerados estatisticamente significantes os resultados que obtiveram um $p < 0.05$.

6. RESULTADOS

Os dados apresentados a seguir foram dispostos quanto aos kits “inflamatório” (IL-8, IL-1 β , IL-10 e IL-12p40), Th1/Th2/IL-17 (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ , e IL-17) e “quimiocinas” (rantes, MIG, MCP-1 e IP-10) dosadas no plasma (6.1) comparando as formas clínicas isoladas (fase ativa versus curados versus controles) e entre si (LRC versus LCL). Foram utilizados os mesmos kits *in vitro* (6.2), comparando as formas clínicas isoladas (fase ativa versus curados) e entre si (LRC versus LCL). Dados não significativos estatisticamente não foram mostrados. Posteriormente, são apresentados os dados da marcação extracelular de células de memória imunológica (6.3) na fase ativa de LRC e LCL, comparando as formas clínicas entre si. Optou-se por utilizar as dosagens de IL-6 do kit “Th1/Th2/IL-17” e de IL-8 do kit “inflamatório” por tratar-se de desvio padrão menor entre as amostras com dados mais homogêneos.

6.1 NÍVEL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS PLASMÁTICAS EM PACIENTES COM LRC (FORMA CLÍNICA ATIVA, VERSUS CURADOS E VERSUS OS CONTROLES SADIOS) E LCL (FORMA CLÍNICA ATIVA, VERSUS CURADOS E VERSUS OS CONTROLES SADIOS).

I- Entre as citocinas do kit “inflamatório” (IL-8, IL-1 β , IL-10 e IL-12p40) todas em LRC (figura 7A) e (IL-1 β , IL-10 e L-12p40) em LCL (figura 7B) foram estatisticamente significantes entre os indivíduos de lesão ativa ou curados em relação aos controles sadios, quando comparadas as formas clínicas isoladas.

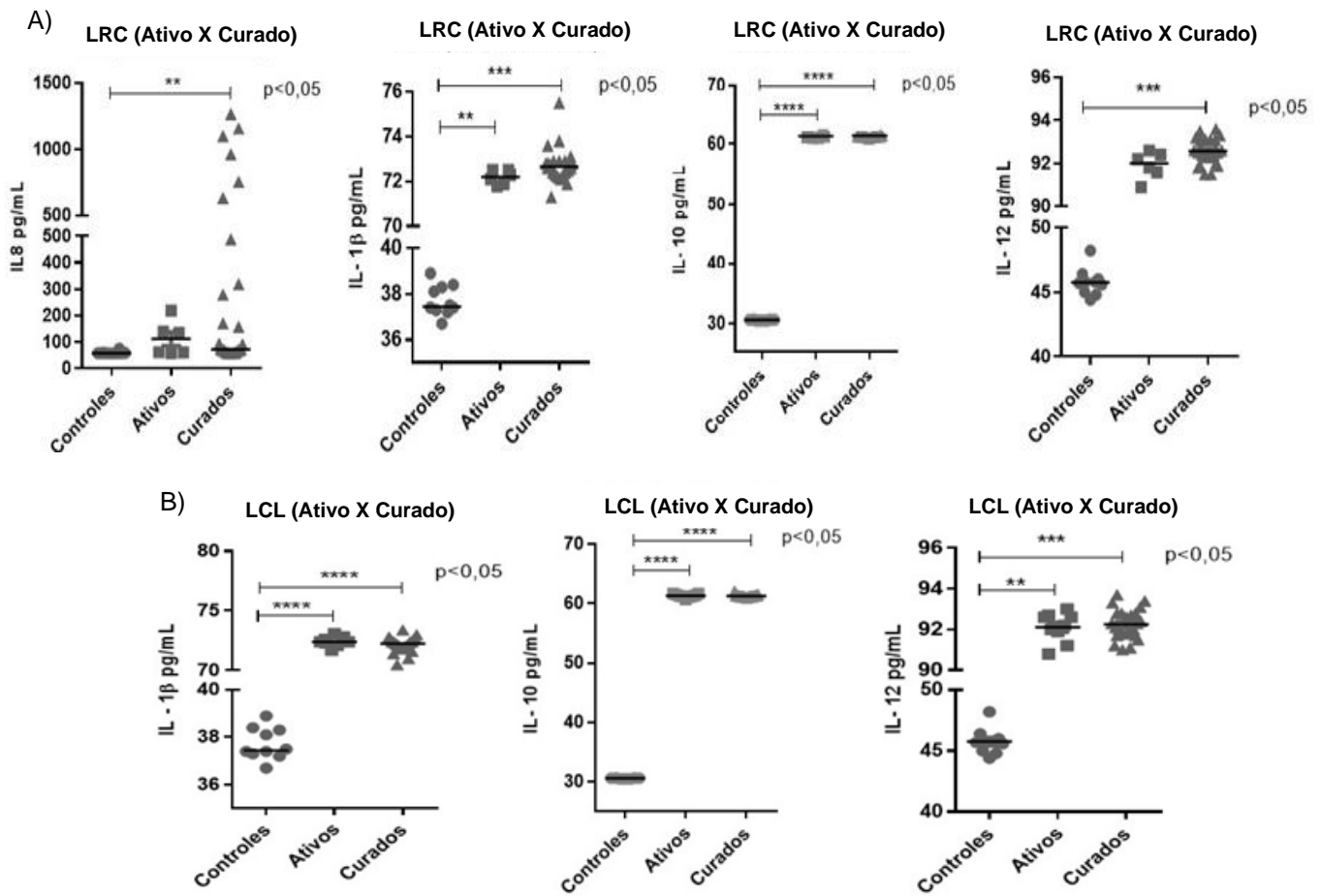
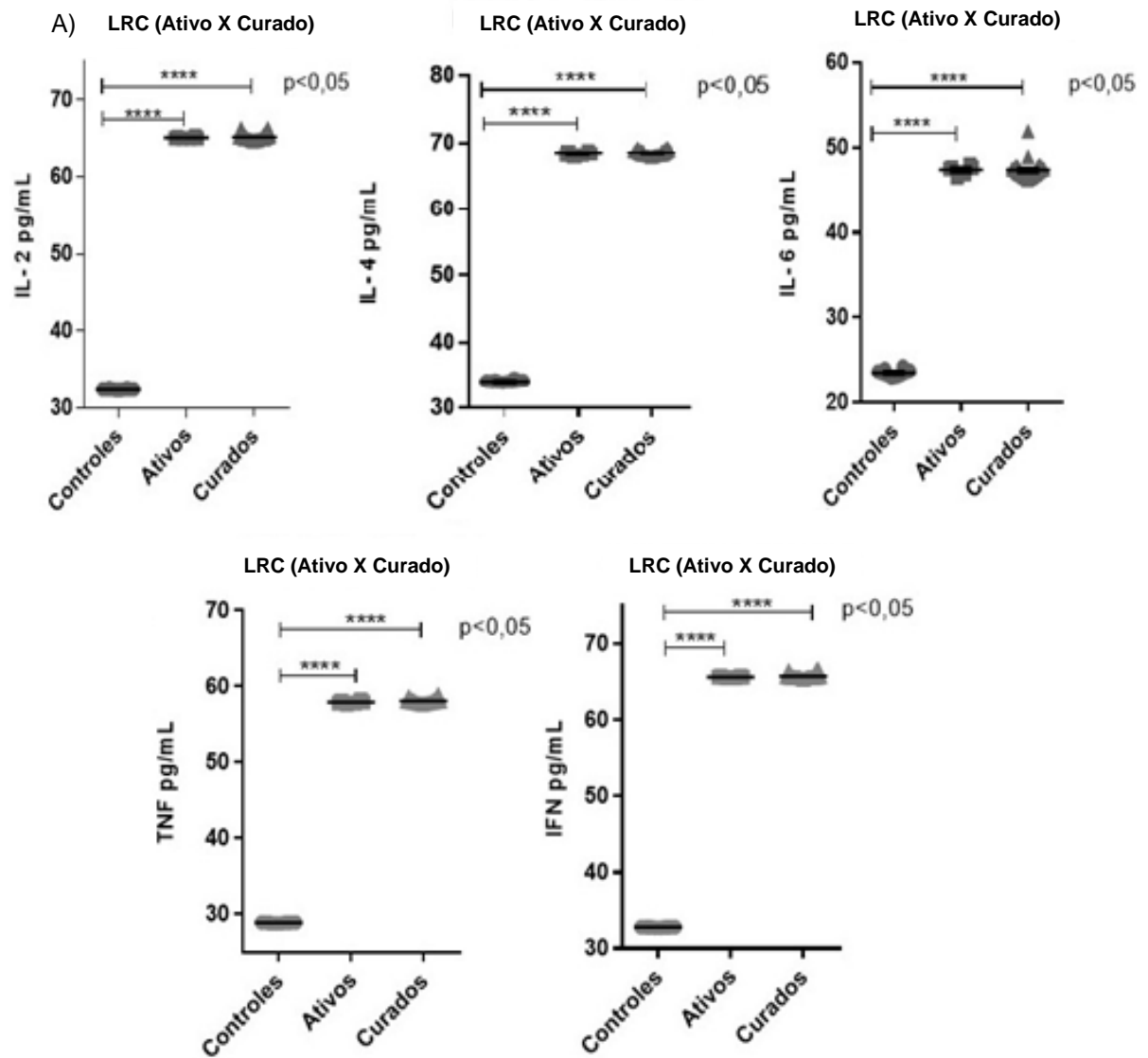


Figura 7. Perfil de citocinas plasmáticas do kit “inflamatório” (IL-8, IL-1 β , IL-10 e IL-12p40) em LRC (A) e (IL-1 β , IL-10 e L-12p40) em LCL (B) em lesão ativa ou curados. Em LCL controles (n=10), ativos (n=9) e curados (n=27). Em LRC controles (n=10), ativos (n=7) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

II- Entre as citocinas do kit “TH1/TH2/IL-17” (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ , e IL-17) somente IL-17 não foi estatisticamente significativa tanto em LRC (figura 8A) quanto em LCL (figura 8B) entre os indivíduos de lesão ativa ou curados em relação aos controles saudáveis, quando comparadas as formas clínicas isoladas.



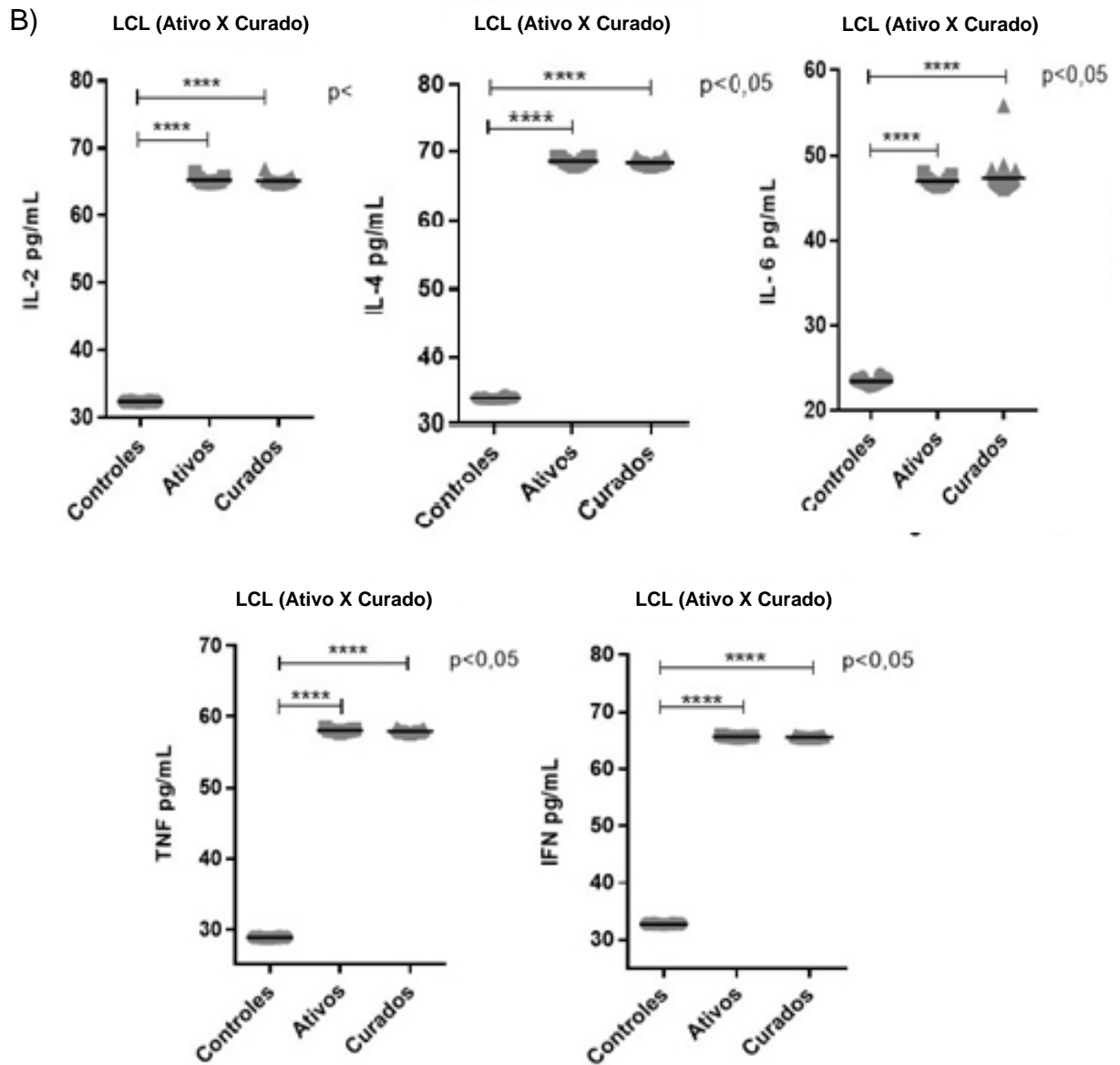


Figura 8. Perfil de citocinas kit “TH1/TH2/IL-17” (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN- γ , e IL-17) em lesão ativa ou curados em LRC (A) e LCL (B). Em LCL controles (n=10), ativos (n=9) e curados (n=27). Em LRC controles (n=10), ativos (n=7) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis ($p<0.05$).

III- Entre as quimiocinas do kit “quimiocinas” (rantes, MIG, MCP-1 e IP-10) somente IP-10 foi estatisticamente significativa em LRC (figura 9A) (curados versus forma ativos) enquanto em LCL (figura 9B) somente IP-10 (forma ativa versus controles e forma ativa versus curados) e MIG (forma ativa versus curados) foram estatisticamente significantes, quando comparadas as formas clínicas isoladas.

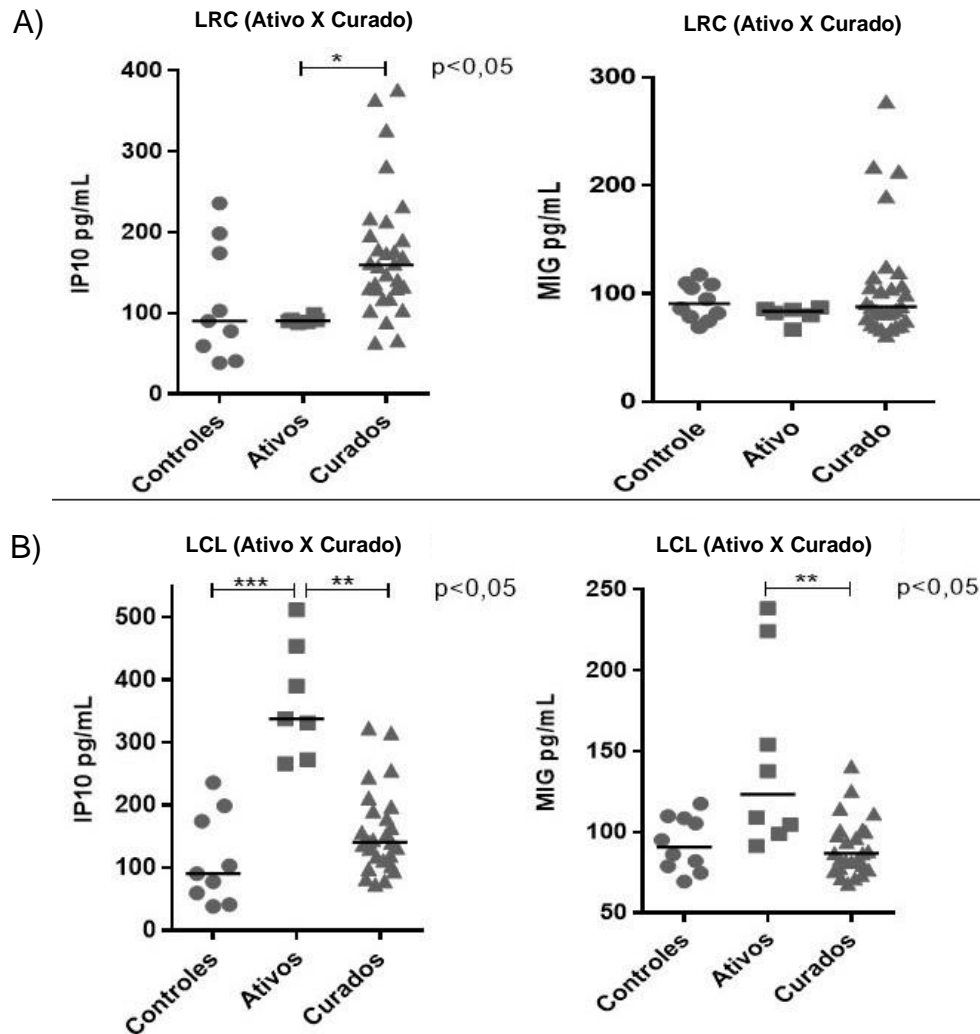


Figura 9. Perfil de quimiocinas (IP-10 e MIG) no plasma de pacientes com LRC (A) e LCL (B) em lesão ativa ou curados. Em LCL controles (n=10), ativos (n=9) e curados (n=27). Em LRC controles (n=10), ativos (n=6) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

IV- No kit “inflamatório” quando comparados pacientes com LRC (forma clínica ativa versus curados) versus LCL (forma clínica ativa versus curados), entre os curados por LRC as citocinas IL-1 β (figura 10A) e IL-8 (figura 10B) apresentaram-se mais elevadas do que entre os curados por LCL. As demais citocinas (IL-10 e IL-12p40) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando foram analisadas as formas clínicas entre si.

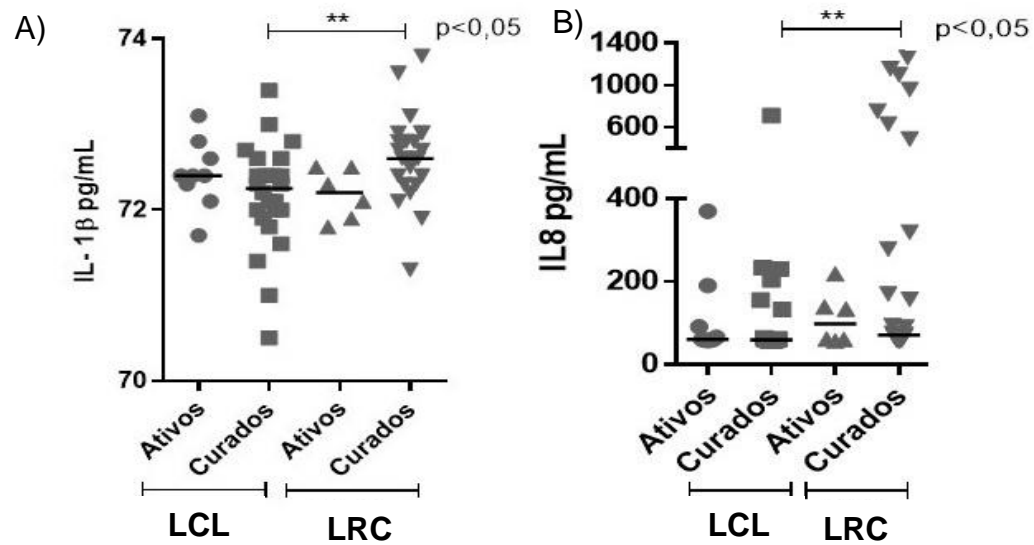


Figura 10. Perfil de IL- 1 β (A) e IL-8 (B) em plasma de pacientes com lesão ativa ou curados. Em LCL controles (n=10), ativos (n=9) e curados (n=27). LRC controles (n=10), ativos (n=7) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

V- No kit “Th1/Th2/IL-17” todas as citocinas (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN e IL-17) não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando foram analisadas as formas clínicas entre si.

VI- Na dosagem do kit “quimiocinas” plasmáticas em pacientes com LCL (forma clínica ativa versus curados) versus LRC (forma clínica ativa versus curados). Foi observado que as quimiocinas rantes, MIG, MCP-1 não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas, quando comparadas entre si. Já IP-10 e MIG apresentaram-se diminuídas em LRC quando comparadas a LCL entre os indivíduos em fase de lesão ativa (figura 11).

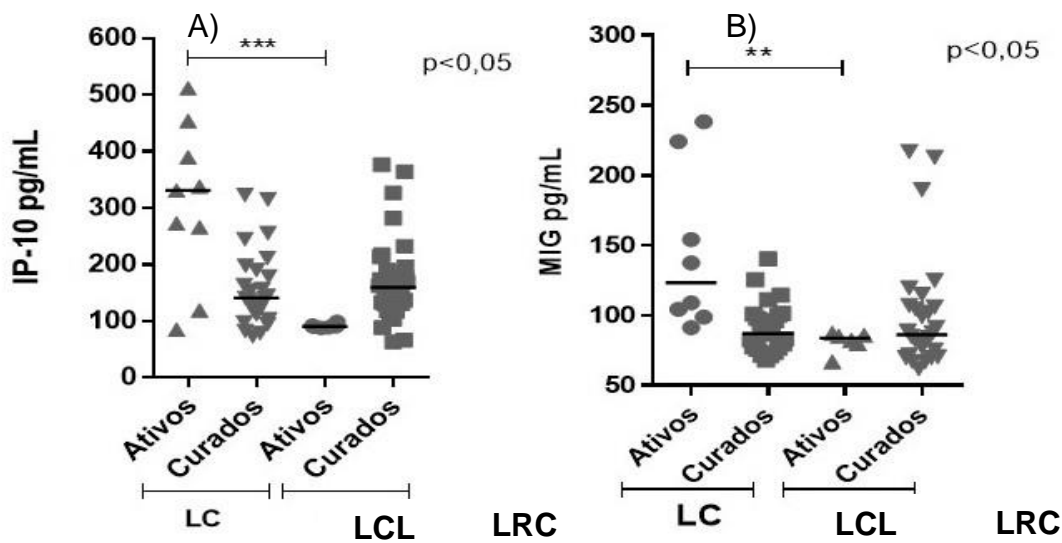


Figura 11. Perfil de IP-10 (A) e MIG (B) em plasma de pacientes com com lesão ativa ou curados. Em LCL controles (n=10), ativos (n=9) e curados (n=27). LRC controles (n=10), ativos (n=7) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis ($p < 0,05$).

6.2 NÍVEL DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS *IN VITRO* EM PACIENTES COM LCL (FORMA CLÍNICA ATIVA VERSUS CURADOS) E LRC (FORMA CLÍNICA ATIVA VERSUS CURADOS)

I- No kit “inflamatório”, entre as citocinas (IL-1 β , IL8, IL-10, IL-12) dosadas *in vitro* no sobrenadante de cultura de células de pacientes com LRC e LCL, foi evidenciada significância estatística somente em IL-8 quando comparados Meio versus *Leishmania braziliensis* em ativos e curados (figura 12), quando foram analisadas as formas clínicas entre si.

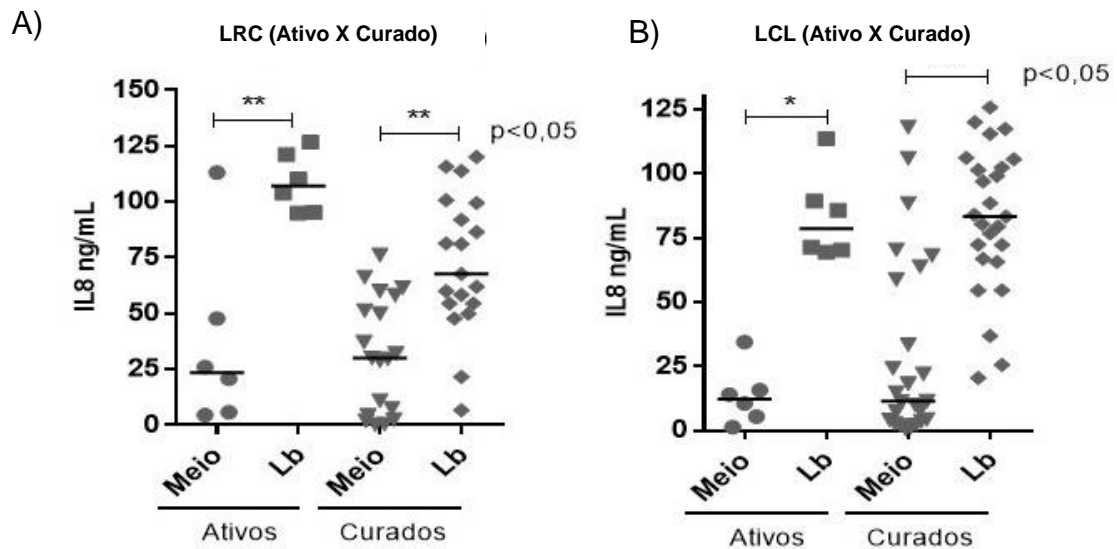


Figura 12. Perfil de citocinas (IL-8) em sobrenadante de cultura de células de pacientes com com lesão ativa ou curados por LRC (A) e LCL (B). Em LCL ativos (n=9) e curados (n=27). LRC ativos (n=7) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis ($p<0.05$).

II- No kit “Th1/Th2/IL-17” (IL-2, IL-4, IL-6, TNF, IFN e IL-17) nenhuma citocinas apresentou diferença estatisticamente significativa entre as formas clínicas quando dosadas *in vitro*. Dados não mostrados.

III- Quanto ao kit de “quimiocinas” no sobrenadante de cultura de células de pacientes com LRC (figura 13A) e LCL (figura 13B), as dosagens evidenciaram significância estatística quando avaliadas a secreção de IP-10 e MIG que se apresentaram maior entre os curados nas células estimuladas com *Leishmania braziliensis* quando comparamos com Meio nas duas formas clínicas. E MCP-1 quando comparados Meio versus *Leishmania braziliensis* em ativos e curados. Não sendo identificados dados estatisticamente significantes para MCP-1 e rantes *in vitro*.

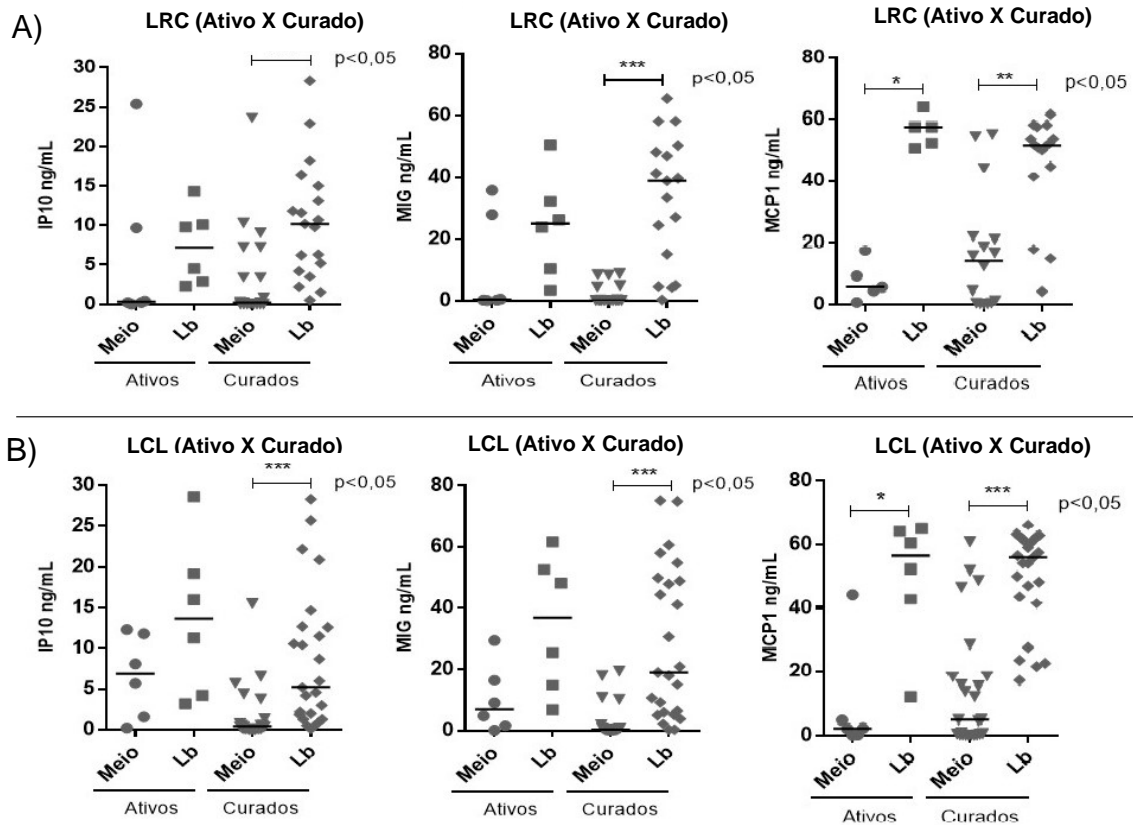


Figura 13. Perfil de quimiocinas (IP-10, MIG e MCP-1) em sobrenadante de cultura de células de pacientes com lesão ativa ou curados por LRC (A) e LCL (B). Em LCL ativos (n=9) e curados (n=27). LRC ativos (n=7) e curados (n=29). Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad utilizando o teste estatístico não pareado, não paramétrico de Kruskal Wallis (p<0.05).

IV- Em relação às dosagens dos kits “inflamatório”, “Th1/Th2/ IL-17” e “quimiocinas” *in vitro* em pacientes com LRC (forma clínica ativa versus curados) versus LCLL (forma clínica ativa versus curados), quando comparadas as formas clínicas entre si. Não foram identificados dados estatisticamente significantes para essas dosagens. Dados não mostrados. Porém todas deram estatisticamente significante quando comparados com o controle positivo ConA versus meio e versus *Leishmania braziliensis*.

6.3 MARCAÇÃO EXTRACELULAR DE CÉLULAS DE MEMÓRIA IMUNOLÓGICA NA FASE ATIVA DE LRC E LCL.

Para a marcação de células de memória foram utilizadas amostras de pacientes na fase ativa decorrente dos resultados de quimiocinas no plasma e *in vitro*, onde foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes quando comparadas as formas clínicas entre si.

I- Em relação a expressão de CD45RO⁺ em linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória imunológica (figura 14) tanto em LRC quanto em LCL não foi detectada diferença estatística significativa entre os grupos.

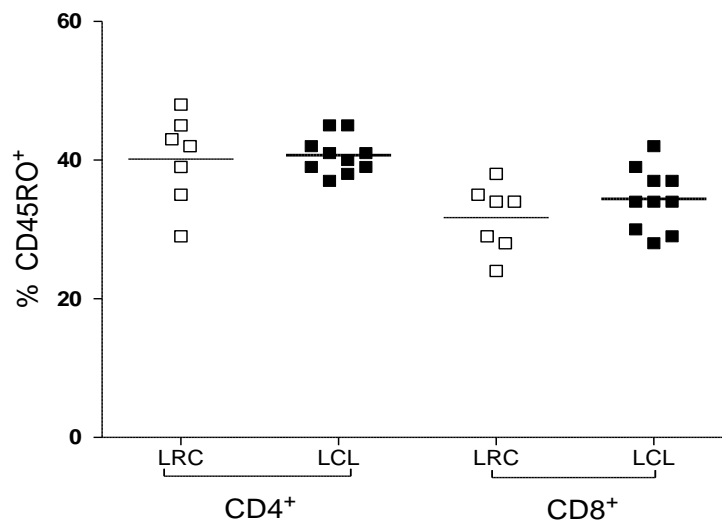


Figura 14. Expressão de CD45RO em células CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com LRC (n=7) e em LCL (n=10) com lesão ativa. Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad. Teste estatístico não pareado e não paramétrico de Kruskal Wallis. (p<0.05).

II- Em relação a expressão de marcadores de ativação celular (CD25, CD69 e HLA-DR) em linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) de memória imunológica houve menor ativação celular nas amostras de pacientes com LRC, evidenciadas através da menor expressão de CD25 (ativação inicial) e HLA-DR (ativação intermediária) em células CD4⁺ (figura 15A) e CD8⁺ (figura 15B) em relação às células dos pacientes com LCL.

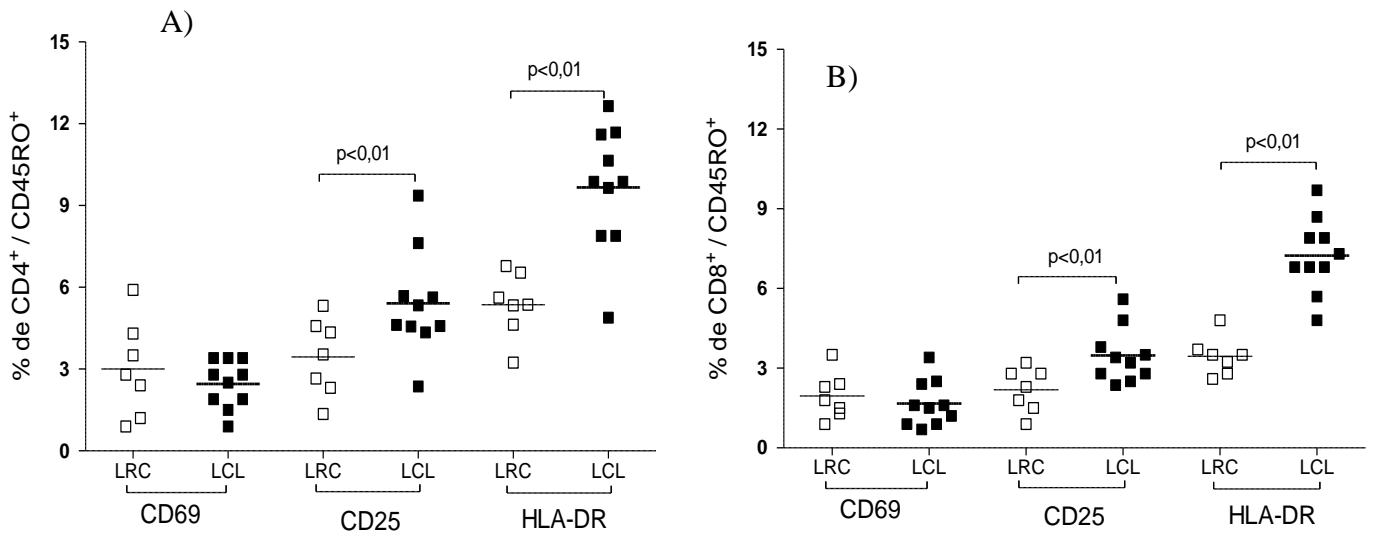


Figura 15. Expressão de CD69 (ativação inicial), CD25 (ativação intermediária) e HLA-DR (ativação tardia) e CD45RO em células CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) do sangue periférico de pacientes com LRC (n=7) e em LCL (n=10) com lesão ativa. Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad. Teste estatístico não pareado e não paramétrico de Kruskal Wallis. (p<0,05).

III- Em relação a expressão de CD62L low (memória) e CD62 high (naive) em linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), os pacientes com LRC apresentaram menor quantidade de células CD62L^{low} do que pacientes com LCL e uma quantidade de células CD62L^{high} maior do que em pacientes com LCL em CD4⁺ (figura 16A) e CD8⁺ (figura 16B).

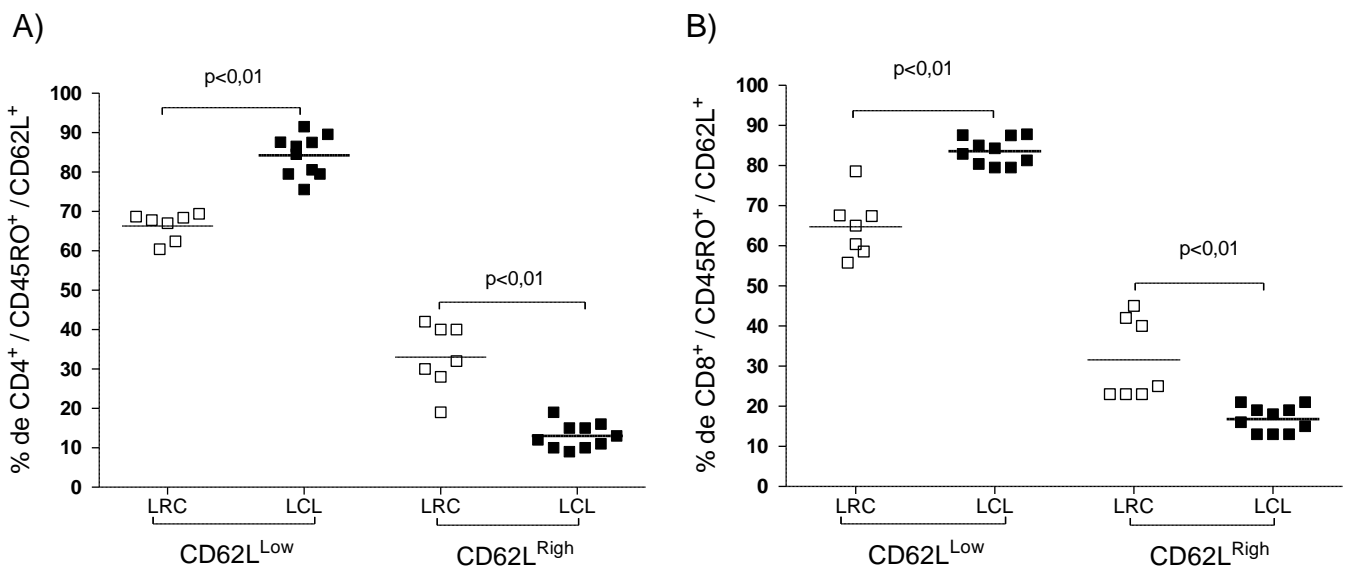


Figura 16. Expressão de CD62L e CD45RO em células $CD4^+$ e $CD8^+$ do sangue periférico de pacientes com LRC (n=7) e em LCL (n=10) com lesão ativa. Dados analisados pelo FlowJo e GraphPad. Teste estatístico não pareado e não paramétrico de Kruskal Wallis. ($p < 0.05$).

IV- Na expressão de CD45RO/CCR7 (naive, memória periférica, memória central e células efetoras) em linfócitos T de ($CD4^+$ e $CD8^+$), identificamos que as células de memória efetoras (TME) apresentaram-se em maior quantidade em pacientes com LCL, tanto em $CD4^+$ (figura 17A) quanto em $CD8^+$ (figura 17B), em relação aos pacientes com LCLR.

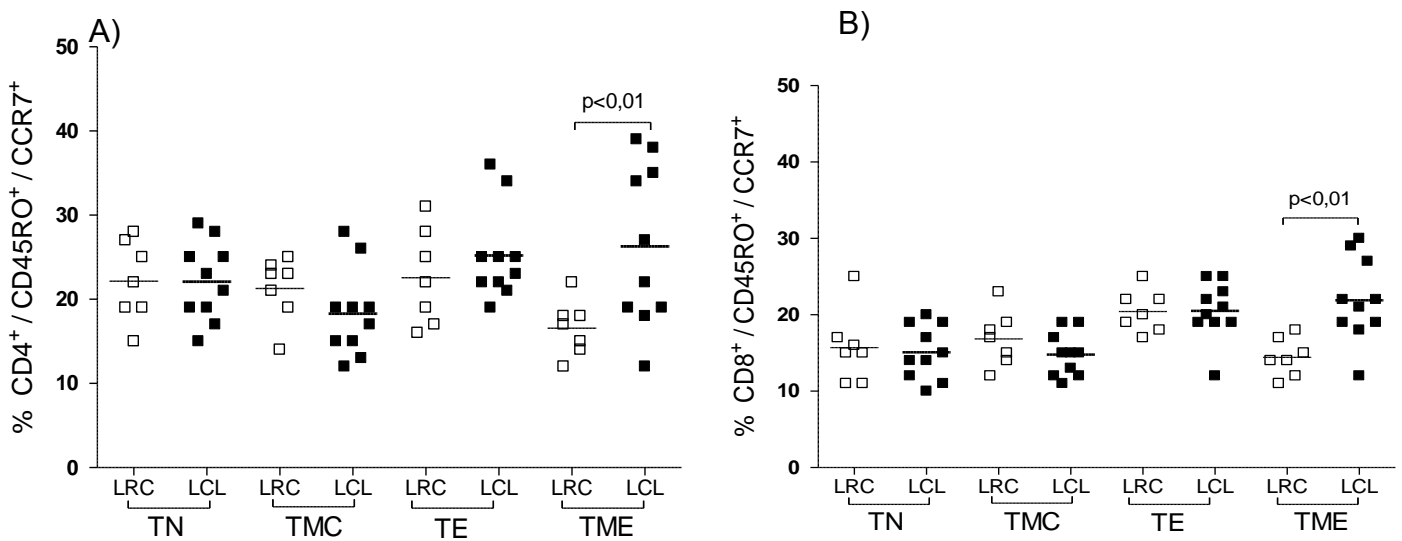


Figura 17. Expressão de CD45RO e CCR7 em células $CD4^+$ e $CD8^+$ do sangue periférico de pacientes com LRC (n=7) e em LCL (n=10) com lesão ativa. TN (naive), TMC (memória central), TE (efetora) e TME (memória efetora). Teste estatístico não pareado e não paramétrico de Kruskal Wallis. ($p < 0.05$).

7. DISCUSSÃO

O equilíbrio entre o perfil de resposta imune do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasito, sua virulência/adaptação ao meio, determinam o tipo de evolução e a gravidade da infecção (CONCEIÇÃO-SILVA; ALVES, 2014). O recrutamento de células para o local da infecção é de extrema relevância para o desenvolvimento da resposta imune celular do hospedeiro. Este processo é conduzido por quimiocinas produzidas por leucócitos e por células infiltrantes no sítio da infecção (ROT; ANDRIAN, VON, 2004; TEIXEIRA *et al.*, 2006), configurando-as como elementos cruciais na resposta à *Leishmania* spp, conforme o esperado, diante de um quadro de infecção vigente. (KUMAR *et al.*, 2010; FERNÁNDEZ-FIGUEROA *et al.*, 2012). Enquanto as citocinas são responsáveis por modular a resposta imune gerando um ambiente pró-inflamatório, estimulando a expansão clonal, diferenciação e ativação de celular. A IL-7 citocina responsável pela manutenção das células de memória CD4⁺ e CD8⁺ e também importante para o desenvolvimento inicial dos linfócitos que após a exposição ao antígeno e as moléculas de coestimulação (CD27 e CD28) se diferenciarão em células de memória e efetora, fundamentais para montar respostas mais rápidas aos antígenos após exposição secundária (TAVARES *et al.*, 2014; FEIJÓ *et al.*, 2016; GABRIEL *et al.*, 2019).

A secreção das citocinas plasmáticas dosadas no kit “inflamatório” e “Th1/Th2/IL-17” em LRC e LCL estavam mais elevadas entre os indivíduos de lesão ativa ou curados em relação aos controles saudáveis. As formas clínicas LRC e LCL são semelhantes em aspectos clínicos e imunológicos (MEYMANDI *et al.*, 2009; COSTA, 2014). Porém em LRC IL-8 e IL-12p40 apresentaram significância somente dos curados em relação aos controles saudáveis. Além disso, IL-8 em LCL e IL-17 nas duas formas clínicas não apresentaram resultado estatisticamente significativo quando comparadas as formas clínicas isoladas. Quando analisadas as formas clínicas entre si (LRC versus LCL) a secreção de IL-1 β no plasma, citocina pro-inflamatória que estimula a ativação de células T CD8⁺, recrutamento de monócitos, macrófagos, infiltração de neutrófilos além de estimular a secreção de outros mediadores da resposta inata (MILLER *et al.*, 2007; FERNÁNDEZ-FIGUEROA *et al.*, 2012), esteve maior no plasma dos curados por LRC em relação aos curados por LCL, podendo estar relacionada à persistência antigênica após a cura, já que a produção desta citocina tem seu “start” a partir do reconhecimento do parasito por receptores tipo toll dois e quatro e ativação do inflamassoma NLRP3 que ativa a caspase-1 que cliva pró-IL-1 β , liberando IL-1 β (SANTOS *et al.*, 2018).

Do mesmo modo, IL-8 citocina que atua como mediadora da quimiotaxia e ativação de neutrófilos (ZANDBERGEN, VAN *et al.*, 2002), estava mais elevada entre os curados por LRC

em relação aos curados por LCL. A manutenção da produção de IL-8 entre os curados por LRC é uma evidência que se distancia do padrão de resposta imune na LCL, onde a secreção desta citocina tende a diminuir após a cura (KUMAR *et al.*, 2010). *In vitro*, os níveis de IL-8 em LRC e LCL estiveram mais elevados entre os ativos e curados após estímulo com *Leishmania braziliensis*. As demais citocinas do kit “inflamatório” não apresentaram níveis estatisticamente significantes quando avaliadas isoladamente (ativos versus curados) e nem quando analisadas as formas clínicas entre si (LRC versus LCL). É importante salientar que o grupo com lesão ativa já havia iniciado o tratamento com o antimonial pentavalente, Glucantime, quimioterápico com mecanismo de ação ainda incerto, mas que pode regular a resposta imune ao induzir proliferação celular e aumento de IFN e IL-10 (REIS, 2007). O estudo foi conduzido desta forma com o intuito de homogeneizar a amostra, já que os indivíduos na fase ativa de LRC já haviam sido expostos ao Glucantime anteriormente durante o tratamento da LCL. O que pode ter impactado em não serem evidenciadas diferenças estatísticas significantes entre ativos versus curados quando comparadas as formas clínicas isoladamente, com exceção das quimiocinas IP-10 em LRC e LCL, e MIG em LCL, todas dosadas no plasma.

No kit “Th1/Th2/IL-17” o perfil de citocinas de LRC e LCL foi semelhante no plasma, quando avaliadas isoladamente quanto à fase de infecção (ativos e curados) versus controles, assim como quando comparadas as formas clínicas entre si (LRC versus LCL), não foram evidenciadas diferenças estatisticamente significantes (dados não mostrados). *In vitro*, após estímulo com *Leishmania braziliensis* em sobrenadante de cultura, para as citocinas dosadas nesse kit também não foram evidenciadas diferenças ao analisar as formas clínicas isoladamente (ativos versus curados) e nem entre si (LRC versus LCL). Porém todas foram estatisticamente significantes quando comparadas com o controle positivo ConA versus meio e versus *Leishmania braziliensis*.

Nas dosagens do kit “quimiocinas” no plasma os níveis de IP-10 (CXCL10) em LRC apresentaram-se diminuídos entre os ativos em relação aos curados. Em LCL IP-10 esteve mais elevada entre os indivíduos de fase ativa quando comparados aos curados e controles na análise das formas clínicas isoladamente. Assim como MIG (CXCL9), em LCL, que esteve mais elevada na fase ativa da infecção em relação aos curados. Estas quimiocinas (MIG e IP-10) coordenam a migração de células Th1 ativadas para o sítio de infecção e o estabelecimento de circuito de amplificação Th1 mediada pelo IFN- γ através da interação com CXCR3, receptor acoplado a proteína G, expresso em células Th1 do tipo CD4⁺ e CD8⁺ (ROT; ANDRIAN, VON, 2004; CAMPANELLA *et al.*, 2006; BROMLEY *et al.*, 2008; GROOM; LUSTER, 2011), secretada por polimorfonucleares (DYER *et al.*, 2009), monócitos, fibroblastos e células

endoteliais (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2010), e em resposta ao IFN- γ (TORVINEN *et al.*, 2007; BRITO *et al.*, 2014). Sugerimos que sua diminuição na fase ativa da infecção em LRC poderia levar ao comprometimento da ativação, migração e resposta celular eficaz. As quimiocinas rantes e MCP-1 não apresentaram dados estatisticamente significantes no plasma (dados não mostrados), assim como MIG em LRC que teve níveis semelhantes entre as fases de infecção (ativo versus curados) e controles sadios quando comparadas as formas clínicas isoladas.

Quando comparadas as formas clínicas entre si, as quimiocinas plasmáticas MIG e IP-10, demonstraram menor secreção na fase ativa por LRC, em relação aos indivíduos na fase ativa da LCL, podendo comprometer a resposta imune celular eficaz na LRC, prolongar o tempo de tratamento ou até levar a predisposição para a falha terapêutica desses pacientes, devido ao déficit destas quimiocinas. Nossos dados corroboram com estudos que apresentam níveis mais elevados de IP-10 em pacientes com lesões recentes por LCL e diminuição em formas crônicas (RITTER; KÖRNER, 2002; DÍAZ *et al.*, 2013), entretanto, estas quimiocinas não demonstraram associação na análise de escore com a tipicidade, tempo e o número das lesões (COSTA-SILVA *et al.*, 2014).

Validando os resultados obtidos nas dosagens das quimiocinas plasmáticas, IP-10 e MIG apresentaram-se mais elevadas também entre os curados por LRC e LCL após o estímulo *in vitro* com *Leishmania braziliensis*. MCP-1, quimiocina responsável pela ativação de macrófagos, estava significativamente mais elevada entre os curados e em fase de lesão ativa, nas duas formas clínicas, após estímulo *in vitro* com *Leishmania braziliensis* em relação ao Meio. Outras produções também têm apontado essa tendência da elevação de MCP-1 após a cura em LCL (KUMAR *et al.*, 2010). A quimiocina rantes ao ser dosada *in vitro*, não apresentou dados estatisticamente significantes (dados não mostrados).

Sendo IP-10 (CXCL10) uma quimiocina que induz quimiotaxia, apoptose, crescimento celular, promoção da adesão de células T de memória às células endoteliais, para resolução da infecção, sua associação com doenças inflamatórias tem despertado interesse em investigar seu papel na patogênese de doenças infecciosas (LIU *et al.*, 2011; KARIMINIK *et al.*, 2016). Estudos apontam níveis significativamente mais elevados de IP-10 e da expressão do seu receptor CXCR3, predominantemente em monócitos CD14⁺ no sangue de pacientes com Leishmaniose Tegumentar, quando comparados com indivíduos controles, especialmente na forma clínica mucosa, sugerindo que a secreção desta quimiocina possa estar associada ao desenvolvimento da lesão, gravidade da doença (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2010; OLIVEIRA, DE; BRODSKYN, 2012), resistência à infecção por *Leishmania braziliensis*

(TEIXEIRA *et al.*, 2005) e persistência do parasita na *L. major* (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2010). No entanto, outras produções sugerem que esta citocina possa estar associada ao controle da infecção, redução da carga parasitária, aumento da secreção de IL-12 e IFN (VASQUEZ; SOONG, 2006) e ao recrutamento de células TCD8⁺ (MAJUMDER *et al.*, 2012). A diminuição de IP-10, importante para quimiotaxia de células de memória para resolução da infecção no local da lesão pode estar relacionada a reativação de lesões na cicatriz previamente produzida por *Leishmania*, configurando um ponto chave que precisa ser melhor investigado para compressão da resposta imune em LRC.

Após a ativação, diante do estímulo antigênico e expansão clonal, as células T de memória (CD45RO⁺/CCR7) iniciam rapidamente sua ação a fim de mitigar a infecção em um ambiente pró-inflamatório. Esse processo se dá através da expressão de marcadores de superfície de ativação (CD69, CD25 e HLA-DR) e migração (CD62L) em populações com fenótipos diferentes, dentre elas células T de Memória Central (TMC) com alta capacidade de proliferação em órgãos linfoides secundários, caracterizada pela produção de IL-2 em pacientes com histórico de LCL, e células T de Memória Efetora (TME) que conduzem a resposta no sítio de infecção (tecidos periféricos), com perfil de indução da produção de IFN *in vitro* em indivíduos com histórico de LCL (KESHAVARZ VALIAN *et al.*, 2013). Após o contato com o antígeno, a expressão de CD45RO⁺, marcador de células de memória, é regulada positivamente e as células T CD4⁺ tipo Th1 e células T CD8⁺ efetoras são recrutadas para o sítio de lesão expressando receptores como o CXCR3, ligante para quimiocinas induzidas por interferon entre elas estão MIG (CXCL9), IP-10 (CXCL10) e I-TAC (CXCL11). Onde sugere-se que o CXCR3 desempenha um papel na migração de células T no microambiente do tecido periférico e compartimento linfoide (GROOM; LUSTER, 2011). A marcação de CD45RO⁺ não foi capaz de mostrar que existe diferença nas frequências dos subtipos de células de memória tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺ quando comparadas as formas clínicas entre si (LRC versus LCL). Diante de um contexto em que há diminuição de quimiotáticos como IP-10 e MIG, poderia ocorrer comprometimento de ativação celular, e migração de células T, o que implicaria em déficit na responsividade imunológica.

A ativação celular, marcada pela expressão de CD69 é aumentada com o intuito de reter a saída das células T dos órgãos linfoides o suficiente para a expansão clonal e diferenciação em TME e TMC, diminuindo após ocorrência desse evento e culminando na saída dessas células dos órgãos linfoides predominantes em lesões recentes (30 dias) e ocorrendo diminuição em lesões tardias (60 dias). Estudos tem demonstrado aumento na frequência de células T expressando CD69 no sangue periférico estimuladas com SLA, sendo mantida em curados por

LCL, entretanto, com o tempo de cura apresenta tendência de diminuição (PEREIRA-CARVALHO *et al.*, 2013; OLIVEIRA MENDES-AGUIAR, DE *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). Assim como nos dados apresentados por Andrade, 2018, onde foi observado que nas células de pacientes com LCL houve maior expressão das moléculas de ativação (CD25, CD69 e HLA-DR) quando comparados aos controles, nos clones das células T CD4⁺ (ANDRADE, 2018). Ao avaliar o nível de ativação celular em LRC, através da marcação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de memória imunológica com CD69 (ativação inicial), as formas clínicas LRC e LCL demonstraram-se semelhantes, enquanto que a expressão de CD25 (ativação intermediária), relacionada a resposta a IL-2 (promotora de crescimento), esteve diminuída tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺. Assim como menor frequência de células expressando HLA-DR (ativação tardia) em células de pacientes com LRC em relação às células dos pacientes com LCL. Diante do comprometimento da ativação celular em LRC, isso pode gerar reflexos na migração celular evidenciada pela expressão de CD62L, L-selectina responsável pela interação entre linfócitos T e células endoteliais, que conduz a migração de Células T *naive* e TMC para órgãos linfoides secundários, caracterizado por ser um marcador da distinção entre TMC e TME (SALLUSTO *et al.*, 2004).

Estudos tem apontado alta frequência de células CD62L^{low} no sangue de pacientes com LCL em relação aos controles. Assim como frequência mais elevada de células CD4⁺ fenótipo efetor, responsável por migrar para a lesão e relacionadas a resolução da infecção, enquanto que as células CD8⁺ apresentando o fenótipo de memória, tiveram perfil de correlação positiva entre a frequência de células no sangue, com o tamanho da lesão (ANDRADE, 2018). No nosso estudo, os pacientes com LRC apresentaram uma redução de células CD62L^{low}/CD45RO⁺, migrando para a periferia em comparação com pacientes com LCL e quantidade de células CD62L^{high}/CD45RO⁺ maior do que em pacientes com LCL, evidenciando possível diminuição na frequência de TME migrando para a periferia para resolução da lesão no sítio de infecção, elevando o tempo de cura na LRC e maior frequência de TMC, presente em tecidos linfoides (OLIVEIRA MENDES-AGUIAR, DE *et al.*, 2016).

Apesar de CD45RO⁺ não parecer ter diferença entre LRC e LCL, quando associado ao CCR7⁺ na verificação da frequência dos subtipos de células de memória isto poderia evidenciar alguma diferença entre as formas clínicas. Diante disso, ao avaliar as frequências de células T *naive*, TMC e TE para CD4⁺ e CD8⁺ verificamos que as formas clínicas, LRC e LCL foram semelhantes. Entretanto, identificada diminuição da resposta de memória efetora em LRC

evidenciada pela menor frequência de células memória efetora (TME) em LRC quando comparadas a LCL, podendo este fenômeno ser o “gatilho” para o surgimento na LRC. Sugerimos que a diminuição de IP-10 na fase ativa da LRC possa ser um biomarcador para identificação precoce desta forma clínica e que possa estar relacionado aos demais eventos da resposta celular (ativação, migração e resposta efetora), associada a difícil resposta terapêutica e resistência ao tratamento. Esses dados, além de tentar esclarecer diferenças imunológicas entre LRC e LCL poderão oportunizar melhorias na conduta terapêutica para LRC.

Considerando as duas formas clínicas com características de resposta imune local, a expressão de IP-10, necessita de maiores investigações para explicar o seu real papel no desenvolvimento e resolução nas diferentes formas de LT e possível caracterização como biomarcador

Diante disso, entre as perspectivas do nosso estudo estão caracterizar o perfil de células de memória em curados por LRC para efetivar a comparação destes com a fase ativa, onde esperamos que entre os curados por LRC, o perfil de células TME estejam semelhantes aos curados por LCL, conforme trabalhos anteriores do nosso grupo comparando ativos e curados por LCL. Além de correlacionar o perfil de células de memória com a expressão de CD62L^{low} e CD62L^{high}.

8. CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem que na LRC, a diminuição de IP-10 poderia caracterizar-se como biomarcador para identificação precoce desta forma clínica e que possa estar relacionada aos demais eventos da resposta celular (ativação, migração e memória efetora), associada a difícil resposta terapêutica e resistência ao tratamento.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, D. R. **Caracterização fenotípica e funcional das células T CD4+ E CD8+ VB12 na resposta imune em paciente com Leishmaniose Cutânea Localizada.** Universidade Federal da Bahia, 2018.
- ARAGÃO, J. Introdução aos estudos quantitativos utilizado em pesquisas científicas. **Revista Ginecologia**, v. 3, n. 6, p. 59–62, 2011.
- ARAÚJO, A. R. de *et al.* Risk Factors Associated With American Cutaneous Leishmaniasis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 58, n. 1, p. 2–7, 2016.
- ARDIC, N. *et al.* Leishmaniasis recidivans in pediatric patients. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 36, n. 5, p. 534, 2017.
- BD BIOSCIENCES. BD Cytometric Bead Array (CBA) Human Inflammatory. Disponível em: <http://www.bdbiosciences.com/ds/pm/others/23-11112.pdf>. Acesso em: 6 out 2016.
- BELKAID, Y. *et al.* CD4+CD25+ regulatory T cells control Leishmania major persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. 6915, p. 502–507, 2002.
- BERLIN, C. LEISHMANIASIS RECIDIVA CUTIS; LEISHMANID. **Archives of Dermatology**, v. 41, n. 5, p. 874, 1940.
- BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar.** 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BRITO, G. *et al.* Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 617–620, 2014.
- BROMLEY, S. K.; MEMPEL, T. R.; LUSTER, A. D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nature Immunology**, v. 9, n. 9, p. 970–80, 2008.
- CALVOPÍÑA, M. *et al.* Intralesional infiltration with meglumine antimoniate for the treatment of leishmaniasis recidiva cutis in Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1508–1512, 2017.
- CALVOPINA, M. *et al.* Atypical clinical variants in new world cutaneous leishmaniasis: Disseminated, erysipeloid, and recidiva cutis due to Leishmania (V.) panamensis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 73, n. 2, p. 281–284, 2005.
- CALVOPÍÑA, M.; KATO, H.; HASHIGUCHI, Y. Leishmaniasis recidiva cutis and its topical treatment in ecuador. **Tropical Medicine and Health**, v. 41, n. 3, p. 93–94, 2013.
- CALVOPINA, M. *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis due to Leishmania (Viannia) panamensis in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. **International Journal of Dermatology**, v. 45, n. 2, p. 116–120, 2006.
- CAMPANELLA, G. S. V. *et al.* Oligomerization of CXCL10 is necessary for endothelial cell presentation and in vivo activity. **Journal of Immunology**, v. 177, n. 10, p. 6991–8, 2006.
- CANNAVÒ, S. P.; VACCARO, M.; GUARNERI, F. Leishmaniasis recidiva cutis. **International Journal of Dermatology**, v. 39, n. 3, p. 205–206, 2000.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.

CARVALHO, E. M.; MACHADO, P. A importância de buscar soluções terapêuticas para a leishmaniose mucosa na América Latina. **Comunicação especial para InfoLeish**, v. 2, 2017.

COLPITTS, S. L.; DALTON, N. M.; SCOTT, P. Interleukin-7 receptor (IL7R) expression provides the potential for long-term survival of both CD62L^{high} central memory T cells and Th1 effector cells during *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 9, p. 5702–5711, 2009.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. (Eds.). **Leishmanioses do continente americano**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2014.

CONCEIÇÃO, J. *et al.* Characterization of neutrophil function in human cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 5, p. e0004715, 2016.

COSTA-SILVA, M. F. *et al.* Gene expression profile of cytokines and chemokines in skin lesions from Brazilian Indians with localized cutaneous leishmaniasis. **Molecular Immunology**, v. 57, n. 2, p. 74–85, 2014. Elsevier Ltd.

COSTA, J. M. L. *et al.* Clinical Modalities , Diagnosis and Therapeutic Approach of the Tegumentary Leishmaniasis in Brazil. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 79, n. V, p. 70–83, 2009.

COSTA, M. S. **Aspectos clínico-imunológicos da Leishmaniose Recidiva Cútitis (LRC) causada por Leishmania Viannia Braziliensis**. Centro De Pesquisas Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2014.

COSTA, S. M. **Impactos das mudanças climáticas e ambientais na distribuição espacial de Lutzomyia (Nyssomyia) whitmani (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) e no processo de expansão geográfica da Leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Br.** Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2018.

DASSONI, F. *et al.* Leishmaniasis recidivans in Ethiopia: Cutaneous and mucocutaneous features. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 11, n. 1, p. 106–110, 2017.

DIAZ, N. L. *et al.* Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterisation of the lesion. **Experimental Dermatology**, v. 11, n. 1, p. 34–41, 2002.

DÍAZ, N. L.; ZERPA, O.; TAPIA, F. J. Chemokines and chemokine receptors expression in the lesions of patients with American cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 4, p. 446–452, 2013.

DYER, K. D. *et al.* Pneumoviruses infect eosinophils and elicit MyD88-dependent release of chemoattractant cytokines and interleukin-6. **Blood**, v. 114, n. 13, p. 2649–56, 2009. American Society of Hematology.

EID RODRÍGUEZ, D.; SAN SEBASTIAN, M.; PULKKI-BRÄNNSTRÖM, A. M. Cheaper and better: Societal cost savings and budget impact of changing from systemic to intralesional pentavalent antimonials as the first-line treatment for cutaneous leishmaniasis in Bolivia. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 11, p. e0007788, 2019.

FACCINI-MARTÍNEZ, Á. A.; FALQUETO, A. Images in clinical tropical medicine leishmaniasis recidiva cutis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 6, p. 1221–1222, 2016.

FAVALI, C. *et al.* *Leishmania amazonensis* infection impairs differentiation and function of

human dendritic cells. **Journal of leukocyte biology**, v. 82, n. 6, p. 1401–6, 2007.

FEIJÓ, D. *et al.* Dendritic cells and leishmania infection: Adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.

FERNÁNDEZ-FIGUEROA, E. A.; RANGEL-ESCARÉÑO, C.; ESPINOSA-MATEOS, V.; *et al.* Disease severity in patients infected with *Leishmania mexicana* relates to IL-1? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 5, 2012.

GABRIEL, Á. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, p. 1–16, 2019.

GHATEE, M. A. *et al.* Role of environmental, climatic risk factors and livestock animals on the occurrence of cutaneous leishmaniasis in newly emerging focus in Iran. **Journal of Infection and Public Health**, v. 11, n. 3, p. 425–433, 2018.

GIL, A. C. **Métodos e técnicas de pesquisa social**. 6 ed. São Paulo: Atlas, 2008.

GITARI, J. W. *et al.* Leishmaniasis recidivans by *Leishmania tropica* in Central Rift Valley Region in Kenya. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 74, p. 109–116, 2018.

GLENNIE, N. D.; SCOTT, P. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Immunology**, 2016. Elsevier Inc.

GOMES, C. M. *et al.* The influence of treatment on the development of leishmaniasis recidiva cutis: a 17-year case-control study in Midwestern Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV**, v. 29, n. 1, p. 109–14, 2015.

GOMES, C. M. *et al.* Recurrent cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 88, n. 3, p. 462–464, 2013.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. DE L. R. American cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GROOM, J. R.; LUSTER, A. D. CXCR3 in T cell function. **Experimental Cell Research**, v. 317, n. 5, p. 620–631, 2011.

KARIMINIK, A.; DABIRI, S.; YAGHOBI, R. Polyomavirus BK Induces Inflammation via Up-regulation of CXCL10 at Translation Levels in Renal Transplant Patients with Nephropathy. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1514–1519, 2016.

KESHAVARZ VALIAN, H. *et al.* CCR7+ central and CCR7 effector memory CD4+ T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Immunology**, v. 33, n. 1, p. 220–234, 2013.

KHAN, M. A. A. *et al.* Imported cutaneous leishmaniasis: molecular investigation unveils *Leishmania major* in Bangladesh. **Parasites & Vectors**, v. 12, n. 1, p. 527, 2019. BioMed Central.

KUMAR, R.; BUMB, R. A.; SALOTRA, P. Evaluation of localized and systemic immune responses in cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica*: Interleukin-8, monocyte chemotactic protein-1 and nitric oxide are major regulatory factors. **Immunology**, v. 130, n. 2, p. 193–201, 2010.

LIU, M. *et al.* CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, 2011.

- MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 94, n. 1, p. 9–16, 2019.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.
- MAJUMDER, S. *et al.* CXCL10 is critical for the generation of protective CD8 T cell response induced by antigen pulsed CpG-ODN activated dendritic cells. **PloS one**, v. 7, n. 11, p. e48727, 2012.
- MANOMAT, J. *et al.* Prevalence and risk factors associated with Leishmania infection in Trang Province, southern Thailand. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 11, p. 1–15, 2017.
- MASOOD, S.; NAVEED, S.; ALVI, R. U. Infiltrated leishmaniasis recidivans cutis on the face: A rare clinical presentation. **Tropical Doctor**, v. 42, n. 2, p. 120–121, 2012.
- MEYMANDI, S. *et al.* Immunophenotypic pattern and cytokine profiles of dry type cutaneous leishmaniasis. **Archives of Iranian medicine**, v. 12, n. 4, p. 371–6, 2009.
- MILLER, L. S. *et al.* Inflammasome-mediated production of IL-1beta is required for neutrophil recruitment against Staphylococcus aureus in vivo. **Journal of Immunology**, v. 179, p. 6933–6942, 2007.
- OLIVEIRA-NETO, M. P. *et al.* Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 37, n. 11, p. 846–9, 1998.
- OLIVEIRA, C. I. DE; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.
- OLIVEIRA MENDES-AGUIAR, C. DE *et al.* Effector memory CD4+ T cells differentially express activation associated molecules depending on the duration of American cutaneous leishmaniasis lesions. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 185, n. 2, p. 202–209, 2016.
- OPS, O. P. DE LA S. **Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. 2019.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Leishmaniasis en las Américas: recomendaciones para el tratamiento**. Washington, 2013.
- PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The central memory CD4+ T cell population generated during Leishmania major infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. **Journal of Immunology**, v. 180, n. 12, p. 8299–305, 2008.
- 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. 1–8, 2013.
- PÉREZ-AYALA, A. *et al.* Imported leishmaniasis: A heterogeneous group of diseases. **Journal of Travel Medicine**, v. 16, n. 6, p. 395–401, 2009.
- PROVDANOV, C. C.; FREITAS, E. C. DE. **Metodologia do trabalho científico: métodos e técnicas da pesquisa e do trabalho acadêmico**. 2013.

- RATHER, S. *et al.* Chronic Relapsing Cutaneous Leishmaniasis in an Elderly Female: A Rare Clinical Presentation from a Nonendemic Area. **Indian dermatology online journal**, v. 10, n. 2, p. 165–167, 2017.
- REIS, L. DE C. **Caracterização da resposta imune celular em portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana antes e após tratamento quimioterápico.** Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, 2007.
- REIS e SOUSA, C. Activation of dendritic cells: Translating innate into adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n. 1, p. 21–25, 2004.
- 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, 2012.
- RITTER, U. ; FRISCHKNECHT, F.; ZANDBERGEN, G. VAN. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites? **Trends in Parasitology**, v. 25, n. 11, p. 505–510, 2009.
- RITTER, U.; KÖRNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 6, p. 295–301, 2002.
- ROT, A.; ANDRIAN, U. H. VON. Chemokines in innate and adaptive host defense : Basic Chemokine Grammar for Immune Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 891–928, 2004.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central Memory and Effector Memory T Cell Subsets : Function, Generation, and Maintenance . **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 745–763, 2004.
- SANTOS, D.; CAMPOS, T. M.; SALDANHA, M.; *et al.* IL-1 β Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 138, n. 5, p. 1107–1115, 2018.
- SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, p. 1–26, 2017.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, 2016.
- SHARIFI, I. *et al.* Leishmaniasis recidivans among school children in Bam, South-east Iran, 1994-2006. **International Journal of Dermatology**, v. 49, n. 5, p. 557–61, 2010.
- SILVA, L. M. **Aspecto clínico-evolutivo e anatomopatológico da Leishmaniose Recidiva Cútica (LRC) em pacientes procedentes da região do Vale do Jiquiriçá, Bahia.** Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2011.
- SILVINO, A. C. S. *et al.* Caracterização de flebotomíneos em bairros de Sobral, Ceará. **Revista da Biologia**, v. 17, p. 12–17, 2017.
- TAVARES, N. M. *et al.* Understanding the Mechanisms Controlling Leishmania amazonensis Infection In Vitro: The Role of LTB4 Derived From Human Neutrophils. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 210, p. 1–11, 2014.
- TEIXEIRA, M. J. *et al.* Distinct Leishmania braziliensis isolates induce different paces of chemokine expression patterns. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 2, p. 1191–5, 2005.

- TEIXEIRA, M. J. *et al.* Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32–40, 2006.
- TORVINEN, M.; CAMPWALA, H.; KILTY, I. The role of IFN-gamma in regulation of IFN-gamma-inducible protein 10 (IP-10) expression in lung epithelial cell and peripheral blood mononuclear cell co-cultures. **Respiratory Research**, v. 8, n. July, p. 80, 2007.
- VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A. *et al.* CXCL10 production by human monocytes in response to *Leishmania braziliensis* infection. **Infection and immunity**, v. 78, n. 1, p. 301–8, 2010.
- VASQUEZ, R. E.; SOONG, L. CXCL10/gamma interferon-inducible protein 10-mediated protection against *Leishmania amazonensis* infection in mice. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 12, p. 6769–6777, 2006.
- ZANDBERGEN, G. VAN *et al.* *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and immunity**, v. 70, n. 8, p. 4177–84, 2002.
- ZAPH, C. *et al.* Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature Medicine**, v. 10, n. 10, p. 1104–10, 2004.