



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO**

**CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

**JULIANA ARAUJO SILVA**

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS NAS  
CÉLULAS T DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania  
braziliensis***

**Agosto, 2018,**

**Vitória, ES**

**JULIANA ARAUJO SILVA**

**EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS NAS  
CÉLULAS T DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania  
braziliensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Doenças Infecciosas.

**Orientador:** Prof. Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

**Agosto, 2018,**

**Vitória, ES**

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)  
(Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do  
Espírito Santo, ES, Brasil)

---

S586e Silva, Juliana Araujo, 1990 -  
Expressão de receptores inibitórios nas células T durante a infecção por  
*Leishmania braziliensis* / Juliana Araujo Silva – 2018.  
60 f. : il.

Orientador: Daniel Cláudio de Oliveira Gomes.

Dissertação (Mestrado em Doenças Infecciosas) – Universidade Federal  
do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmania. 2. Linfócitos T. 3. Doenças Transmissíveis.  
4. Sistema Imunitário. 5. I. Gomes, Daniel Cláudio de Oliveira.  
II. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.  
III. Título.

CDU: 61

---

Elaborado por Rafael Lima de Carvalho – CRB-6 MG-002926/O



**PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE DISSERTAÇÃO DE  
MESTRADO**

A mestranda **Juliana Araujo Silva** apresentou a dissertação intitulada “**EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS NAS CÉLULAS T DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania braziliensis***” em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Mestre em Doenças Infecciosas, do Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo.

Considerando a apresentação oral dos resultados, sua qualidade e relevância, a Comissão Examinadora decidiu () **aprovar** (  ) **reprovar** a dissertação habilitando a biomédica JULIANA ARAUJO SILVA a obter o Grau de MESTRE EM DOENÇAS INFECCIOSAS.

Vitória, ES, 12 de setembro de 2018.

Dr.<sup>a</sup> Sílvia Cristina de Paiva e Almeida

(Membro Interno)

Dr. Breno Souza Salgado

(Membro Externo)

Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes

(Orientador)

Dedico esta dissertação a minha Vó,  
que sempre me ensinou o valor da  
educação.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me conceder a oportunidade de aprendizado e me capacitar para concretizar meus objetivos.

À minha família, que me apoiou e acreditou nos meus sonhos. À minha mãe Dilza, que sempre me incentivou a buscar meus sonhos e a nunca desistir. Ao meu pai José, por me ensinar a ser forte nas durezas da vida. A meu irmão Leonardo, por sua infinita paciência e cumplicidade.

À minha avó Maria, que me deixou antes do tempo, mas seus ensinamentos sobre a fé e a importância da educação irão ficar para sempre comigo.

Aos pacientes que tão gentilmente e com infinito carisma aceitaram participar do nosso projeto. Nada disso seria possível sem vocês, espero que saibam a importância da boa vontade de cada um de vocês para uma ciência que visa o melhor.

A meu orientador Dr. Daniel Cláudio de Oliveira Gomes pela oportunidade de desenvolver este trabalho, pelo incentivo, paciência e ensinamentos durante esses anos e principalmente, pelos aprendizados que obtive durante o período sob sua orientação, jamais seria capaz de retribuir tal ganho.

Ao Dr Falqueto, que se dispôs a encaminhar os pacientes para participar do projeto. O quanto admirável é a atenção com que trata cada um de seus pacientes.

A minha querida amiga Régia, que compartilhou comigo seu conhecimento e dúvidas, choros e muitos sorrisos. O seu suporte profissional e emocional foi fundamental para mim, dividir com você o projeto tornou tudo mais fácil.

A Bruna que coletou pacientemente as amostras utilizadas no projeto, sua gentileza e benevolência irão sempre ficar guardadas em minha mente.

A Glênia por ser tão solícita e sempre estar disposta ajudar, e pela paciência e perseverança nas explicações.

A Luciana Covre pela dedicação e suporte, é admirável a sua dedicação e quão disposta é em ajudar. Aprendi muito com você, obrigada Lu.

A todos do laboratório de Imunologia celular e molecular, por todos esses anos de convivência, trabalho, risadas e os momentos de aprendizado. Foi maravilhoso aprender um pouco com cada um. Cada um de vocês: Andrés, Divan, Renan, Caio, Jéssica, Naira, Vivian, Lorenzo, contribuíram de forma singular para a concretização deste projeto e me tornaram uma pessoa melhor.

Aos professores membros da banca, Professor Breno Salgado e Professora Silvia Almeida por terem aceitado o convite, sou grata, pois sei que o conhecimento de ambos irá agregar imenso valor para o projeto.

A Sandra Zeilder e todos os pesquisadores do laboratório de Patologia, obrigada por estarem sempre aptos a nos auxiliar.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Doenças Infecciosas pelo conhecimento e pelo exemplo profissional. Em especial ao Professor Fausto, que é exemplo de competência e conhecimento. E a professora Blima Fux, pelo exemplo profissional.

Ao Dr Arne Akbar professor da UCL, e toda sua equipe no departamento de Imunologia que foram parceiros do projeto e que nos permitiram acesso a uma gama de conhecimento, e foram fundamentais para o aperfeiçoamento de diversas técnicas executadas no projeto.

Aos meus amigos Mahmoud, Samuel e Estêvão, pelo apoio científico, por serem tão pacientes e compreensíveis.

As minhas amigas Mariana Gobbi, Catarina Moraes, Cintia Almeida e Emanuelli Zanelato o suporte de vocês foi imprescindível para concretização deste projeto. De

forma especial agradeço as minhas amigas biomédicas de longas datas Jéssica Viégas e Bruna Dupphi, vocês tornam tudo mais leve e suportável.

As mais generosas e compreensíveis pessoas que acabei criando um vínculo de irmandade, Daiani Costa, Quézia Araujo, Dheyne Margon, Monique Tonani, Suellen Santana e Priscila Suelen. Grata por toda interminável paciência e empatia.

Aos professores Rodrigo Pratte e Sigrid Valbão que desde a graduação sempre foram incentivadores da pesquisa científica e pelo exemplo profissional, obrigada pelo incentivo e carinho de sempre.

Ao programa FAPES pela bolsa concedida que permitiu minha dedicação total à pesquisa durante o período de vigência da bolsa.

Ao programa Newton Fund que contribui com apoio financeiro para o desenvolvimento do projeto.

A cada um de vocês que contribuíram de forma direta e indireta, palavras jamais irão expressar minha gratidão.

Obrigada!



*“Se você vai tentar, vá até o fim, caso contrário, nem comece.”*

Charles Bukowski

## RESUMO

Leishmaniose é um termo utilizado genericamente para definir um complexo de doenças clinicamente diferentes causada por protozoários do gênero *Leishmania*. As leishmanioses são classificadas em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo que esta última inclui as manifestações clínicas cutâneas e as mucocutâneas. Processos infecciosos que resultam na persistência antigênica ou síndromes inflamatórias crônicas afetam as funções efetoras de células T antígeno-específicas, sendo caracterizada pela alta expressão de receptores inibitórios tais como: PD-1, TIM-3, CTLA-4, KLRG-1 e CD57. Neste trabalho objetivamos avaliar a expressão dos receptores de exaustão celular PD-1, CTLA-4, KLRG-1, CD57 e TIM-3 nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>. Os resultados demonstram frequências mais altas de PD-1, CTLA-4, CD57, KLRG-1 e TIM-3 em pacientes com leishmaniose cutânea. Simultaneamente foi verificado um aumento na produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e PCR, o que reflete diretamente sobre a capacidade microbicida e o perfil da inflamação nos pacientes com leishmaniose cutânea. Nossos resultados ampliam o conhecimento da caracterização da resposta imunológica durante as leishmanioses.

**Palavras Chaves:** Leishmanioses; Exaustão Celular; Receptores Inibitórios; PD-1; TIM-3; CTLA-4; KLRG-1; CD57

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a term used to define a complex of clinically different diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania*. Leishmaniasis is classified as Visceral Leishmaniasis (VL) and American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), the latter including cutaneous and mucocutaneous clinical manifestations. Infectious processes that result in antigenic persistence or chronic inflammatory syndromes affect the effector functions of antigen-specific T cells, being characterized by high expression of inhibitory receptors such as: PD-1, TIM-3, CTLA-4, KLRG-1 and CD57. The aim was to evaluate the expression of PD-1, CTLA-4, KLRG-1, CD57 and TIM-3 receptors in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells. We have shown higher frequencies of PD-1, CTLA-4, CD57, KLRG-1 and TIM-3 in patients with cutaneous leishmaniasis. Simultaneously an increase in the production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and CRP was observed, which directly reflects the microbicidal capacity and inflammation profile of these patients. Our results amplify the knowledge of the characterization of the immune response during leishmaniasis.

Keywords: Leishmaniasis; Cellular Exhaustion; Inhibitory Receptors; PD-1; TIM-3; CTLA-4; KLRG-1; CD57;

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 01. Leishmaniose cutânea e de mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2014.** Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Vigilância. Dados disponíveis em 22 de maio de 2016.....**20**

**Figura 02. A leishmaniose é transmitida pela picada do flebotomíneo fêmea infectado.** Os mosquitos injetam no estágio infeccioso promastigotas a partir da probóscide durante a sucção de sangue (1). As promastigotas que atingem a ferida da punção são fagocitadas pelos macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares (2) As promastigotas transformam-se nas células da fase tecidual do parasita, ou seja, amastigotas (3), que se multiplicam por divisão simples e infectam outras células fagocíticas mononucleares (4). Os mosquitos são infectados ao fazer a ingestão de células infectadas durante alimentação (5,6). Nos mosquitos, as amastigotas se transformam em promastigotas (7). Depois migram para a probóscide do mosquito (8). Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>.....**22**

**Figura 03. A resposta imune durante a infecção na leishmaniose cutânea.** (A) O desenvolvimento de respostas de células T na leishmaniose cutânea ocorre no linfonodo com interações entre células dendríticas e células T CD4<sup>+</sup> específicas contra o parasito. Diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células *Th1* secretoras de IFN- $\gamma$  é promovida pela interleucina IL-12. (B) As células T CD4<sup>+</sup> ativadas específicas para os parasitos migram e acumulam-se no local da infecção. A Produção de IFN-  $\gamma$  pelas células T promovem a indução de iNOS nos fagócitos mononucleares, com subsequente produção de óxido nítrico. (C) As células T CD8<sup>+</sup> nos linfonodos produzem IFN- $\gamma$  que ativam as células dendrítica a produzirem IL-12 necessária na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> *Th1* e supressão de *Th2*. (D) Na pele as células como os monócitos, apresentam antígenos para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> que promovem citotoxicidade mediada por grânulos contra *Leishmania* spp.. As células mortas liberam parasitos e expressam *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPS), o que leva à disseminação do parasita e inflamação severa (Adaptado de: OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015; SCOTT; NOVAIS, 2016).....**25**

**Figura 04. Esquema hipotético da exaustão celular induzida pela presença dos RIs.** Este esquema é baseado na informação disponível sobre PD-1. A exaustão das células T ocorre na presença de uma carga antigênica alta, como na infecção viral crônica ou no câncer. A célula T responde a essa alta carga antigênica ao se diferenciar em células T efetoras na tentativa de eliminar o antígeno. Durante esta resposta, a célula T começa a expressar receptores inibitórios, como PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3. A sinalização através destes receptores interfere na

proliferação celular, na produção de citocinas e na capacidade citotóxica. Os receptores inibitórios interferem na via de *Protein Kinase B* (PKB), como consequência da inibição do *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K), cuja atividade é necessária para a fosforilação da AKT e afeta a transcrição de fatores para transdução de sinais celulares, tais como: *Mammalian Target Of Rapamycin Complex* (mTORC); *Phosphoinositide Dependent Kinase 1* (PDK1), proteína quinase 3 dependente de fosfoinosítídeo (AKBAR; HENSON, 2011).....27

**Figura 05. Receptores Inibitórios e seus ligantes.** Os receptores inibitórios são PD-1, CTLA-4, KLRG-1e TIM-3, e estão relacionados com interações que medeiam a regulação negativa, interferindo na sinalização celular. Alguns RIs têm outras moléculas de ligação, além daquelas exibidas na imagem. Além das interações regulatórias negativas, a interação entre o TCR e o peptídeo – MHC de classe II também é observada, pois é essencial para a função das células T (Adaptado de: <http://www.nature.com/nri/journal/v15/n1/full/nri3790.html>).....28

**Figura 06. Estratégia de Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5.** A e B: Seleção da população de linfócitos, através dos parâmetros de granulosidade versus tamanho. C: Identificação das células vivas e mortas. D: seleção das células com expressão de CD3. E e F: representação das células CD4 e CD8 por meio dos parâmetros tamanho versus fluorescência dos anticorpos marcadores.....38

**Figura 07. Diagnóstico molecular dos pacientes arrolados no estudo.** Eletroforese em gel de agarose (3%). Pacientes infectados com *L. braziliensis* foram identificados com 40pb e 80 pb de peso molecular. Pacientes infectados com *L. amazonensis* foram identificados através de uma banda de 120pb, indicada na figura pela seta vermelha. PM: Peso Molecular: 50pb -250 pb; CTRL (-): baseado em água; CTRL (+): baseado no genoma digerido de *L. braziliensis*; P: paciente.....41

**Figura 08. Avaliação da frequência de T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08) e pacientes com LC (n=11). **A e B:** Análise combinada da análise da frequência total dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B). CTRL: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.....42

**Figura 09. Perfil da expressão de CTLA-4 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08) e pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CTLA-4 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor CTLA-4 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CTLA-4 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor

CTLA-4 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.....43

**Figura 10. Perfil da expressão de PD-1 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08) e pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor PD-1 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor PD-1 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor PD-1 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor PD-1 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\* < 0,0001; \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.....44

**Figura 11. Perfil da expressão de TIM-3 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08); pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor TIM-3 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor TIM-3 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor TIM-3 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor TIM-3 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.....45

**Figura 12. Perfil da expressão de KLRG-1 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08); pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor KLRG-1 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor KLRG-1 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor KLRG-1 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor KLRG-1 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.....46

**Figura 13. Perfil da expressão de CD57 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08); pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CD57 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor CD57 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CD57 na

superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D**: análise da frequência do receptor CD57 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.....**47**

**Figura 14. Perfil inflamatório na produção de IFN-g, TNF-a IL-10 e PCR.** Análise por ELISA no plasma de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=11) e pacientes com LCL (n=30). Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml e mg/dL) e desvio padrão para cada grupo analisado. **A** : Análise de IFN-g. **B**: Análise de TNF-a. **C**: Análise de IL-10. **D**: Análise de Proteína C Reativa (PCR). \* p < 0,05, \*\*\* p <0, 001; CTR: Controle; PCR: Proteína C Reativa; LC: Leishmaniose Cutânea.....**48**

## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 01. Tabela 01. Seleção e caracterização dos indivíduos arrolados no estudo.</b> Caracterização por idade e gênero; Controles: (n=18;) LC (n=33).....	<b>33</b>
<b>Tabela 02. Tabela 02. Painel de Imunofenotipagem.</b> Painel definido para marcação das células T e dos receptores inibitórios.....	<b>36</b>
<b>Tabela 03. Características clínicas dos indivíduos estudados.</b> Um total de 18 controles foram arrolados no estudo e 33 pacientes com LC.....	<b>40</b>
<b>Tabela 04. Pacientes e controles selecionados para imunofenotipagem.</b> Foram arrolados 11 pacientes e 08 controles.....	<b>42</b>



## LISTA DE SIGLAS

AKT	<i>Protein Kinase B</i>
BTLA	<i>B And T Lymphocyte Associated</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD3 <sup>+</sup>	Linfócitos T
CD4 <sup>+</sup>	Linfócitos auxiliares
CD8 <sup>+</sup>	Linfócitos citolíticos
CMV	Citomegalivírus
CTLA-4	<i>Cytotoxic T Lymphocyte-Associated Antigen 4</i>
CTR	Controle
DAMPS	<i>Damage-Associated Molecular Patterns</i>
EBV	<i>Epstein Barr Virus</i>
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immosorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i>
Hae III	<i>Haemophilus aegyptius III</i>
HBV	<i>Hepatitis B Virus</i>
HCV	<i>Hepatitis C Virus</i>
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
IFN	<i>Interferon</i>
IL	Interleucina
iNOS	<i>Inducible Nitric Oxide Synthase</i>
KLRG-1	<i>Receptor Killer-Cell Lectin Like Receptor G1</i>
LAG-3	<i>Lymphocyte-Activation Gene 3</i>
LC	Leishmaniose Cutânea
LCMV	<i>Lymphocytic choriomeningitis Virus</i>
LPG	Lipofosfoglicano
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MAC	<i>Membrane Attack Complex</i>
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MP	Matriz Peritrófica
mTORC	<i>Mammalian Target Of Rapamycin Complex</i>

NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NO	Óxido Nítrico
OCT	<i>Optimal Criopresevation Tissue</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAS	Organização Panamericana de Saúde
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i>
PD-1	<i>Programed Death 1 (PD-1)</i>
PKD-1	<i>Phosphoinositide Dependent Kinase 1</i>
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-Kinase</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RI	Receptor Inibitório
RNS	<i>Reactive Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
TCR	Receptor das Células T
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor Beta</i>
Th	Células T <i>helper</i>
TIM-3	<i>T Cell Immunoglobulin Domain and Mucin Domain Protein 3</i>
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i>

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>19</b>
1.1. ASPECTOS GERAIS	19
1.2. EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	19
1.3. AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	21
1.4. IMUNOPATOGÊNESE NAS LEISHMANIOSES	23
1.5. DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS T: RECEPTORES INIBITÓRIOS DURANTE AS INFECÇÕES	26
1.6. EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS NAS CÉLULAS T NAS LEISHMANIOSES	29
<b>2.0 JUSTIFICATIVA</b>	<b>30</b>
<b>3.0 OBJETIVO GERAL</b>	<b>31</b>
3.1. OBJETIVO ESPECÍFICOS	31
<b>4.0 METODOLOGIA</b>	<b>32</b>
4.1. ASPECTOS ÉTICOS	32
4.2. SELEÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES	32
4.3. MODELO DE ESTUDO	33
4.4. AMOSTRAS DOS PACIENTES	33
4.5. PROCESSAMENTO DA BIÓPSIA	33
4.6. SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	34
4.7. SOROLOGIA	34
4.8. DIAGNÓSTICO MOLECULAR	35
4.9. DOSAGEM DE CITOCINAS	35
4.10. CITOMETRIA DE FLUXO	36
4.11. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
<b>5. RESULTADOS</b>	<b>40</b>
5.1. CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS	40
5.2. AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DA <i>Leishmania braziliensis</i>	40
5.3. PACIENTES APRESENTAM FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T SEMELHANTE A	41

INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS	
5.4.PERFIL DIFERENCIADO NA EXPRESSÃO DE CTLA-4, PD-1, KLRG-1, CD57 E TIM-3 NAS CÉLULAS T CD4 E T CD8 TOTAIS	42
5.5. PERFIL INFLAMATÓRIO COM AUMENTO DE IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C REATIVA	47
<b>6. DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>7. CONCLUSÕES</b>	<b>55</b>
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 ASPECTOS GERAIS

Leishmaniose é um termo utilizado genericamente para definir um complexo de doenças clinicamente diferentes, que tem como agente etiológico várias espécies de protozoários unicelulares digenéticos pertencentes ao reino Protista, à ordem Kinetoplastida, à família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*. Todas as espécies são parasitos intracelulares obrigatórios, infectando preferencialmente células do sistema fagocitário mononuclear de hospedeiros vertebrados, incluindo uma grande variedade de mamíferos, entre eles, roedores, canídeos, edentados, marsupiais, procionídeos, ungulados primitivos, primatas e o homem (ALENCAR et al., 1991).

Em decorrência da interação parasito hospedeiro, a doença apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo classificadas em Leishmaniose Visceral (LV) e Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), sendo que esta última inclui as manifestações clínicas cutâneas (LC) e as mucocutâneas (MC) (MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2013).

A LC é a forma mais encontrada da doença, sendo caracterizada pelo desenvolvimento de lesões ulceradas, únicas ou múltiplas, de bordas elevadas e/ou pápulas granulomatosa na derme que podem cicatrizar de forma espontânea após alguns meses ou anos. Após a cura, cerca de 30% dos pacientes com LC sofrem recidivas com o aparecimento de úlceras semelhantes ao início da doença (REITHINGER et al., 2007; TURETZ et al., 2002)

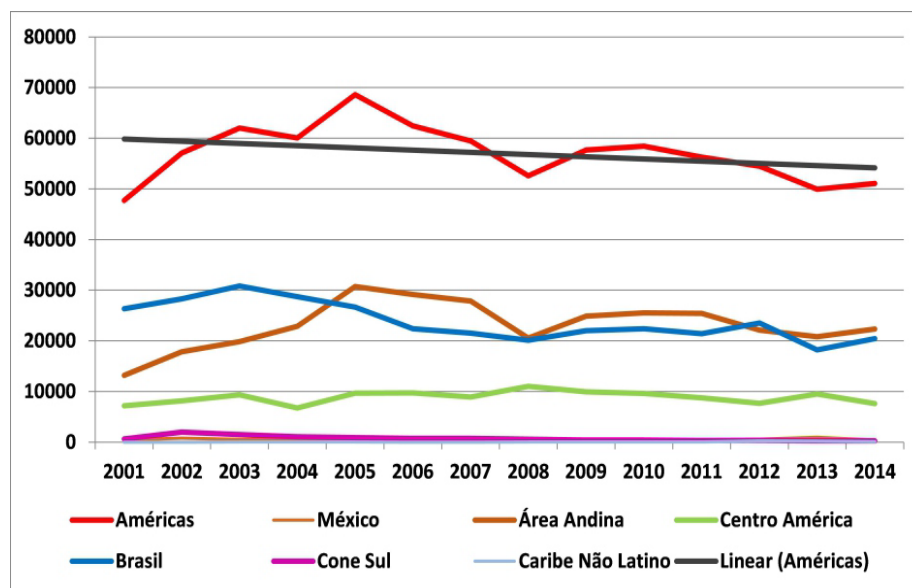
### 1.2 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses estão amplamente distribuídas em 88 países e estima-se que 12 milhões de pessoas estão infectadas e 350 milhões de pessoas estão sob risco de infecção doença (REITHINGER et al., 2007; TURETZ et al., 2002). Fatores como: condições socioeconômicas desfavoráveis, desnutrição, mudanças ambientais, aumento do movimento populacional, condições imunossupressores como a coinfeção com *Human Immunodeficiency Virus* (HIV) e áreas de urbanização rápida, tendem a contribuir para o estabelecimento da doença (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Em 2015, entre os 200 países ou territórios que relataram casos das leishmanioses para a Organização Mundial da Saúde (OMS), 87 (44%) foram considerados endêmicos para LC e 75 (38%) foram considerado endêmicos para a leishmaniose visceral (LV) (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

No período de 2001 a 2014 foram reportados à Organização Panamericana de Saúde (OPAS) e à OMS um total de 797.849 casos novos de Leishmaniose Tegumentar Americana, com média anual de 56.989 casos distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos das Américas (Figura 01)(OPAS\_OMS, 2014).

Do total dos casos reportados neste mesmo período observou-se que 95,84% (47.046) correspondem à forma cutânea e 4,16% (1.953) à forma mucocutânea, sendo que o Brasil (1.016), Bolívia (228) e Peru (343) reportaram os maiores números de casos detectados destas formas clínicas, e juntos representam o total de 81,25% dos casos registrados na Região das Américas(OPAS\_OMS, 2014).



**Figura 01. Leishmaniose cutânea e de mucosa em países endêmicos das Américas, 2001-2014.** Fonte: SisLeish-OPAS/OMS: Dados reportados pelos Programas Nacionais de Leishmanioses/Vigilância. Dados disponíveis em 22 de maio de 2016

No Brasil, casos de leishmanioses foram notificados em todos os Estados, com uma ocorrência média de 20.000 casos durante os anos de 2000 a 2015. A região Norte foi a que mais notificou casos no Brasil durante esse período com um total de 8.939 casos, seguida pelas regiões: Nordeste com 5.152 casos, Centro-Oeste com 2.937, Sudeste com 1.762 e por fim a região Sul com 493 casos (SINAN, 2016).

O Estado do Espírito Santo em 2009 notificou 100 casos de LTA incluindo as formas LC e MC, destes casos 41% foram registrados nos municípios de Brejetuba, Santa Teresa, Domingos Martins e Guarapari, grande parte dos casos (90%) ocorreu em indivíduos maiores de 10 anos e a maioria (65%) eram do sexo masculino (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011).

### 1.3 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

Os vetores transmissores das leishmanioses são divididos nos gêneros: *Phlebotomus*, *Sergentomyi*, *Lutzomyia*, *Brumptomyia*, sendo que os mais comuns são os do gênero *Phlebotomus* e *Lutzomyia* (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017).

A infecção do hospedeiro invertebrado começa quando o flebotomíneo fêmea pica um mamífero infectado durante repasto sanguíneo, ingerindo células infectadas com amastigotas (READY, 2013).

O sangue é digerido no intestino médio abdominal do inseto, sendo que neste novo ambiente as amastigotas são agrupadas, e recobertas pela Matriz Peritrófica (MP) protegendo-as das enzimas digestivas. As amastigotas então, se transformam em uma forma replicativa chamadas de promastigotas procíclicas (PIMENTA et al., 1992; SECUNDINO et al., 2005; TEIXEIRA et al., 2013).

As promastigotas migram para o intestino médio anterior, onde se concentram e reiniciam a divisão celular dando origem à forma da *Leishmania* spp. infectante para o hospedeiro, denominada promastigota metacíclica. As mudanças estruturais geradas nas moléculas de lipofosfoglicano (LPG) ancoradas na membrana extracelular implicam na migração do parasito do intestino em direção à faringe do inseto (DE ARAÚJO et al., 2012; SCHLEIN; JACOBSON; MESSER, 1992).

Conseqüentemente, durante as picadas do inseto, as promastigotas metacíclicas infecciosas que migram para a probóscide são regurgitadas e podem, assim, infectar um novo hospedeiro mamífero, iniciando um novo ciclo do parasito (DA SILVA et al., 2015; READY, 2013).

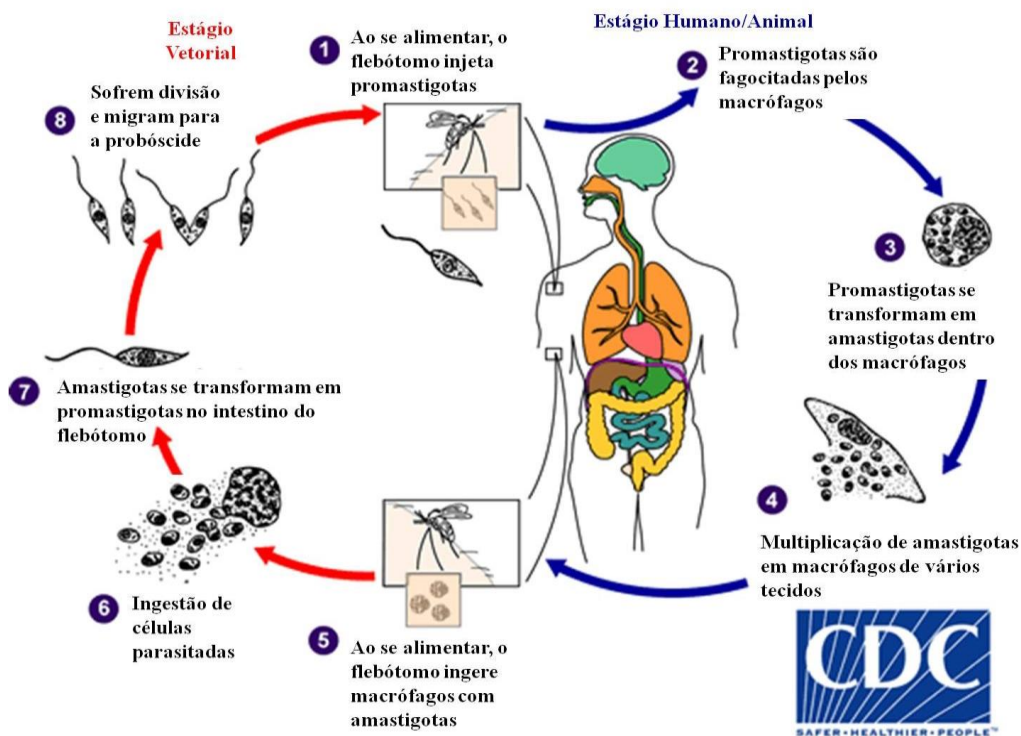
Os parasitos que infectam a pele do mamífero primeiro invadem os neutrófilos, que são rapidamente recrutados para o local e, posteriormente, os macrófagos; no entanto, outros tipos de células, como células de Langerhans e fibroblastos, também podem ser infectadas (PETERS, 2010).

Os parasitos se ligam às células hospedeiras através das moléculas expostas na superfície celular, tais como: LPG e a glicoproteína gp63 (GLUENZ; GINGER;

MCKEAN, 2010; TEIXEIRA et al., 2013; TURCO; DESCOTEAUX, 1992). Essas moléculas se ligam a diferentes receptores encontrados nos macrófagos e outros fagócitos, incluindo os receptores do complemento (CR1 e CR3), receptores de manose e receptores de fibronectina (UENO; WILSON, 2012).

O processo de internalização via fagocitose começa com a formação dos pseudópodes, onde o parasito se liga à superfície dos macrófagos sendo endocitados e albergados no vacúolo parasitóforo, as promastigotas metacíclicas, consecutivamente, se transformam em amastigotas (STUART et al., 2008).

Algumas das amastigotas se aderem à membrana do vacúolo, enquanto outras permanecem livres no vacúolo e começam a proliferar (STUART et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2013). Após uma intensa multiplicação, a membrana dos macrófagos se rompe, liberando as amastigotas no meio extracelular; estas amastigotas podem invadir novos macrófagos ou serem ingeridas por um novo flebotomíneo durante o repasto sanguíneo do vetor (FEIJÓ et al., 2016) (Figura 2).



**Figura 02.** A leishmaniose é transmitida pela picada do flebotomíneo fêmea infectado. Os mosquitos injetam no estágio infeccioso promastigotas a partir da probóscide durante a sucção de sangue (1). As promastigotas que atingem a ferida da punção são fagocitadas pelos macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares (2). As promastigotas transformam-se nas células da fase tecidual do parasita, ou seja, amastigotas (3), que se multiplicam por divisão simples e infectam outras células fagocíticas mononucleares (4). Os mosquitos são infectados ao fazer a ingestão de células infectadas durante alimentação (5,6). Nos mosquitos, as amastigotas se transformam em promastigotas (7). Depois migram para a probóscide do mosquito (8). Fonte: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>



#### 1.4 IMUNOPATOGÊNESE NAS LEISHMANIOSES

As horas que sucedem a picada do flebotomíneo infectado são essenciais para a colonização do parasito nos fagócitos do hospedeiro (ROSSI; FASEL, 2017). Nesse estágio inicial da infecção a *Leishmania* spp. se beneficia das propriedades da saliva dos vetores que possuem características vasodilatadoras, anticoagulantes e efeitos imunomoduladores (ABDELADHIM; KAMHAWI; VALENZUELA, 2014; GOMES et al., 2016; ROGERS; TITUS, 2003; ROHOŠOVÁ; VOLF, 2006; ROSSI; FASEL, 2017).

Embora a *Leishmania* spp. seja principalmente encontrado em neutrófilos durante as primeiras horas da infecção, os parasitos têm como células hospedeiras principais os macrófagos (DE MENEZES; SARAIVA; DA ROCHA-AZEVEDO, 2016).

O mecanismo de ação dos macrófagos consiste em confinar o parasito no fagolisossoma composto com enzimas líticas e pH baixo (ROSSI; FASEL, 2017). A resposta contra leishmania nas primeiras horas após à infecção mais eficaz dos macrófagos é a produção de *Reactive Oxygen Species* (ROS) e *Reactive Nitrogen Species* (RNS), um processo que visa eliminar o patógeno sem danificar a célula hospedeira (ILES; FORMAN, 2002).

Este processo é parcialmente ativado por fagocitose e envolve várias enzimas, dentre as principais produtoras de espécies reativas nos macrófagos encontram-se *NADPH oxidase 2* (NOX2) e *Nitric Oxide Synthase Inducible* (iNOS), que produzem respectivamente, superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e NO (CHANNON; ROBERTS; BLACKWELL, 1984; PANDAY et al., 2015; ROSSI; FASEL, 2017).

Para que haja o estabelecimento da infecção no hospedeiro é necessário que a *Leishmania* spp. sobreviva ao processo de fagocitose e resista à acidez no fagolisossoma. Entretanto, algumas moléculas expressas na membrana da *Leishmania* spp. em suas formas promastigota e amastigota parecem contribuir para a sua sobrevivência dentro do fagolisossoma, tais como LPG, gp63, glicoinositol de fosfolipídio (BOGDAN, 2000).

Em torno de aproximadamente 3 semanas, uma onda inflamatória com influxo de neutrófilos, macrófagos e, mais tarde, células dendríticas podem ser observadas no curso da infecção, onde as células dendríticas irão ativar as células T, ativando assim a resposta imunológica adaptativa contra a *Leishmania* spp. (BRANDONISIO; SPINELLI; PEPE, 2004; FEIJÓ et al., 2016; LIU; UZONNA, 2012; SOONG, 2008).

Tanto os macrófagos como as células dendríticas após internalização por endocitose ou fagocitose do parasito, são capazes de processar e apresentar os antígenos através das moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC) I e II para as células T (BRANDONISIO; SPINELLI; PEPE, 2004).

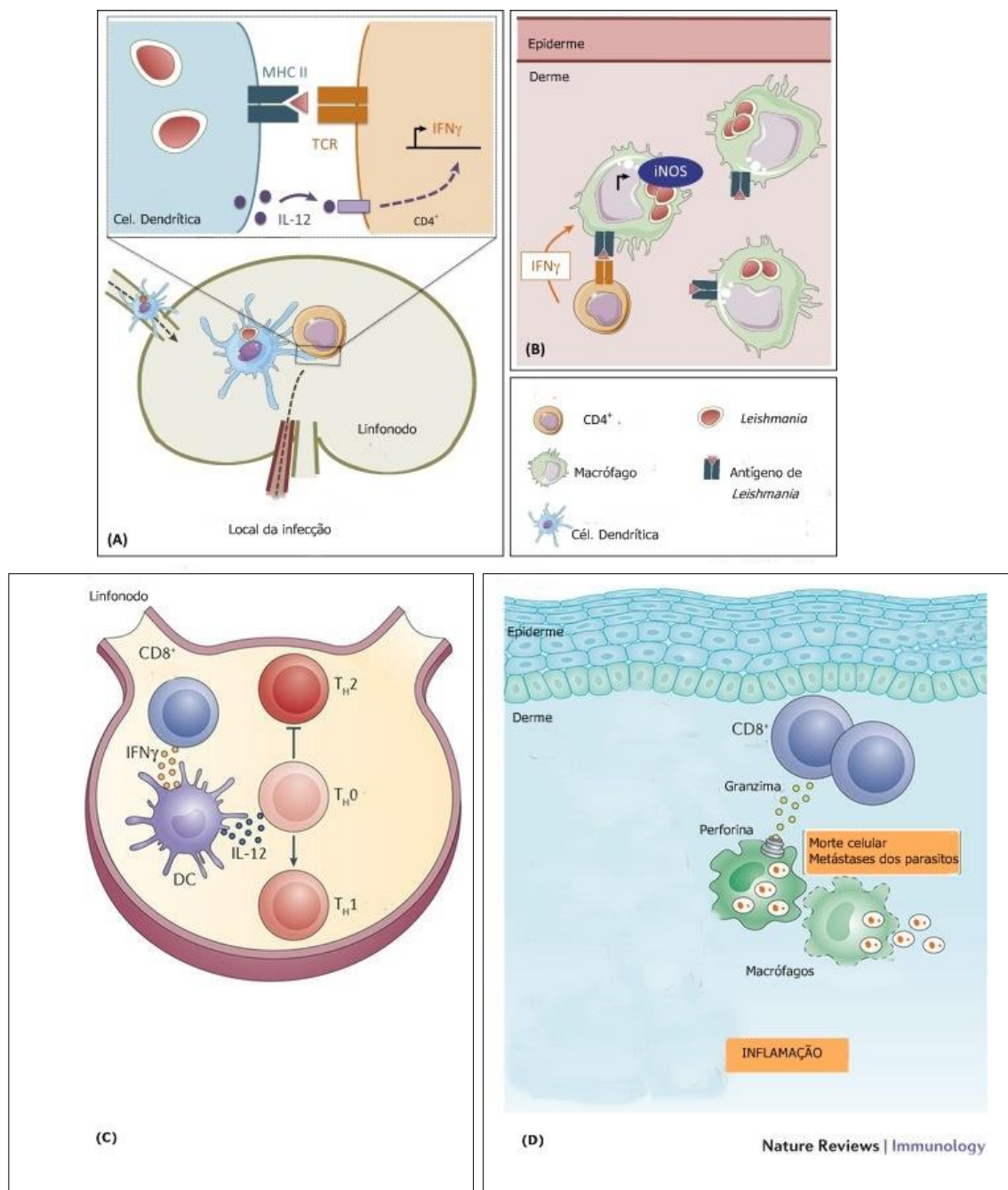
A produção de Interleucina (IL)-12 pelos fagócitos mononucleares (GORAK *et al*, 1998) e a apresentação deste para a população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> levam as células T CD4<sup>+</sup> a se diferenciarem em subpopulações linfocitárias - linfócitos Th1 e linfócitos Th2 (MOSMANN *et al*, 1986) (figura 03. A).

As células T CD4 *helper* (Th) induzem efeitos opostos associados com cura ou agravamento da doença, dependendo do perfil de citocinas produzidas. Já as células T CD8<sup>+</sup> também parecem desenvolver um papel importante no processo de cura nas leishmanioses experimentais, seja pela modulação da atividade de células T CD4<sup>+</sup>, ou pelo efeito citolítico direto em macrófagos infectados. Em resposta ao estímulo com antígenos de *Leishmania* spp., essas células proliferam em números significativos (Figura 03. C e D) (DE MOURA et al., 2007).

As células T CD4<sup>+</sup> Th1 são as principais fontes secretoras IL-2, *Tumor Necrosis Factor Alfa* (TNF- $\alpha$ ) and *Interferon Gamma* (IFN- $\gamma$ ), responsáveis pela ativação, diferenciação e proliferação das células responsáveis pela resposta adaptativa celular (CHER & MOSMANN, 1987), enquanto que as células T CD4<sup>+</sup> Th2 secretam IL-4, IL-5, IL-10 e *Transforming Growth Factor Beta* (TGF- $\beta$ ) fornecendo suporte à resposta humoral mediada por anticorpos (COFFMAN *et al*, 1988; BARCELLAR *et al*, 2000). O perfil de citocinas gerado a partir da resposta mediada por células T é fundamental para o direcionamento da susceptibilidade ou resistência do hospedeiro ao parasito (SCOTT *et al*, 1988).

As respostas imunológicas com a participação das células T CD4<sup>+</sup> Th1 com produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  são importantes na prevenção do crescimento de agentes

patogênicos intracelulares e controlam a disseminação de infecções intracelulares como as ocasionadas pela *Leishmania* spp., bem como são responsáveis pela formação das lesões (Figura 03. B) (DE MOURA et al., 2007; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016a; REITHINGER et al., 2007; RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998).



**Figura 03. A resposta imune durante a infecção na leishmaniose cutânea.** (A) O desenvolvimento de respostas de células T na leishmaniose cutânea ocorre no linfonodo com interações entre células dendríticas e células T CD4<sup>+</sup> específicas contra o parasito. Diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> em células *Th1* secretoras de IFN- $\gamma$  é promovida pela interleucina IL-12. (B) As células T CD4<sup>+</sup> ativadas específicas para os parasitos migram e acumulam-se no local da infecção. A Produção de IFN- $\gamma$  pelas células T

promovem a indução de iNOS nos fagócitos mononucleares, com subsequente produção de óxido nítrico. (C) As células T CD8<sup>+</sup> nos linfonodos produzem IFN- $\gamma$  que ativam as células dendríticas a produzirem IL-12 necessária na diferenciação de células T CD4<sup>+</sup> *Th1* e supressão de *Th2*. (D) Na pele as células como os monócitos, apresentam antígenos para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> que promovem citotoxicidade mediada por grânulos contra *Leishmania* spp.. As células mortas liberam parasitos e expressam *Damage-Associated Molecular Patterns* (DAMPs), o que leva à disseminação do parasita e inflamação severa (Adaptado de: OLEKHNOVITCH; BOUSSO, 2015; SCOTT; NOVAIS, 2016).

O curso do perfil da resposta imunológica, combinado com a espécie de *Leishmania* são fatores essenciais para a determinação da forma clínica da doença. Estudos demonstraram que pacientes com leishmaniose cutânea devido à infecção por *L. braziliensis* apresentam uma forte resposta das células T, caracterizada por uma alta resposta proliferativa de linfócitos a antígenos de *Leishmania* spp. e produção de IFN- $\gamma$  (TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Apesar do papel protetor e de ativação dos mecanismos imunológicos mediados pela produção de algumas citocinas, também há uma correlação positiva entre o tamanho da lesão com os níveis de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ . Sendo que os pacientes com as maiores lesões, apresentam os níveis mais elevados de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016a; SANTOS et al., 2013).

Estudos demonstraram que nas infecções causadas por *L. braziliensis* a maioria das células T CD8<sup>+</sup> nas lesões cutâneas tinham características citotóxicas e a frequência dos grânulos granzima B correlacionava-se positivamente com o tamanho da lesão nos pacientes (DA SILVA SANTOS et al., 2015; FARIA et al., 2010; SANTOS et al., 2013).

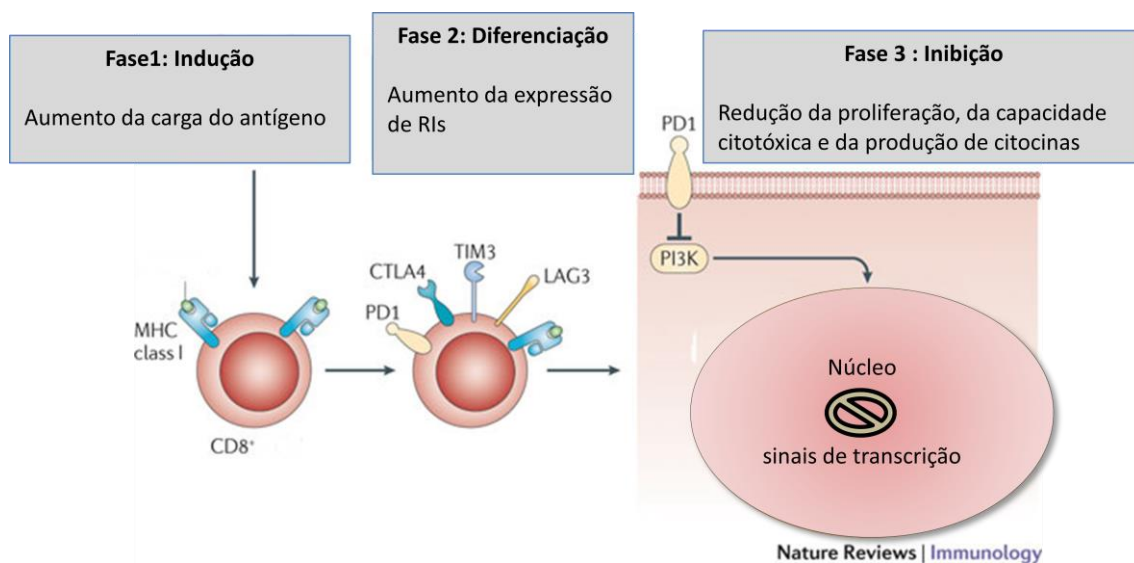
## 1.5 DISFUNÇÃO DAS CÉLULAS T: RECEPTORES INIBITÓRIOS DURANTE AS INFECÇÕES

De maneira geral os Receptores Inibitórios (RIs) estão relacionados à supressão ou bloqueio das respostas imunológicas. Os RIs podem inibir as funções das células T em vários níveis: (i) através da competição da ligação a receptores co-estimuladores; (ii) interferência nos sinais ativadores e nos Receptores de Células T (TCRs); e (iii) aumentando a regulação de genes que estão envolvidos na disfunção das células T (FUERTES MARRACO et al., 2015). Na ausência de processos patológicos, a expressão dos RIs são fisiologicamente associada a regulação das células T. Em um ambiente de homeostase as moléculas co-estimuladoras e inibitórias formam um

sistema de sinais positivos e negativos que regulam a estimulação do TCR (WHERRY, 2011).

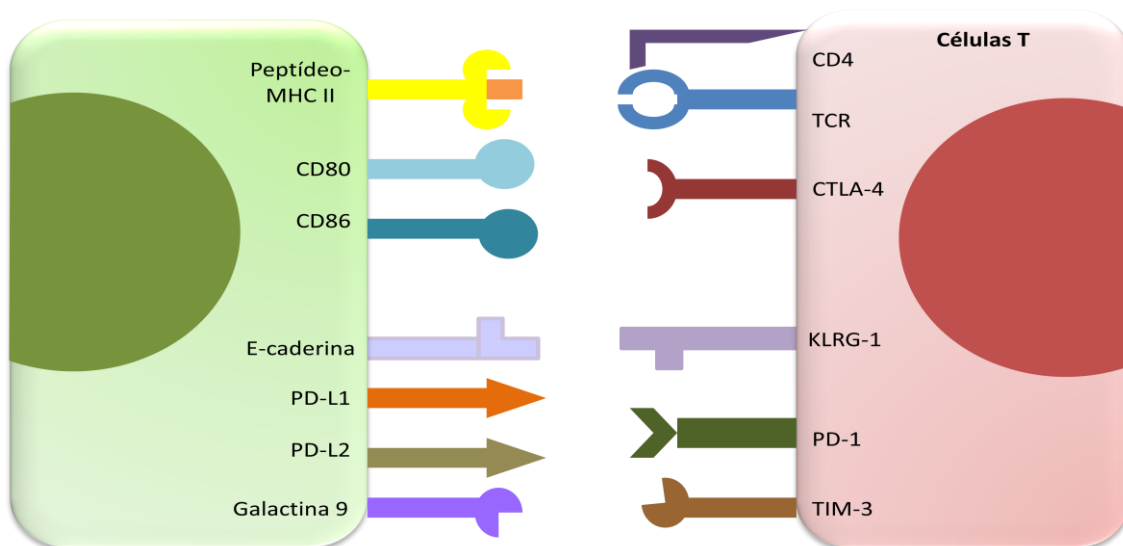
Alguns exemplos de RIs são: *B and T lymphocyte associated* (BTLA), *Lymphocyte-Activation Gene 3* (LAG-3), *Programed Death 1* (PD-1), *T-Cell Immunoglobulin and Mucin-Domain Containing-3* (TIM-3), *Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Antigen 4* (CTLA-4), *Receptor Killer-Cell Lectin Like Receptor G1* (KLRG-1) e CD57 (FUERTES MARRACO et al., 2015; NIELSEN et al., 2013; WHERRY, 2011).

Nas infecções crônicas e agudas a expressão de RIs nas células T vêm sendo correlacionados a perda progressiva de suas funções efetoras e susceptibilidade a apoptose, levando ao fenômeno conhecido como exaustão celular (Figura 04) (BLACKBURN et al., 2009; FUERTES MARRACO et al., 2015).



**Figura 04. Esquema hipotético da exaustão celular induzida pela presença dos RIs.** Este esquema é baseado na informação disponível sobre PD-1. A exaustão das células T ocorre na presença de uma carga antigênica alta, como na infecção viral crônica ou no câncer. A célula T responde a essa alta carga antigênica ao se diferenciar em células T efetoras na tentativa de eliminar o antígeno. Durante esta resposta, a célula T começa a expressar receptores inibitórios, como PD-1, CTLA-4, TIM-3 e LAG-3. A sinalização através destes receptores interfere na proliferação celular, na produção de citocinas e na capacidade citotóxica. Os receptores inibitórios interferem na via de *Protein Kinase B* (PKB), como consequência da inibição do *Phosphoinositide 3-Kinase* (PI3K), cuja atividade é necessária para a fosforilação da AKT e afeta a transcrição de fatores para transdução de sinais celulares, tais como: *Mammalian Target Of Rapamycin Complex* (mTORC); *Phosphoinositide Dependent Kinase 1* (PDK1), proteína quinase 3 dependente de fosfoinositídeo (AKBAR; HENSON, 2011).

A expressão dos RIs nas células T e a interação de seus ligantes em diversos estudos demonstraram ter um impacto modulador negativo durante as infecções crônicas (Figura 05). Este papel modulador interfere desde uma resposta efetora das células T antígeno-específicas a uma combinação de fatores, como associação na produção de citocinas pró-inflamatórias, que acabam por gerar insucesso/falha da resposta imunológica e agravamento das lesões teciduais (ADEKAMBI et al., 2012; ALBAREDA et al., 2006; ANTROBUS et al., 2005; BLACKBURN; WHERRY, 2007; HORNE-DEBETS et al., 2013; KAMATA et al., 2016; KEE et al., 2012; NAKAMOTO et al., 2009; SCHLOTSMANN et al., 2000; ZUMLA et al., 2015)



**Figura 05. Receptores Inibitórios e seus ligantes.** Os receptores inibitórios são PD-1, CTLA-4, KLRG-1e TIM-3, e estão relacionados com interações que medeiam a regulação negativa, interferindo na sinalização celular. Alguns RIs têm outras moléculas de ligação, além daquelas exibidas na imagem. Além das interações regulatórias negativas, a interação entre o TCR e o peptídeo – MHC de classe II também é observada, pois é essencial para a função das células T (Adaptado de: <http://www.nature.com/nri/journal/v15/n1/full/nri3790.html>).

Durante os últimos anos vários estudos em modelos animais e humanos correlacionaram a expressão de RIs tais como: PD-1, CTLA-4, TIM-3, LAG3, CD160, BTLA e 2B4 como marcadores da exaustão nas células T em infecções crônicas incluindo: Vírus da Imunodeficiência Humana, Vírus da Coriomeningite Linfocítica, Adenovírus, Vírus da Hepatite B em camundongo e Vírus da Hepatite C, Febre Amarela, Citomegalovírus, Vírus Epstein-Barr, malária, bem como doenças auto-imunes, como lúpus eritematoso sistêmico e em vários tipos de câncer (AKHMETZYANOVA et al., 2015; ANTOINE et al., 2012; MASPI; ABDOLI;

GHAFFARIFAR, 2016b; MUYANJA et al., 2014; NIELSEN et al., 2013; VELU et al., 2015; YI; COX; ZAJAC, 2010).

## 1.6 EXPRESSÃO DE RECEPTORES INIBITÓRIOS NAS CÉLULAS T NAS LEISHMANIOSES

As infecções crônicas estão sendo continuamente relacionadas à expressão de diversos receptores inibitórios, que acabam por interferir na eficácia da resposta imunológica do hospedeiro e, por conseguinte aumentam a sobrevivência dos parasitos através da prevenção da resposta T efetora (GANNAVARAM et al., 2016).

Assim como em outras doenças crônicas, durante as leishmanioses ocorre aumento na expressão de PD-1 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, este aumento é associado com a progressão da doença (ESCH et al., 2014; MOU et al., 2013). Além disso, a expressão deste receptor nas células T CD8<sup>+</sup>, parece estar associada à suscetibilidade a infecção por *Leishmania donovani* e também *Leishmania mexicana* em humanos e camundongos (JOSHI et al., 2009; LIANG et al., 2006; RUIZ; BECKER, 2007).

Indivíduos que apresentam leishmaniose cutânea difusa causada por *L. mexicana* possuem um número reduzido de células T CD8<sup>+</sup> com baixa capacidade proliferativa e redução da produção de citocinas (IL-2 e IFN- $\gamma$ ) (GIGLEY et al., 2012).

Ademais na leishmaniose visceral durante a infecção murina por *L. donovani* as células T CD8<sup>+</sup>, apresentam um fenótipo anérgico ou exausto, como indicado pela alta expressão de CTLA-4, PD-1 e IL-10, o que vem sendo relacionado com a baixa capacidade efetora e com o aumento da carga parasitária e redução da produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , granzima B e IL-2 durante a leishmaniose visceral (DAYAKAR et al., 2017; RODRIGUES et al., 2014).

A expressão do receptor CTLA-4 está relacionada com respostas T CD4<sup>+</sup> Th2 e com a progressão da doença durante a infecção murina por *L. donovani*, com uma crescente produção de IL-4 e contribuição da resposta humoral favorecendo o patógeno (HEINZEL; MAIER JR, 1999).

Em suma, os dados desses estudos sugerem que a expressão de receptores inibitórios nas células T podem ocorrer durante as diferentes infecções pela *Leishmania* spp. e os dados são consistentes com outras infecções crônicas, sendo responsável pela exacerbação da infecção no hospedeiro.

## 2 JUSTIFICATIVA

Apesar da expressão de receptores inibitórios na superfície das células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> ser objeto de estudos durante as doenças infecciosas, relacionados a imunopatogênese e terapias alternativas, pouco se sabe sobre a expressão dos receptores inibitórios nas leishmnioses.

Assim sendo, nosso estudo irá fornecer dados importantes na compreensão do perfil da expressão dos receptores inibitórios nas células T na LC causada por *L. braziliensis*. Possibilitando caracterizar o perfil da resposta imunológica e do processo inflamatório durante a doença.



### 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil dos receptores inibitórios nas células T em pacientes portadores da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

#### 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão dos receptores inibitórios CTLA-4, PD-1, TIM-3, KLRG-1 e CD57 nas populações de células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> do sangue periférico de pacientes com Leishmaniose cutânea (LC);
- Avaliar o perfil inflamatório no soro dos pacientes portadores de LC através da dosagem das citocinas: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e a Proteína C Reativa.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 ASPECTOS ÉTICOS DO ESTUDO

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) – UFES, sob o registro de número 33025214.5.0000.5071. Os participantes do projeto, incluindo os pacientes e controles, foram informados sobre os objetivos e metodologia do projeto, bem como assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido, como autorização para os procedimentos necessários para execução do projeto de pesquisa. As amostras de sangue e pele foram recolhidas por indivíduos qualificados e todos os dados pessoais serão mantidos em sigilo de acordo com a prática habitual.

### 4.2 SELEÇÃO DOS PACIENTES E CONTROLES

Os pacientes elegíveis para participar do projeto de pesquisa somaram um total de 35 indivíduos que tinham diagnóstico confirmado de Leishmaniose Tegumentar Americana na forma clínica cutânea (Tabela 1), atendidos no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). Os critérios de inclusão foram:

Pacientes com:

- Mais de 18 anos de idade;
- Não ser portador do vírus HIV, Hepatite B ou C, CMV, ou possuir qualquer outra doença crônica imunossupressora;
- Aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Possuir leishmaniose cutânea, causada por *L. braziliensis*, e não ter iniciado o tratamento.

Para compor o grupo controle foram selecionados 18 indivíduos saudáveis que não apresentavam leishmanioses e que não estavam acometidos por quaisquer tipos de doenças crônicas infecciosas e imunossupressoras, sendo estes voluntários e com assinatura do Termo de Consentimento Livre Esclarecido.

**Tabela 01. Seleção e caracterização dos indivíduos arrolados no estudo.** Caracterização por idade e gênero; Controles: (n=18); LC (n=33).

<b>Idade (anos)</b>	<b>Controles</b>	<b>LC</b>
18-29	72%	34%
30-39	11%	18%
40-59	17%	39%
Acima de 60		9%
<b>Gênero</b>		
Feminino	39%	24%
Masculino	61%	76%

LC: Leishmaniose Cutânea

#### 4.3 MODELO DO ESTUDO

O presente trabalho constitui parte de um estudo descritivo da expressão de receptores inibitórios nas células T em pacientes com LC. O projeto foi conduzido no laboratório de Imunobiologia Professor Fausto Edmundo Lima Pereira do Núcleo de Doenças Infecciosas/ Núcleo de Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

#### 4.4 AMOSTRAS DOS PACIENTES

Os fragmentos de biópsia (6-8 mm) das lesões e as alíquotas de sangue (40 mL) de pacientes com leishmaniose cutânea, atendidos no ambulatório de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) foram gentilmente cedidas pelo Professor Aloísio Falqueto, membro do Departamento de Medicina Social da UFES.

#### 4.5 PROCESSAMENTO DA BIÓPSIA

Durante o processamento da biópsia, os cortes teciduais foram feitos de forma a conservar a epiderme do paciente com “punches” correspondentes a 6-8 mm. A biópsia inicialmente foi lavada com tampão fosfato salina (PBS) à temperatura ambiente. Em sequência, fragmento de tecido foi retirado e armazenado no ultracongelador -80°C para posterior extração de material genético e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para

confirmação da espécie do parasito. A parte maior do tecido foi inserida em Tissue-Tek O.C.T. (Optimal Criopreservation tissues) de forma que epiderme e derme ficassem orientadas para a porção inferior do recipiente de aproximadamente 3x3cm<sup>3</sup>. Posteriormente, o recipiente contendo o fragmento de tecido e o O.C.T. foi colocado por 2-3 min em nitrogênio líquido para congelamento imediato. Em seguida, o material foi transferido para o ultracongelador na temperatura de - 80°C.

#### 4.6 SEPARAÇÃO DAS CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Inicialmente o sangue do sangue periférico foi centrifugado a 300 g/10min para separação do plasma, onde 1mL foi armazenada no congelador a -20°C, para posterior utilização. As células mononucleares do sangue periférico foram isoladas através do método de separação em gradiente de Ficoll-paque®. As amostras de sangue periférico foram individualmente transferidas para um tubo cônico graduado de 50 mL e diluído (1:1) em tampão fosfato salina. Posteriormente, 30mL do sangue diluído foram gentilmente adicionados a 20 mL de Ficoll-paque TM PLUS (GE Healthcare®). Os tubos foram centrifugados a 580g/20 min, sem freio e sem aceleração, à temperatura ambiente. Após a centrifugação, a camada de células mononucleares (“buffy coat”ou anel) foram retiradas, e transferidas para um novo tubo de 50mL. As células foram lavadas por duas vezes com PBS a 580g/10min e 300 g/10min. Por fim, as células foram contadas em hemocitômetro e congeladas em nitrogênio líquido.

#### 4.7 SOROLOGIA

Para a elegibilidade dos indivíduos arrolados no presente estudo, que excluía pacientes com outras doenças crônicas, o soro ou plasma de todos os voluntários foram testados a partir dos seguintes testes rápidos: ImunoRápido® - Wama (Vírus da Hepatite C), VIKIA® HBsAg – BioMérieux (Vírus da Hepatite B), Rapid-Check® HIV1 e 2 – NDI (Vírus da Imunodeficiência Humana 1 e 2) e Onsite (Citomegalovírus). Os testes foram realizados de acordo com as instruções dos fabricantes.

#### 4.8 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Para o diagnóstico molecular através de PCR-RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), foram utilizados fragmentos de tecidos cutâneos retirados dos 35 pacientes com suspeita de LC. O DNA da pele dos indivíduos foi extraído, utilizando-se o sistema comercial HiPurA™ Multi-Sample DNA Purification, segundo instrução do fabricante.

Após a extração do DNA, o material foi amplificado por PCR para posterior confirmação da presença do parasito *L. braziliensis*. Para isto, foram utilizados de 1 a 5 ng de DNA e adicionados: Tampão (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), mix dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (200mM) (Invitrogen®), MgCl<sub>2</sub> (1,5mM) (Invitrogen®), *primer* RFLP (Forward (150): GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA)(10mM), *Oligo* RFLP 2 Reverse:(152)(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C) (1mM), Taq DNA (1,5U) (Invitrogen®) e água ultra pura. Os ciclos para amplificação do DNA da *Leishmania* sp. foram: 1 ciclo a 95°C por 5 min, 95° por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72° por 30 seg (34 ciclos) e 60°C por 30 seg, 72°C por 5 min.

Para a digestão dos amplicons, utilizou-se enzima de restrição HAE III (1U) (SibEnzime®) seguindo instrução do fabricante. As amostras foram incubadas por 18h a 37°C. Após digestão, foi realizada a eletroforese em gel de agarose (3%) para a identificação da espécie de *Leishmania braziliensis* (40 pb e 80 pb).

#### 4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

Ensaio imunoenzimático de captura (ELISA) foram utilizados para mensurar a concentração de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL10 e Proteína C Reativa presente no sobrenadante *ex vivo* do plasma armazenado no congelador a -20°C. O plasma foi descongelado em banho-maria a 37°C por 15 min. Utilizando pares de anticorpos monoclonais de captura e de revelação biotinizados da eBioscience®, seguindo a recomendação do fabricante. Em síntese, placas de 96 poços de alta absorção (Costar®) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (18 horas/25°C). Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS1X/Tween 20 (0,05%) e as amostras de sobrenadante de cultura foram adicionadas a elas e incubadas por 2 horas/25°C. As placas foram lavadas novamente e incubadas com o anticorpo biotinizado por 1 hora/25°C. As placas foram lavadas, seguido de

adição e incubação com estreptoavidina marcada com peroxidase (eBioscience®) por 30 min/25°C. As amostras foram reveladas com adição de solução tampão citrato de fosfato com 5% de ABTS e 0,005% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 30 volumens e a reação interrompida com dodecil sulfato de sódio (Gibco®) 1%. A absorbância foi determinada no comprimento de onda de 405 nm. (SpectraMax, Molecular Devices).

#### 4.10 CITOMETRIA DE FLUXO

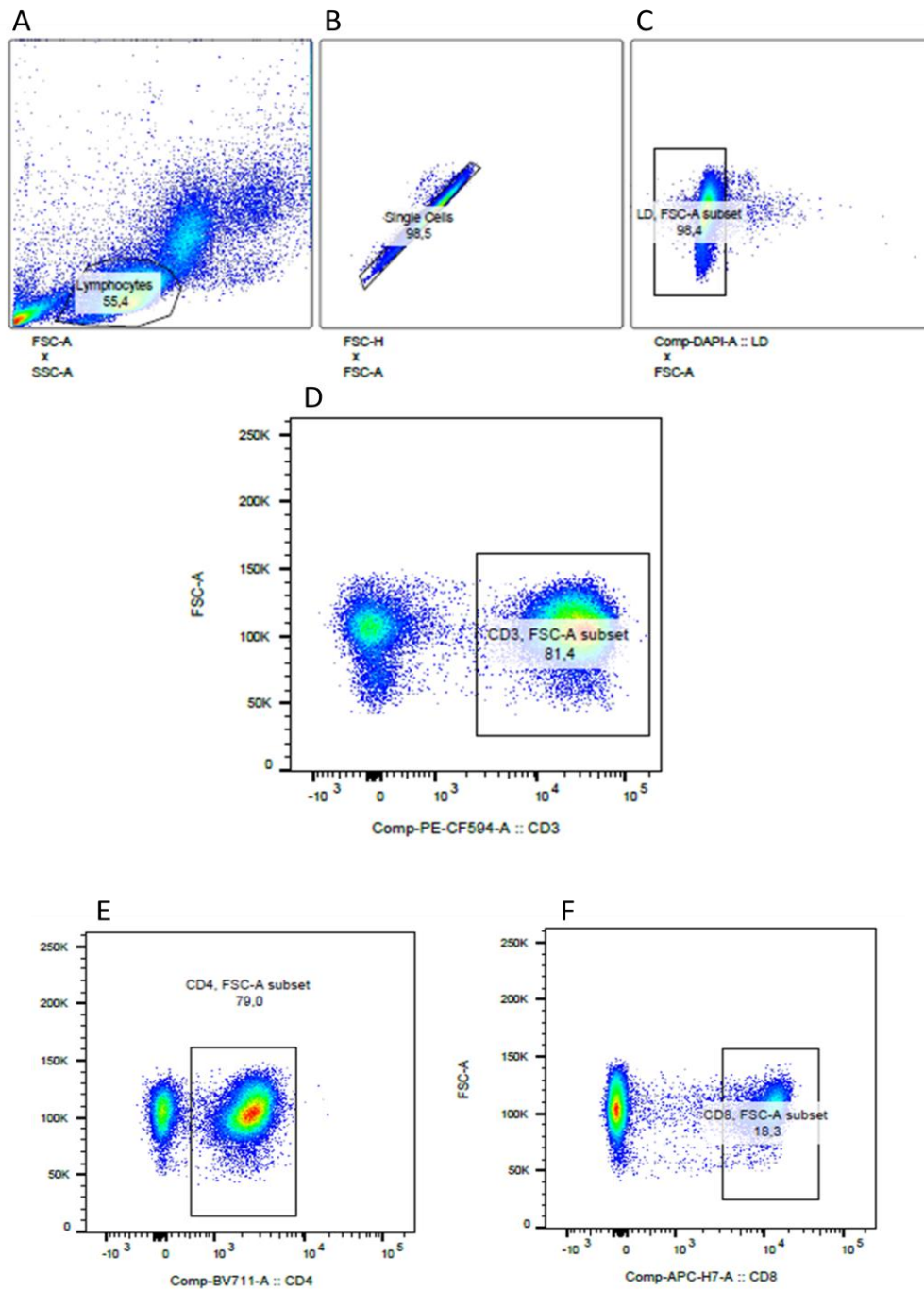
As células mononucleares do sangue periférico isoladas de pacientes foram utilizadas para os experimentos de fenotipagem. Para a análise, por citometria de fluxo, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo cônico e centrifugadas a 400 g/7min. Após este período, as células foram ressuspendidas em 200ul de solução tampão FACS (FACS buffer - 0,5 % (v/v) BSA - albumina do soro bovino - e 0,05 % (g/L) azida sódica - NaN<sub>3</sub> em PBS) (BD Biosciences®) e novamente centrifugadas. Posteriormente, as células foram incubadas, por 30 min no gelo com os anticorpos extracelulares conforme tabela 2. A análise das características fenotípicas da população estudada foi realizada através dos parâmetros de tamanho (FSC - Foward Scatter), granulosidade (SSC – Side Scatter) e intensidade de fluorescência e frequência dos anticorpos marcados e a aquisição das células foi realizado no citômetro LSR Fortessa X-20 com apoio do grupo de pesquisa na *University College London* na divisão de Infecção e Imunidade.

**Tabela 02. Painel de Imunofenotipagem.** Painel definido para marcação das células T e dos receptores inibitórios

ANTICORPO	FLUORÓFORO	CLONE	MARCA
CD3	PE-CF594	UCHT1	BD
CD4	BV-711	OKT4	Biolegend
CD8	APC-H7	SK1	BD
PD-1	PerCP Cy 5.5	EH12.2H7	Biolegend
TIM-3	PE	F38.2E2	Biolegend
CTLA-4	BV-605	BN13	Biolegend
CD57	Alexa Flour 421	NK-1	BD
KLRG-1	APC	2F1	Biolegend
LIVE/DEAD UV	Blue Fixable Stain	-	ThermoFisher

Baseado no painel acima, a figura 6 ilustra o processo de análise das amostras estudadas, de acordo com os parâmetros acima citados. Primeiramente foi determinada a população de linfócitos T, com base no tamanho e granulosidade (Figura A). A partir da seleção dessa população (Figura B), foram separadas as células vivas e mortas,

identificados pelo tamanho celular e da viabilidade celular das células fixadas *Dihidroclorato de 4',6-diamidino-2-fenilindole* (DAPI) (Figura C). Em seguida, foram identificadas as células que expressavam CD3, baseadas no tamanho e expressão do receptor na superfície celular (Figura D). Posteriormente, a população de células CD4 (Figura E) e CD8 (Figura F) foram definidas para posterior análise dos receptores inibitórios, objetos de estudo neste trabalho. Controles de fluorescência menos um (FMO) foram utilizados para determinar os quadrantes e a expressão dos RI.



**Figura 06. Estratégia de Representação do processo de análise das amostras estudadas por citometria de fluxo através do programa FLOWJO 7.6.5.** A e B: Seleção da população de linfócitos, através dos parâmetros de granulidade versus tamanho. C: Identificação das células vivas e mortas. D: seleção das células com expressão de CD3. E e F: representação das células CD4 e CD8 por meio dos parâmetros tamanho versus fluorescência dos anticorpos marcadores.

#### 4.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as análises comparativas dos dados obtidos nas análises da expressão dos marcadores de superfície nas células T as amostras foram determinadas como não



pareadas. Os testes não paramétricos utilizados foram Kruskal Wallis e Mann-Whitney, e os testes paramétricos foram: Teste T de Student, com correção de Bonferroni e Turkey, respectivamente. Os intervalos de confiança foram de 95% e o nível de significância para  $p < 0,05$ .

## 5 RESULTADOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DOS INDIVÍDUOS ESTUDADOS

Para caracterizar os indivíduos arrolados no estudo, foram estabelecidos critérios como: gênero, idade, duração da doença, número de lesões e tamanho das lesões para os pacientes e controles, quando aplicável. Foi observado que a maioria dos pacientes eram do sexo masculino (76%), com idade entre 18-65 anos. O número de lesões variavam entre 1 a 5, sendo a média de aproximadamente 2 lesões por paciente. O tamanho das lesões variavam entre 100 a 800 mm<sup>2</sup>, com uma média de 410.60 mm<sup>2</sup> por paciente. Além disso, a duração da doença, desde o aparecimento da lesão até o início do tratamento se alocava de 30 a 120 dias nos pacientes portadores de LC, com uma média variável de 72 dias. Assim como os pacientes, a maioria dos indivíduos saudáveis eram do gênero masculino (61%) e tinham entre 20-58 anos (Tabela 3).

**Tabela 03. Características clínicas dos indivíduos estudados.** Um total de 18 controles foram arrolados no estudo e 33 pacientes com LC

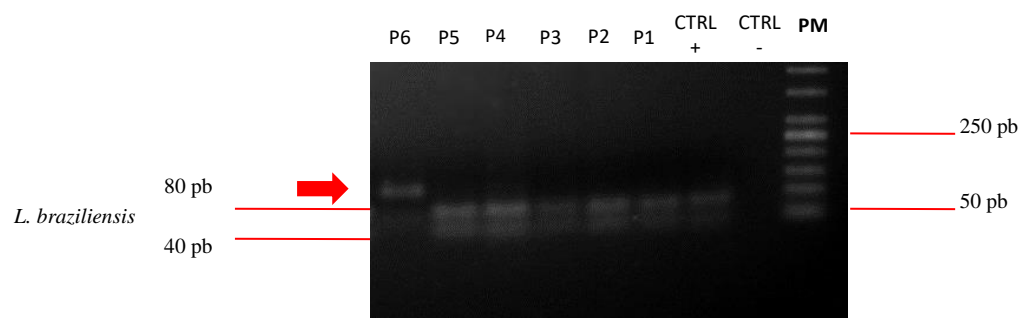
CARACTERÍSTICAS	CTR		PACIENTE	
			LC	
	Média +/- DP	Faixa	Média +/- DP	Faixa
<b>Gênero (F/M)</b>	07/11	NA	08 /25	NA
<b>Idade</b>	29.5 +/-10.76	18 – 58	40.18 +/- 17.21	18 - 65
<b>Duração da doença (dias)</b>	NA	NA	71.21 +/- 35.81	30 - 120
<b>Número de lesões</b>	NA	NA	1.63 +/- 1.02	01 - 05
<b>Tamanho das lesões (mm<sup>2</sup>)</b>	NA	NA	410.60 +/- 201.07	100-800

DP: Desvio Padrão; NA: Não se aplica; CRT: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

### 6.2 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE *Leishmania braziliensis*

Muitos métodos moleculares baseados em PCR vêm sendo utilizados para diagnósticos e identificação das espécies de *Leishmania*. Tendo em vista que outro parasito do gênero *Leishmania* pode causar a LC e que este seria um fator excludente na seleção dos pacientes, 35 fragmentos de biópsias de pacientes com suspeita de LC foram submetidos à PCR-RFLP. Do total de biópsias analisadas, 33 foram positivas para espécie de *L. braziliensis*, conforme observado pelo padrão de pares de base

40pb+80pb (Figura 7). Dois pacientes tiveram confirmação para *L. amazonensis*, identificados através do padrão de pares de bases 60pb+60pb, e foram excluídos do trabalho.



**Figura 07. Diagnóstico molecular dos pacientes arrolados no estudo.** Eletroforese em gel de agarose (3%). Pacientes infectados com *L. braziliensis* foram identificados com 40pb e 80 pb de peso molecular. Pacientes infectados com *L. amazonensis* foram identificados através de uma banda de 120pb, indicada na figura pela seta vermelha. PM: Peso Molecular: 50pb -250 pb; CTRL (-): baseado em água; CTRL (+): baseado no genoma digerido de *L. braziliensis*; P: paciente.

### 5.3 PACIENTES APRESENTAM FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T SEMELHANTE A INDIVÍDUOS SAUDÁVEIS

As células mononucleares do sangue periférico isoladas dos grupos de pacientes e controles foram marcadas de acordo com o protocolo de citometria mencionado anteriormente. Foram selecionados 11 pacientes e 08 controles com o objetivo de identificar as populações totais dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> e a frequência em cada grupo analisado (Tabela 4).

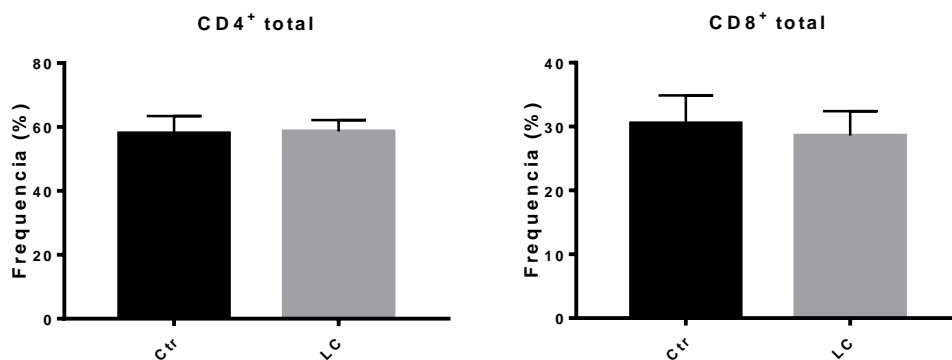
Do total de pacientes, 08 eram do gênero masculino e 03 eram do feminino. A idade variava entre 18 e 45 anos de idade. No grupo dos controles 05 eram do gênero masculino e 03 eram do feminino. A idade nos controles variava entre 20 e 54 anos de idade.

**Tabela 04. Pacientes e controles selecionados para imunofenotipagem.** Foram arrolados 11 pacientes e 08 controles.

Identificação	Genêro	Idade
P1	M	44
P2	F	45
P3	M	18
P4	F	22
P5	M	26
P6	M	43
P7	M	36
P8	F	35
P9	M	18
P10	M	25
P11	M	37
C1	F	28
C2	M	38
C3	M	22
C4	F	30
C5	F	25
C6	M	54
C7	M	20
C8	M	23

P: Paciente; C: Controle; F: feminino; M: Masculino

De acordo com a análise *ex vivo* foi constatado que entre os pacientes e controles não houve diferença significativa na frequência de células T CD4<sup>+</sup> (Figura 8. A) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 8. B) isoladas.

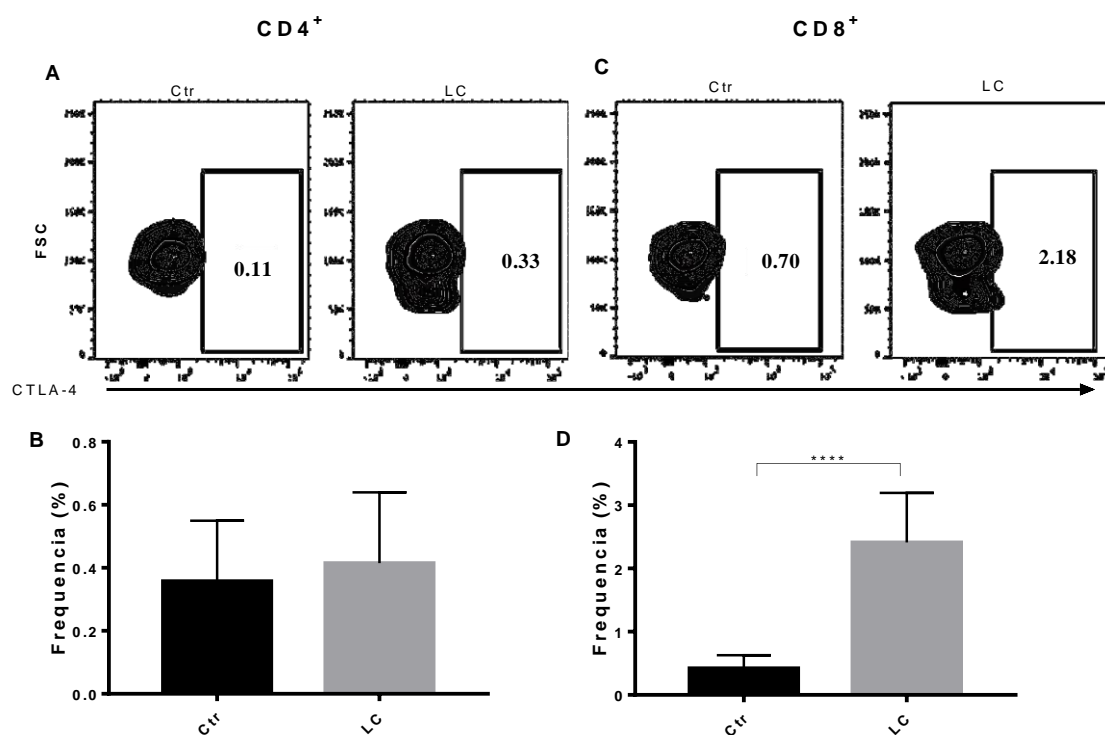


**Figura 08. Avaliação da frequência de T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08) e pacientes com LC (n=11). **A e B:** Análise combinada da análise da frequência total dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (A) e CD8<sup>+</sup> (B). CTRL: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

#### 5.4 PERFIL DIFERENCIADO NA EXPRESSÃO DE CTLA-4, PD-1, KLRG-1, CD57 E TIM-3 NAS CÉLULAS T CD4 E T CD8 TOTAIS

Com o objetivo de avaliar a expressão *ex vivo* dos receptores inibitórios durante a infecção por *L. braziliensis* nos pacientes com a forma cutânea, realizamos a análise fenotípica dos receptores inibitórios CTLA-4, PD-1, KLRG-1, CD57 e TIM-3 nas populações totais dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> através do protocolo de citometria de fluxo nas amostras do PBMC dos pacientes e controles selecionados.

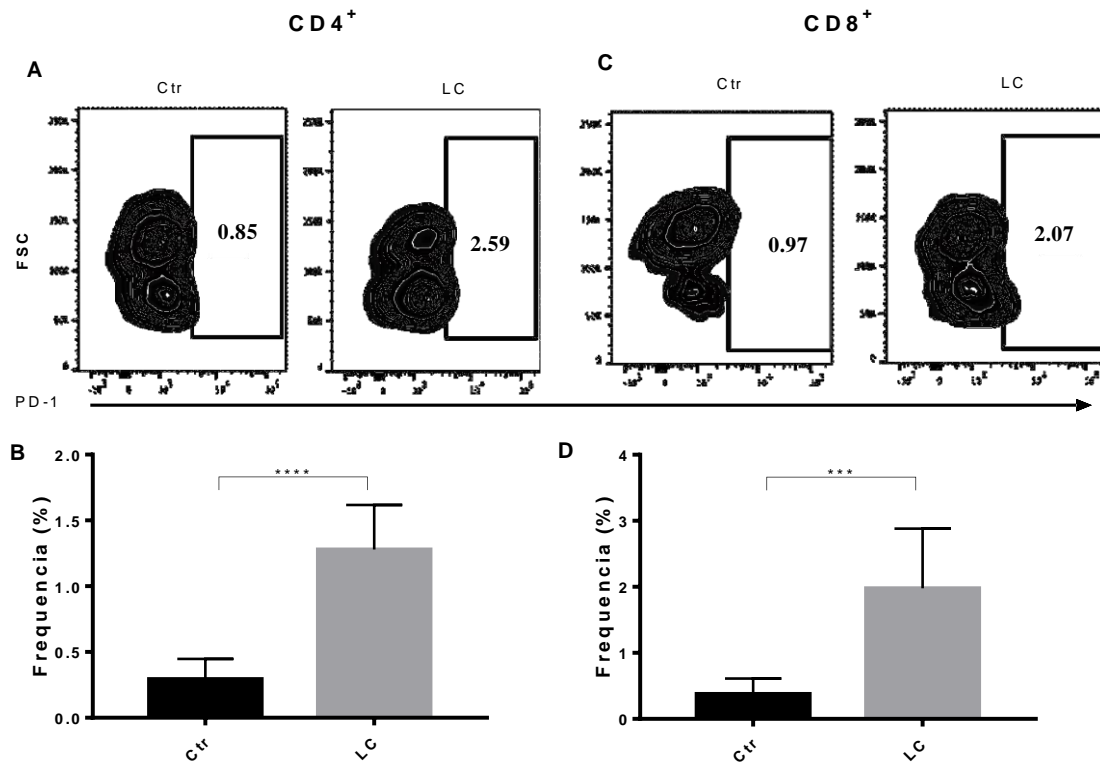
A análise dos grupos revelou que os pacientes portadores de LC quando comparados aos indivíduos saudáveis não apresentam níveis significativamente maiores de CTLA-4 na população de células T CD4<sup>+</sup> (Figura 9.A e B), enquanto que nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura 9.C e D) é possível observar que há um aumento na expressão de CTLA-4 quando comparados com os controles.



**Figura 09. Perfil da expressão de CTLA-4 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08) e pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CTLA-4 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor CTLA-4 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CTLA-4 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente

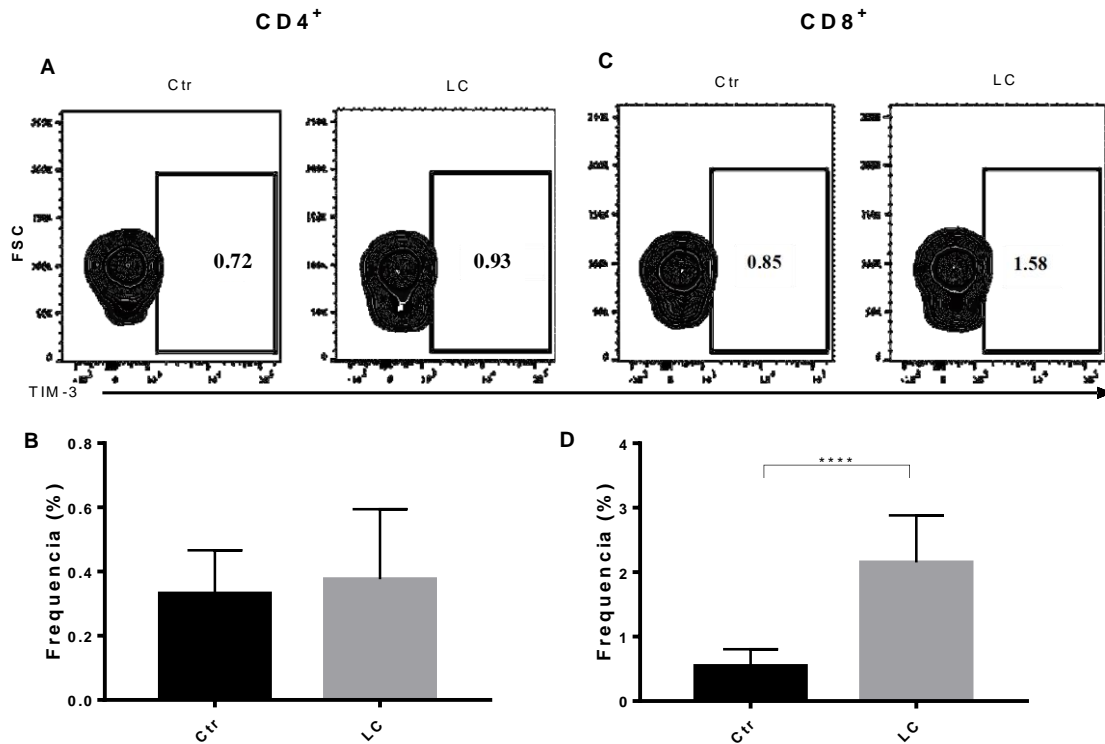
**D:** análise da frequência do receptor CTLA-4 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

De forma semelhante, avaliamos a expressão do receptor PD-1 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 10. A e B) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 10. C e D). Observamos um aumento na expressão deste receptor nos pacientes em ambas as populações linfocitárias quando comparado com o grupo controle.



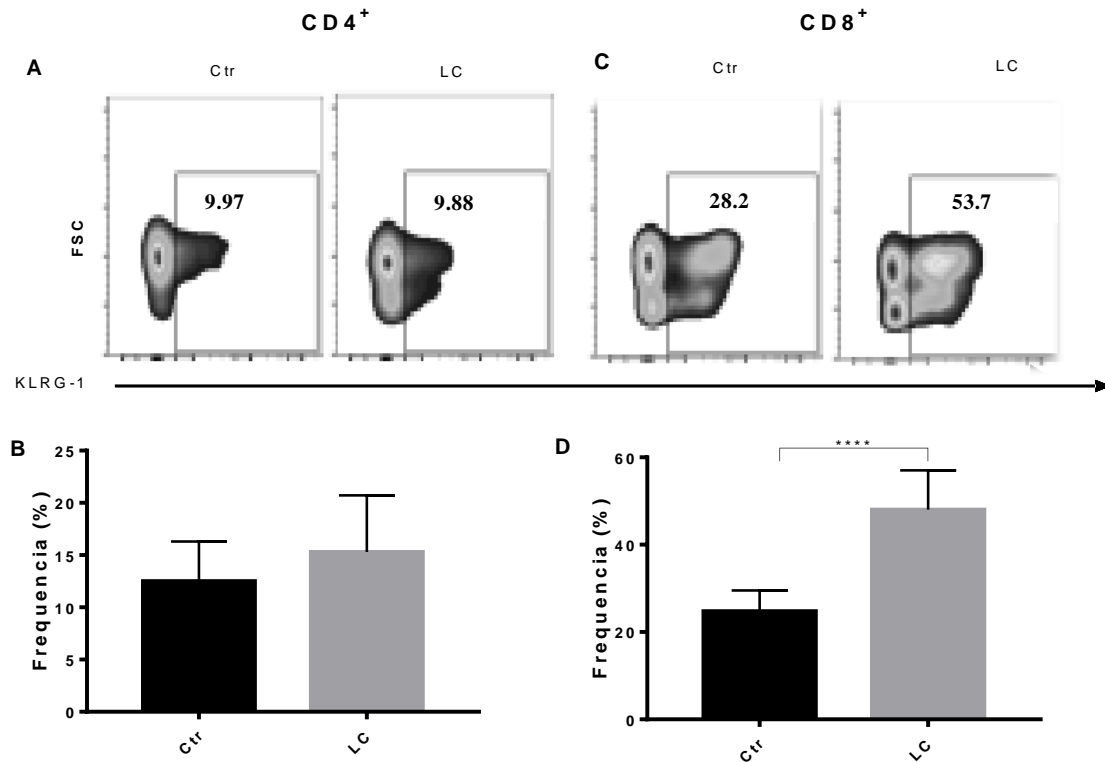
**Figura 10. Perfil da expressão de PD-1 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08) e pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor PD-1 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor PD-1 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor PD-1 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor PD-1 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*  $< 0,0001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$  CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

Ao avaliarmos a expressão do receptor inibitório TIM-3 observamos que entre os diferentes grupos não houve uma expressão significativa nas células T CD4<sup>+</sup> (Figura 10. A e B). No entanto, nas células T CD8<sup>+</sup> (Figura 10. C e D) dos pacientes apresentaram uma expressão significativa quando comparados com os controles.



**Figura 11. Perfil da expressão de TIM-3 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08); pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor TIM-3 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor TIM-3 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor TIM-3 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor TIM-3 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTRL: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

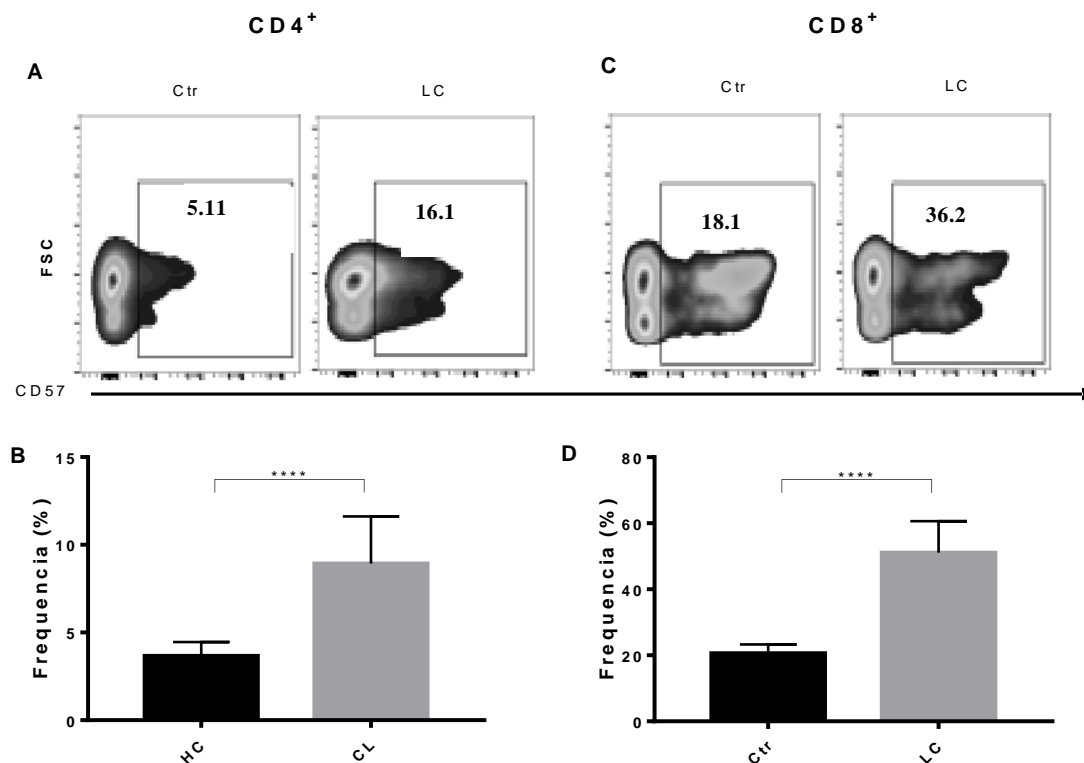
Foi observado na análise do receptor KLRG-1 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> (Figura 12), uma expressão significativa na superfície de células T CD8<sup>+</sup> (Figura 12. C e D). Entretanto, nas células T CD4<sup>+</sup> (Figura 12. A e B) não foram observadas alterações significativas em comparação aos indivíduos saudáveis.



**Figura 12. Perfil da expressão de KLRG-1 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08); pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor KLRG-1 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor KLRG-1 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor KLRG-1 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor KLRG-1 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

Observamos, de forma semelhante, um aumento significativo na expressão do receptor CD57 nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Figura 13. A e B) e T CD8<sup>+</sup> (Figura 13. C e D), quando comparado com o grupo controle.



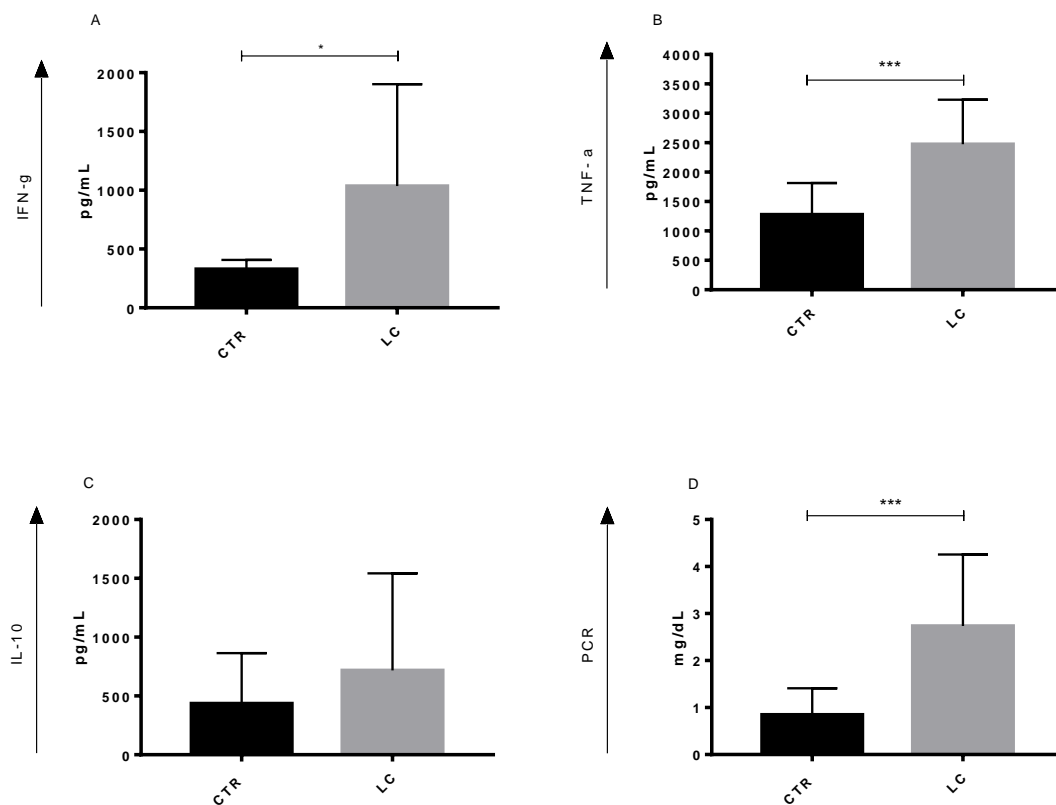


**Figura 13. Perfil da expressão de CD57 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.** Análise *ex vivo* por citometria de fluxo em PBMC de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=08); pacientes com LC (n=11). **A:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CD57 na superfície das células T CD4<sup>+</sup> no grupo controle e paciente. **B:** análise da frequência do receptor CD57 nas células T CD4<sup>+</sup> entre controle e pacientes. **C:** imagem representativa da análise de citometria de fluxo baseada na expressão do receptor CD57 na superfície das células T CD8<sup>+</sup> no grupo controle e paciente **D:** análise da frequência do receptor CD57 nas células T CD8<sup>+</sup> entre controle e pacientes. \*\*\*\* p < 0, 00001 CTR: Controle; LC: Leishmaniose Cutânea.

### 5.5. PERFIL INFLAMATÓRIO COM AUMENTO DE IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 E EXPRESSÃO DE PROTEÍNA C REATIVA

Tendo em vista o envolvimento das citocinas e mediadores inflamatórios na plasticidade celular e expressão de receptores de ativação e inibição, foi avaliado no plasma de pacientes e controles a produção dos seguintes mediadores: IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 e a PCR.

Desta forma, pacientes apresentaram um aumento na expressão das seguintes citocinas IFN-  $\gamma$  (*Interferon gamma*) (Figura 14. A), TNF- $\alpha$  (*Tumoral necrosis factor alpha*) (Figura 14. B) e da Proteína C Reativa (Figura 14. D). No entanto, não verificamos aumento na expressão de IL-10 (Figura 14. C).



**Figura 14. Perfil inflamatório na produção de IFN-g, TNF-a IL-10 e PCR.** Análise por ELISA no plasma de indivíduos saudáveis (CTRL) (n=11) e pacientes com LCL (n=30). Os resultados estão expressos em média de concentração da citocina (pg/ml e mg/dL) e desvio padrão para cada grupo analisado. **A** : Análise de IFN-g. **B**: Análise de TNF-a. **C**: Análise de IL-10. **D**: Análise de Proteína C Reativa (PCR). \* p < 0,05, \*\*\* p < 0,001; CTR: Controle; PCR: Proteína C Reativa; LC: Leishmaniose Cutânea.

## 6 DISCUSSÃO

O numero de homens acometidos por LC em nosso estudo foi cerca de três vezes maior no gênero masculino (25 pacientes) do que no feminino (3 pacientes). Estudos de várias áreas endêmicas do mundo, independentemente dos comportamentos culturais e riscos ocupacionais, homens foram relatados por adquirir leishmaniose cutânea ou visceral mais frequentemente do que as mulheres, no entanto não está claro se essa diferença se deve apenas a riscos de exposição diferentes, ou se as diferenças na resposta imune do hospedeiro desempenham um papel na resistência e susceptibilidade à infecção (MOHAMUDL et al., 1995; TRAVI et al., 2002).

Além disso, no Brasil a taxa de incidência da leishmaniose cutânea é 50% maior entre indivíduos do gênero masculino quando comparado as mulheres em todas as faixas etárias incluindo crianças (CELLA, 2012; JOHNSON et al., 1987). Este dado corrobora com os nossos achados, pois foi observada prevalência do gênero masculino (76%).

O trabalho de Araujo e colaboradores (2016) descreveu uma série de fatores de riscos associados com a leishmaniose cutânea em áreas endêmicas do Brasil, dentre os quais se encontra a atividade ocupacional. Independente do gênero, indivíduos que trabalham em áreas rurais estão mais próximos do ambiente natural do vetor (flebotomíneo), por isso tem mais chance de serem infectados. As lesões, normalmente, se encontram nas áreas descobertas do corpo, tanto em membros superiores como inferiores, tal fato pode ser explicada pelas atividades ocupacionais em áreas rurais (DE ARAUJO et al., 2016). No nosso trabalho, todos os pacientes eram provenientes de áreas rurais, e tinham lesões localizadas em membros superiores (dedo, mão, antebraço, cotovelo) (33,5%) ou inferiores (pé, panturrilha, coxa) (66.5%).

Além das manifestações clínicas nas leishmanioses se assemelharem a lesões de outras doenças, tais como paracoccidíomicose e psoríase, as vezes não é possível observar no esfregaço do infiltrado da lesão as formas amastigotas internalizadas por células mononucleares e polimorfonucleadas (BRITO et al., 2001; KAR, 1995). Estudos realizados por Gomes (2008) e Martins (2010) demonstraram como a PCR pode ser uma importante ferramenta no diagnóstico e identificação da espécie de *Leishmania*, com especificidade e sensibilidade. No nosso estudo, todas as amostras de pacientes foram submetidas a PCR para confirmar a espécie de *Leishmania*, independente do

resultado do esfregaço. Sendo que 91% dos pacientes tiveram esfregaços e PCR positivos, e três pacientes que tiveram esfregaços negativos, foram diagnosticados através da confirmação da análise da PCR, ressaltando a importância na acurácia do diagnóstico e contribuindo para o tratamento correto dos pacientes (FRAGA et al., 2012; GOMES et al., 2008; MARTINS; ALEXANDRINO; GUIMARÃES, 2010).

A identificação da espécie do parasito envolvido nos casos da doença no homem em uma área endêmica é essencial para o entendimento dos aspectos clínicos e epidemiológicos. No Brasil, a *Leishmania braziliensis* é amplamente distribuída por todo território nacional, sendo considerada uma das espécies mais importantes para a saúde pública. Além de ser responsável pela maioria dos casos de LTA no país, tem a capacidade de causar desde a forma cutânea localizada até graves lesões mucocutâneas mutilantes clínica (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012; FALCÃO et al., 2016) (SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

No Espírito Santo, estudos anteriores determinaram a espécie *L. braziliensis* como a circulante e prevalente no Estado (ANTONELLI et al., 2005; BARROS et al., 1985; ISHIKAWA et al., 2002; SESSA et al., 1985). No nosso estudo apenas dois pacientes foram excluídos da pesquisa por infecção com *L. amazonensis*, sendo estes identificados como não autóctones com provável procedência da Bahia (*vide* prontuário).

Além da espécie de *Leishmania sp.* infectante no hospedeiro, o perfil imunológico representa um papel importante durante o estabelecimento da doença e curso das manifestações clínicas (BERGER; FAIRLAMB, 1992). Em modelos experimentais durante as leishmanioses, as células T têm um papel central no controle e resolução da doença, (ROSSI; FASEL, 2018; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Em casos em que há estimulação antigênica persistente durante a infecção crônica, muitas vezes, ocorre a expressão de receptores inibitórios que podem levar as células ao estado de exaustão (WHERRY, 2011). Durante a infecção crônica com *Leishmania sp.*, com a expressão de receptores inibitórios ocorrem alterações funcionais e fenotípicas nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (HENAO-TAMAYO et al., 2011; JIN et al., 2011; REILEY et al., 2013).

Assim como demonstrado durante as infecções pelo HIV e CMV há aumento da expressão de CTLA-4 nas células T CD8<sup>+</sup> (TIAN et al., 2015; VELU et al., 2015). Nossos resultados mostraram que a expressão de CTLA-4 em células T CD8<sup>+</sup> (Fig. 9.C e D) foi evidentemente maior entre os pacientes em relação aos controles. Estudos

sugerem que, provavelmente, as células TCD8<sup>+</sup> respondam precocemente a estimulação antigênica ou que a presença do parasito exerça um impacto mais efetivo sobre estas células, provocando uma progressiva proliferação levando as células a apresentarem um perfil de senescência replicativa e exaustão celular mais evidente que as células T CD4<sup>+</sup> (PARODI *et al.*, 2016).

O receptor PD-1 é o mais estudado e caracterizado em uma variedade de infecções. Já foi estabelecido que há aumento da sua expressão em: Vírus da Hepatite C, Febre Amarela, Citomegalovírus, HIV, Tuberculose, Vírus da Coriomeningite Linfocítica. E a expressão do receptor na superfície celular, além de estar relacionado com aumento das taxas de apoptose entre as células T, também está relacionado com o aumento da carga parasitária (AKHMETZYANOVA *et al.*, 2015; ANTOINE *et al.*, 2012; HASSAN *et al.*, 2015; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016b; MUYANJA *et al.*, 2014; VELU *et al.*, 2015; YI; COX; ZAJAC, 2010). O mesmo perfil de expressão foi observado no nosso estudo, onde os pacientes portadores de LC expressavam significativamente mais PD-1 na superfície de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Fig. 10. A, B, C e D) do que indivíduos saudáveis.

Na infecção crônica por HCV foi observada uma maior frequência de TIM-3 nas células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A expressão de TIM-3 correlacionou-se com um fenótipo disfuncional e redução da produção de citocinas Th1, mas não com a carga viral (GOLDEN-MASON *et al.*, 2009). O nosso estudo, por outro lado, demonstrou alteração somente nas células T CD8<sup>+</sup> (Fig. 11. C e D).

Estudos já demonstraram que os níveis de KLRG-1 durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis*, encontram-se elevados e, sofrendo redução após o tratamento, sugerindo uma coorelação positiva entre a expressão de KLRG-1 e a progressão/cronificação da tuberculose (HENAO-TAMAYO *et al.*, 2011). Assim como descrito em doenças crônicas, nossos resultados mostraram que as células T CD8<sup>+</sup> (Fig. 12. C e D) de pacientes com LC expressam níveis significativamente mais elevados de KLRG-1 quando comparados com de indivíduos saudáveis.

Assim como KLRG-1, a expressão de CD57 está comumente relacionada ao processo inflamatório crônico e ao avanço da idade do indivíduo (TARAZONA *et al.*, 2001). As células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> que expressam CD57 tem redução da capacidade proliferativa diante da estimulação antigênica, e apresentam suscetibilidade a apoptose (BRENCHLEY *et al.*, 2003; CHONG *et al.*, 2008; FOCOSI *et al.*, 2010).

Além disso, foi demonstrado que células T CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas de pacientes com tuberculose ativa expressam significativamente mais CD57 quando comparados com pacientes com infecção latente, sugerindo a importância da estimulação persistente e massiva do patógeno neste processo (PARODI et al., 2016). Pacientes acometidos por LC apresentam altos níveis de expressão da molécula CD57 nas populações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> (Fig. 13. A, B, C e D).

Além da avaliação dos receptores nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> realizamos análises sistêmicas da produção de citocinas, uma vez que desempenham papéis vitais na defesa contra patógenos, seja pela quimiotaxia leucocitária ou pelo estímulo das atividades citotóxicas celulares.

Na leishmaniose, a imunidade protetora depende predominantemente da resposta Th1 e produção de TNF- $\alpha$ , IL-12, IFN- $\gamma$ . Uma resposta menos controlada contribui para imunopatologia e dano tecidual LC (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016a).

O IFN- $\gamma$  é uma citocina imprescindível na resposta imunológica contra agentes patogênicos. A nossa análise demonstrou que os pacientes arrolados no estudo produzem mais IFN- $\gamma$  (fig. 14.A) do que os controles. Estudos realizados por Pinheiro e Rossi observaram que camundongos C57BL/6 deficientes em IFN- $\gamma$  são mais suscetíveis à infecção por *Leishmania* sp. do que os do tipo selvagem. Comparado com os camundongos selvagens, durante a infecção por *L. amazonensis* os camundongos C57BL/6 deficientes em IFN- $\gamma$  apresentaram mais lesões, aumento da carga parasitária e desenvolvimento de respostas do tipo Th2 associadas a elevações de IL-4 contribuindo para a patogênese da doença (PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007).

O TNF- $\alpha$  ocupa um papel crítico na gravidade da lesão, visto que a produção é exacerbada em lesões de pacientes portadores da forma mucocutânea e em pacientes com a forma cutânea está correlacionado com limitação da resposta ao tratamento antimonial (OLIVEIRA et al., 2011). No nosso trabalho, dos 33 pacientes, 60% tiveram que introduzir um ciclo a mais de antimonial (*vide* prontuário), o que pode estar relacionado com o aumento da produção de TNF- $\alpha$  (Fig. 14. B) dos pacientes.

A Proteína C Reativa é uma proteína de fase aguda que aumenta 25% no sangue periférico em processos inflamatórios. O aumento da PCR nos pacientes avaliados (Fig. 14.D), pode estar associado em resposta a citocinas como IL-6 e IL-1, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , IFN- $\gamma$  que ativam a produção da PCR. Além disso, a PCR pode ativar a via clássica do sistema complemento, estimulando o estresse respiratório e atividade anti-tumoral (GASIM; THEANDER; ELHASSAN, 2000; RAYNES; CURRY; HARRIS, 1994).

Apesar dos receptores inibitórios e alguns mecanismos associados ao perfil inflamatório já terem sido descritos na infecção por *Leishmania sp*, pouco se sabe sobre o seu papel na imunopatogênese da forma cutânea em humanos. Portanto, nosso trabalho fornecerá dados importantes para o entendimento da relação entre a imunopatogênese e a expressão de receptores inibitórios como característica da exaustão células nas células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>.

## 7 CONCLUSÕES

Nossos dados demonstraram que as Células T CD4 e T CD8 nos grupos de pacientes expressam em resposta a *L. braziliensis*, diferentes perfis na expressão dos receptores inibitórios. Sendo que as células T CD8 expressam níveis significativos de PD-1, CLTA-4, CD57, KLRG-1e TIM-3 quando comparado com os controles. Enquanto que as células T CD4 expressam aumento significativo da expressão do receptores inibitórios PD-1 e CD57. Além disso, observamos o aumento da Proteína C Reativa, e de citocinas como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  nos pacientes.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELADHIM, M.; KAMHAWI, S.; VALENZUELA, J. G. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 28, p. 691–703, 2014.
- ADEKAMBI, T. et al. Distinct effector memory CD4 + T cell signatures in latent Mycobacterium tuberculosis infection, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, 2012.
- AKBAR, A. N.; HENSON, S. M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? **Nature Reviews Immunology**, v. 11, n. 4, p. 289–295, 2011.
- AKHMETZYANOVA, I. et al. Correction: PD-L1 Expression on Retrovirus-Infected Cells Mediates Immune Escape from CD8+ T Cell Killing. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, p. 1–21, 2015.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.
- ANTOINE, P. et al. Functional Exhaustion of CD4+ T Lymphocytes during Primary Cytomegalovirus Infection. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 5, p. 2665–2672, 2012.
- ANTONELLI, L. R. V et al. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, 2005.
- BACELLAR, O. et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.
- BARROS, G. C. et al. Foco de leishmaniose tegumentar americana nos municípios de Viana e Cariacica, Estado do Espírito Santo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v. 19, p. 146–153, 1985.
- BERGER, B. J.; FAIRLAMB, A. H. Interactions between immunity and chemotherapy in the treatment of the trypanosomiasis and leishmaniasis. **Parasitology**, v. 105, n. S1, p. S71–S78, 1992.
- BLACKBURN, S. D. et al. Coregulation of CD8+ T cell exhaustion during chronic viral infection by multiple inhibitory receptors. **Nat immunol**, v. 10, n. 1, p. 29–37, 2009.
- BRANDONISIO, O.; SPINELLI, R.; PEPE, M. Dendritic cells in Leishmania infection. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 15, p. 1402–1409, 2004.
- BRENCHLEY, J. M. et al. Expression of CD57 denotes replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8. **Blood**, v. 101, n. 7, p. 2711–2720, 2003.
- BRITO, M. E. F. et al. Dynamics of the antibody response in patients cure of American cutaneous leishmaniasis with therapeutic or spontaneous. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, p. 203–206, 2001.
- BROWN, K. E. et al. Role of PD-1 in regulating acute infections. **Current Opinion in Immunology**, v. 22, n. 3, p. 397–401, 2010.
- CELLA, W. Seventeen years of American cutaneous leishmaniasis in a Southern Brazilian municipality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 54, n. 4, p. 215–218, 2012.
- CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of Leishmania donovani in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345–55, 1984.
- CHONG, L. K. et al. Proliferation and interleukin 5 production by CD8hiCD57+ T cells. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 4, p. 995–1000, abr. 2008.

- DA-CRUZ, A. M. et al. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 62, n. 6, p. 2614–8, 1994.
- DA SILVA, I. A. et al. In Vitro Metacyclogenesis of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis clinical field isolates, as evaluated by morphology, complement resistance, and infectivity to human macrophages. **BioMed Research International**, v. 2015, n. Lcl, 2015.
- DA SILVA SANTOS, C. et al. Proteome Profiling of Human Cutaneous Leishmaniasis Lesion. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 2, p. 400–410, 2015.
- DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKY, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in Public Health**, v. 2, n. September, p. 1–6, 2014.
- DAYAKAR, A. et al. Leptin regulates Granzyme-A, PD-1 and CTLA-4 expression in T cell to control visceral leishmaniasis in BALB/c Mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 14664, 2017.
- DE ARAÚJO, A. P. O. et al. Disruption of the peritrophic matrix by exogenous chitinase feeding reduces fecundity in Lutzomyia longipalpis females. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 4, p. 543–545, 2012.
- DE ARAUJO, A. R. et al. Risk factors associated with american cutaneous leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 58, n. 1, p. 2–7, 2016.
- DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; DA ROCHA-AZEVEDO, B. The site of the bite: Leishmania interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–8, 2016.
- DE MOURA, T. R. et al. Enhanced Leishmania braziliensis infection following pre-exposure to sandfly saliva. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 1, n. 2, 2007.
- DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C. I. The immunobiology of Leishmania braziliensis infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.
- ESCH, K. J. et al. PD-1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. v. 191, n. 11, p. 5542–5550, 2014.
- FALCÃO, S. DE A. C. et al. Leishmania infantum and Leishmania braziliensis: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.
- FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8+ T cell expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. v. 31, n. 8, p. 432–439, 2010.
- FEIJÓ, D. et al. Dendritic cells and leishmania infection: Adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2016, 2016.
- FOCOSI, D. et al. CD57+ T lymphocytes and functional immune deficiency. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 87, n. 1, p. 107–116, 2010.
- FRAGA, J. et al. Accurate and rapid species typing from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis lesions of the New World. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 74, n. 2, p. 142–150, 2012.
- FUERTES MARRACO, S. A. et al. Inhibitory receptors beyond T cell exhaustion. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUN, p. 1–14, 2015.
- GANNAVARAM, S. et al. Modulation of innate immune mechanisms to enhance Leishmania vaccine-induced immunity: Role of coinhibitory molecules. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. MAY, p. 1–10, 2016.
- GASIM, S.; THEANDER, T. G.; ELHASSAN, A. M. High levels of C-reactive protein in the peripheral blood during visceral leishmaniasis predict subsequent development of

- post kala-azar dermal leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 75, n. 1, p. 35–8, 2000.
- GIGLEY, J. P. et al. T cell exhaustion in protozoan disease. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 9, p. 377–384, 2012.
- GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the Leishmania life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, 2010.
- GOLDEN-MASON, L. et al. Negative Immune Regulator Tim-3 Is Overexpressed on T Cells in Hepatitis C Virus Infection and Its Blockade Rescues Dysfunctional CD4+ and CD8+ T Cells. **Journal of Virology**, v. 83, n. 18, p. 9122–9130, 2009.
- GOMES, A. H. S. et al. Leishmania (V.) braziliensis: Detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 3, p. 319–324, 2008.
- GOMES, R. et al. Immunity to Lutzomyia whitmani Saliva Protects against Experimental Leishmania braziliensis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 11, p. 1–15, 2016.
- HASSAN, S. S. et al. PD-1, PD-L1 and PD-L2 gene expression on t-cells and natural killer cells declines in conjunction with a reduction in PD-1 protein during the intensive phase of tuberculosis treatment. **PLoS ONE**, v. 10, n. 9, p. 1–15, 2015.
- HEINZEL, F. P.; MAIER JR, R. A. HOST RESPONSE AND INFLAMMATION-Interleukin-4-Independent Acceleration of Cutaneous Leishmaniasis in Susceptible BALB/c Mice following Treatment with Anti-CTLA4 Antibody. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 12, p. 6454–6460, 1999.
- HENAO-TAMAYO, M. et al. T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis. **Tuberculosis**, v. 91, n. 4, p. 308–313, jul. 2011.
- HORNE-DEBETS, J. M. et al. PD-1 dependent exhaustion of CD8+ T cells drives chronic malaria. **Cell Reports**, v. 5, n. 5, p. 1204–1213, 2013.
- ILES, K. E.; FORMAN, H. J. Macrophage Signaling and Respiratory Burst. **Immunologic Research**, v. 26, n. 1–3, p. 095-106, 2002.
- ILLINGWORTH, J. et al. Chronic Exposure to Plasmodium falciparum Is Associated with Phenotypic Evidence of B and T Cell Exhaustion. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 3, p. 1038–1047, 2013.
- ISHIKAWA, E. A. Y. et al. Genetic variation in populations of Leishmania species in Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, p. S111–S121, 2002.
- JOHNSON, W. D. et al. Epidemiology of american cutaneous leishmaniasis due to leishmania braziliensis brasiliensis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 156, n. 1, p. 73–83, 1987.
- JOSHI, T. et al. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8+ T cells and confers protection against Leishmania donovani infections. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, 2009.
- KAMATA, T. et al. Blockade of programmed death-1/programmed death ligand pathway enhances the antitumor immunity of human invariant natural killer T cells. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 65, n. 12, p. 1477–1489, 2016.
- KAR, K. Serodiagnosis of leishmaniasis. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 21, n. 2, p. 123–152, 1995.
- KEE, S.-J. et al. Dysfunction of Natural Killer T Cells in Patients with Active Mycobacterium tuberculosis Infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 6, p. 2100–2108, jun. 2012.
- LIANG, S. C. et al. PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to

- cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 58–64, 2006.
- LIMA, E. B. DE et al. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana \*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. June, p. 1–8, 2012.
- MARTINS, L.; ALEXANDRINO, A.; GUIMARÃES, G. Detection of *Leishmania* visceral DNA in American tegumentary leishmaniasis patients. **Revista de saude publica**, v. 44, n. 3, p. 571–574, 2010.
- MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016a.
- MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 17 ago. 2016b.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar americana**. [s.l.: s.n.].
- MINISTÉRIO DA SAÚDE, S. DE V. EM S. **Sistema Nacional de Vigilância em Saúde: Relatório de Situação - Espírito Santo**. [s.l.: s.n.].
- MOHAMUDL, K. A. et al. Visceral leishmaniasis disease manifestations in Somalia : prevalence of markers in a village in an endemic area of infection. v. 6, p. 361–365, 1995.
- MOU, Z. et al. Parasite-Derived Arginase Influences Secondary Anti-*Leishmania* Immunity by Regulating Programmed Cell Death-1-Mediated CD4+ T Cell Exhaustion. **The Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3380–3389, 1 abr. 2013.
- MUYANJA, E. et al. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. **Journal of Clinical Investigation**, v. 124, n. 7, p. 3147–3158, 2014.
- NIELSEN, C. M. et al. Functional significance of CD57 expression on human NK cells and relevance to disease. **Frontiers in Immunology**, v. 4, n. DEC, p. 1–8, 2013.
- NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 251–259, 2015.
- OLEKHNOVITCH, R.; BOUSSO, P. Induction, Propagation, and Activity of Host Nitric Oxide: Lessons from *Leishmania* Infection. **Trends in Parasitology**, v. 31, n. 12, p. 653–664, 2015.
- OLIVEIRA, F. et al. Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 70–73, 2011.
- OPAS\_OMS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. **Informe Leishmanioses**, v. 2, p. 1–4, 2014.
- PANDAY, A. et al. NADPH oxidases: An overview from structure to innate immunity-associated pathologies. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 12, n. 1, p. 5–23, 2015.
- PARODI, C. et al. American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms—co-infection with *Trypanosoma cruzi*. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 4, p. 353–369, 2016.
- PIMENTA, P. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. **Science**, v. 256, n. 5065, p. 1812–1815, 1992.
- PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memorias**

- do Instituto Oswaldo Cruz, v. 102, n. 1, p. 79–82, 2007.
- RAMÍREZ, J. L.; GUEVARA, P. Persistent infections by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92, n. 3, p. 333–338, 1997.
- RAYNES, J. G.; CURRY, A.; HARRIS, R. A. Binding of C-reactive protein to *Leishmania*. **Biochemical Society Transactions**, v. 22, n. 1, p. 3S–3S, 1994.
- READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents. **Annual Review of Entomology**, v. 58, n. 1, p. 227–250, 2013.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–11, 2007.
- RIBEIRO-DE-JESUS, A. et al. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998.
- RODRIGUES, V. et al. Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 2, 2014.
- ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and *Phlebotomus papatasi* sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunology**, v. 25, n. 3, p. 127–134, 2003.
- ROHOŠOVÁ, I.; VOLF, P. Sand fly saliva: Effects on host immune response and *Leishmania* transmission. **Folia Parasitologica**, v. 53, n. 3, p. 161–171, 2006.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! n. December, 2017.
- ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.
- RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 671–678, 2007.
- SANTOS, C. DA S. et al. CD8+ Granzyme B+–Mediated Tissue Injury vs. CD4+IFN $\gamma$ +–Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–1540, 2013.
- SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, n. 9, p. 581–592, 2016.
- SECUNDINO, N. F. C. et al. *Lutzomyia longipalpis* peritrophic matrix: formation, structure, and chemical composition. **Journal of medical entomology**, v. 42, n. 6, p. 928–938, 2005.
- SESSA, P. A. et al. Distribuição Geográfica Da Leishmaniose Tegumentar Americana No Estado Do Espírito Santo - Brasil. v. 18, n. 4, p. 237–241, 1985.
- SINAN. Casos de Leishmaniose Tegumentar. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2016. p. 2016, 2016.
- SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 2008.
- STUART, K. et al. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.
- TARAZONA, R. et al. Increased expression of NK cell markers on T lymphocytes in aging and chronic activation of the immune system reflects the accumulation of effector/senescent T cells. **Mechanisms of Ageing and Development**, v. 121, n. 1–3, p. 77–88, 2001.
- TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. 8–11, 2013.
- TIAN, X. et al. The upregulation of LAG-3 on T cells defines a subpopulation with functional exhaustion and correlates with disease progression in HIV-infected subjects. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 194, n. 8, p. 3873–82, 2015.
- TRAVI, B. L. et al. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune

- response in hamsters infected with *Leishmania* spp. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 5, p. 2288–2296, 2002.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 51, n. 2, p. 229–242, 2007.
- TURCO, S. J.; DESCOTEAUX, A. THE LIPOPHOSPHOGLYCAN OF LEISHIMANIA PARASITES. **Annu. Rev. Microbiol**, v. 46, p. 65–94, 1992.
- TURETZ, M. L. et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 186, n. 12, p. 1829–1834, 2002.
- UENO, N.; WILSON, M. E. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: Implications for intracellular survival. **Trends in Parasitology**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.
- VELU, V. et al. Role of PD-1 co-inhibitory pathway in HIV infection and potential therapeutic options. **Retrovirology**, v. 12, n. 1, p. 14, 2015.
- WHERRY, E. J. T cell exhaustion. **Nature Immunology**, v. 131, n. 6, p. 492–499, 2011.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Sixtieth World Health Assembly. p. 4, 2007.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases 2015. **Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected diseases**, p. 191, 2015.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. v. 92, n. 92, p. 557–572, 2017.
- YI, J. S.; COX, M. A.; ZAJAC, A. J. T-cell exhaustion: Characteristics, causes and conversion. **Immunology**, v. 129, n. 4, p. 474–481, 2010.
- ZUMLA, A. et al. Inflammation and tuberculosis: Host-directed therapies. **Journal of Internal Medicine**, v. 277, n. 4, p. 373–387, 2015.