



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DOENÇAS INFECCIOSAS**

Régia Ferreira Martins

Análise do desenvolvimento de senescência celular em linfócitos T durante a Leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis*.

**Vitória
2019**

Régia Ferreira Martins

Análise do desenvolvimento de senescência celular em linfócitos T durante a Leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis*.

Tese 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 título de doutora em Doenças Infecciosas.

Orientador: Prof. Dr. Daniel Claudio de Oliveira Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Aloísio Falqueto

Vitória

2019

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

F383a Ferreira Martins, Régia, 1982-
Análise do desenvolvimento de senescência celular em
linfócitos T durante a Leishmaniose cutânea localizada causada
por *Leishmania braziliensis*. / Régia Ferreira Martins. - 2019.
120 f. : il.

Orientador: Daniel Claudio de Oliveira Gomes.

Coorientador: Aloísio Falqueto.

Tese (Doutorado em Doenças Infecciosas) - Universidade
Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leishmaniose cutânea localizada. 2. *Leishmania
braziliensis*. 3. Senescência celular. 4. Marcadores de
senescência. 5. Células de memória. 6. Célula de memória
efetora altamente diferenciadas - EMRA. I. de Oliveira Gomes,
Daniel Claudio. II. Falqueto, Aloísio. III. Universidade Federal
do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

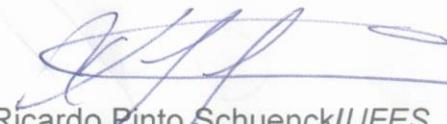


PARECER ÚNICO DA COMISSÃO JULGADORA DE TESE DE DOUTORADO

A doutoranda Régia Ferreira Martins apresentou a tese intitulada "Análise fenotípica e funcional ligadas a senescência linfocitária durante a leishmaniose cutânea localizada humana causada por *leishmania braziliensis*" em sessão pública, como requisito final para obtenção do título de Doutor(a) 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 tese habilitando Régia Ferreira Martins a obter o grau de doutor(a) em doenças infecciosas.

Vitória - ES, 20 de setembro de 2019.


Ricardo Pinto Schuenck/UFES
(Membro Interno)


Rodrigo Ribeiro Rodrigues/UFES
(Membro Interno)


Rodolfo Cordeiro Giunchetti/UFMG
(Membro Externo)


Sandra Ventrin von Zeidler/UFES
(Membro Externo)

Dedico este trabalho a minha mãe,
significado de amor e afeto verdadeiros.

AGRADECIMENTOS

A Deus por abençoar a minha vida.

Aos meus pais, Claudio e Adriana, pelo suporte. Sem eles a conclusão deste trabalho não seria possível.

Ao meu pai por me amar do jeito que eu sou, pela acolhida e por manter as portas de casa sempre abertas para mim!

À minha mãe o meu mais sincero obrigada e a minha eterna gratidão por incansavelmente cuidar das minhas filhas, dia após dia, dando um suporte essencial para que esta tese pudesse ser redigida.

Aos meus irmãos, Raissa, Caio e Claudio, pelos conselhos, pela ajuda amorosa com as sobrinhas e pela convivência nesse período importante.

Ao Juliano por me dar Clarissa e Elisa e pela família que formamos, dando sentido à vida. Obrigada por suportar a distância e entender as necessidades desse momento.

À Fernanda e à Jaqueline por cuidarem com tanto carinho das minhas filhas, possibilitando a redação desta tese.

Agradeço imensamente aos meus colegas de laboratório:

Juliana pela convivência, por estar presente na construção deste trabalho e por acrescentar tanto na minha vida!

Glênia por cada momento compartilhado, pelo suporte, amor e carinho. Você é incrível!

Andrés por tornar o lab um lugar de alegria. Obrigada pela companhia, pelo companherismo, pela disposição e pela ajuda com tudo. Você sempre será lembrado com muito carinho por mim!

Estêvão pelo conhecimento compartilhado, pelas diversas risadas e por tornar a vida no lab mais divertida! Você é muito especial!

Renan por sempre estar disposto a ajudar e pela convivência sempre tão agradável!

Jéssica pela prosa boa e pelos longos cafés “científicos”!

Aos demais colegas, Luciana, Lorenzo e Naira, pela grande ajuda com este trabalho e pelo conhecimento transmitido, sempre com muita dedicação e disponibilidade, e à Carlinha pela boa companhia no laboratório.

Ao pessoal do Núcleo de Doenças Infecciosas pelo carinho comigo e por serem sempre tão agradáveis: Brunelli, Lau, Ary, Rose, Gerson, Canal, Seu Geraldo, Leduk, João e Célia.

Ao Professor Daniel, por permitir que eu pudesse participar deste trabalho e pela compressão e ajuda no período que eu mais precisei. Desejo todo sucesso do mundo para você professor!

Ao Professor Breno pela admiração que nos desperta, pela imensa ajuda com este trabalho, pelos diversos conselhos, pela disposição em ajudar e pelo prazer em transmitir o conhecimento. Obrigada, professor, de todo o meu coração!

Ao Dr. Fausto por ser um professor que nos inspira e pela disposição em compartilhar conosco seu vasto conhecimento e suas tantas histórias.

Ao Dr. Falqueto por ser sempre tão atencioso conosco e tão gentilmente nos ceder as amostras, além de ter nos concedido o prazer de participar deste trabalho.

Aos professores da banca por doarem parte do seu tempo, a fim de nos prestigiar e certamente acrescentar muito a este trabalho.

Às pessoas que nos permitem trabalhar em segurança, em especial, Amadeus e Wilson.

A Capes, à Fapes e ao Fundo Newton pelo financiamento, sem o qual a realização deste projeto não seria possível.

Ao Laboratório do Professor Arne Akbar e aos pesquisadores que auxiliaram na realização dos experimentos deste projeto.

Por fim, agradeço a todos que de diferentes maneiras contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A vocês o meu muito obrigada e o meu carinho!

*A ciência se compõe de erros que, por sua vez,
são os passos até a verdade.*

Júlio Verne

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença crônica que se apresenta em diferentes formas clínicas, dependendo dentro outros fatores, da espécie do parasita em associação com a condição imunológica do hospedeiro. A Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) é a forma mais comum encontrada no mundo. Tendo em vista a importância da resposta imunológica mediada por células T no controle da infecção por *L. braziliensis* e na imunopatogênese da LCL, o objetivo do nosso trabalho foi caracterizar a senescência celular em linfócitos T de memória, bem como avaliar o perfil secretor e atividade funcional destas células e sua participação na imunopatogênese da LCL. Nossos resultados mostraram que linfócitos T de pacientes com LCL apresentam características de senescência celular como: aumento significativo na expressão de receptores extracelulares como KLRG-1 e CD57; ativação de vias intracelulares de sinalização como fosforilação da histona γ H2AX e da proteína quinase p38; encurtamento de telômero e baixa expressão da enzima hTERT. Estes demonstraram também no grupo LCL, um acúmulo sistêmico de células T de memória efetora altamente diferenciadas com as características de senescência (T_{EMRA}). Ademais, apesar dessas células apresentarem defeitos proliferativos, desenvolveram o fenótipo de perfil secretor associado à senescência (Senescence Associated Secretory Phenotype – SASP), com alto potencial efetor para a síntese das citocinas próinflamatórias TNF- α e IFN- γ . Além disso, observamos nas células senescentes dos pacientes, um significativo aumento na expressão de CLA, associado à capacidade de migração para o tecido cutâneo, bem como uma correlação positiva do acúmulo de células senescentes com o tamanho lesional. Portanto, pela primeira vez, nossos resultados mostraram o desenvolvimento de senescência celular em pacientes com LCL, cujo potencial inflamatório e de migração podem estar associados a imunopatogênese da doença. Estes achados podem contribuir na elaboração de tratamentos baseados em imunoterapia, como o bloqueio de receptores celulares e/ou via de sinalização, que possibilitam a retomada da capacidade proliferativa celular e a regulação do nível de citocinas próinflamatórias, bem como despontam novos biomarcadores que podem estar associados à gravidade da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose cutânea localizada. *L. braziliensis*. Células T. Células de memória. EMRA. Senescência celular. Marcadores de senescência. Receptores de senescência. KLRG-1. CD57.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a chronic disease with different clinical forms, which depend on the parasite species and the host's immune response. Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) is the most common form found in the world. Due to the importance of T-cell-mediated immune response in controlling *L. braziliensis* infection and in the immunopathogenesis of LCL, the aim of our study was to characterize senescence in memory T-cells, assess their secretory profile and activity and their role in the immunopathogenesis of LCL. For instance, our results showed that T-lymphocytes from patients with LCL have characteristics of senescent cells with increased expression of extracellular receptors such as KLRG-1 and CD57; as well as activation of protein kinase p38 intracellular signaling pathway, histone γ H2AX; followed by telomere shortening and low expression of hTERT enzyme. Our research also demonstrated in the LCL group, an accumulation of terminally differentiated effector memory T (T_{EMRA}) cells with senescence characteristics. We also found that, although these cells have proliferative defects, they have developed the Senescence-Associated Secretory Phenotype (SASP) phenotype, with high effector potential for the production of proinflammatory cytokines, e.g. TNF- α and IFN- γ . Besides that, we observed that patients' senescent cells have increased expression of CLA, associated with the ability to migrate to skin tissue, which was positively correlated with the senescent cells accumulation and the skin lesion size. In conclusion, we showed at first time the development of senescence over the T cells in patients with LCL, whose inflammatory and migratory potential may be associated with disease immunopathogenesis. These findings may contribute to the development of immunotherapy-based treatments, such as blockade of cell receptors and/or signaling pathways, which would be able to enable the recovery of cell proliferative capacity and regulation of proinflammatory cytokines, as well as emerging new biomarkers that may be associated with the disease severity.

Keywords: Cutaneous localized leishmaniasis. *L. braziliensis*. T cells. Memory T cells. EMRA. Cellular senescence. Senescence markers. Senescence receptors. KLRG-1. CD57.

FIGURAS

Figura 1 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	19
Figura 2 – Distribuição mundial da LC	22
Figura 3 – Participação das células da imunidade inata e adquirida no controle da infecção por <i>Leishmania spp</i>	27
Figura 4 – Diferenciação das células T de memória	34
Figura 5 – Desenvolvimento da senescência celular	38
Figura 6 – Senescência replicativa marcada pela expressão do marcador de superfície KLRG-1	40
Figura 7 – Quadro comparativo entre mecanismo imunorreguladores	51
Figura 8 – Diagnóstico molecular dos pacientes arrolados no estudo	57
Figura 9 – Caracterização de marcadores de senescência em populações de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de indivíduos com LCL	61
Figura 10 – Análise da expressão da proteína do complexo de histonas γ H2AX em populações de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de indivíduos com LCL	62
Figura 11 – Análise da expressão da proteína quinase p38 fosforilada em populações de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ de indivíduos com LCL.....	63
Figura 12 – Avaliação do tamanho do telômero nas populações de células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ ..	64
Figura 13 – Acúmulo de células de memória efetora altamente diferenciadas em pacientes com LCL	66
Figura 14 – Análise da capacidade proliferativa das subpopulações de células T de memória através da expressão de Ki67	68
Figura 15 – Análise da atividade da enzima telomerase e ausência da expressão de CD27 e CD28 em células T de memória efetora altamente diferenciadas	70
Figura 16 – Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células mononucleares do sangue periférico.....	71
Figura 17 – Análise da expressão de mediadores inflamatórios pelas células T CD8 ⁺ de memória efetora altamente diferenciadas.....	73

Figura 18 – Análise da expressão de mediadores inflamatórios e da proteína C reativa e sua correlação com a frequência de células TCD4⁺ e CD8⁺ de memória efetora altamente diferenciadas..... 74

Figura 19 – Caracterização na expressão de CLA em células T CD4⁺ e CD8⁺ durante a LCL e correlação entre a frequência de células T efetoras altamente diferenciadas e o tamanho da lesão 77

TABELA

Tabela 1 – Caracterização dos indivíduos arrolados no estudo..... 55

Tabela 2 – Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo.....58

ABREVIATURAS E SIGLAS

CD – Cluster de Diferenciação

CM – Memória Central

CMV – Cytomegalovírus

CS – Controle Saudável

DC – Células Dendríticas

DDR – Resposta de Dano ao DNA

DTH – Delayed Type Hypersensitivity

ELISA – Enzyme-Linked Immosorbent Assay

EM – Memória Efetora

EMRA – Memória Efetora Altamente Diferenciada

FACS – Fluorescence-Activated Cell Sorting

Hae III – *Haemophilus aegyptius* III

HBV – Vírus da Hepatite B

HCV – Vírus da Hepatite C

HEV– High Endothelial Venules

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana Adquirida

HUCAM – Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes

IFN – Interferon

IL – Interleucina

KLRG-1 – Killer-cell Lectin like Receptor G1

LC – Leishmaniose Cutânea

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

LD – Leishmaniose Difusa

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral;

MAPK p38 – Mitogen Activated Protein Kinase p38

NK – Natural Killer

NO – Nitric Oxide

OCT – Optimal Cut Temperature

PBMC – Células Mononucleares do Sangue Periférico

PBS – Tampão Salino Fosfato

PCR – Reação da Cadeia da Polimerase

PMN – Células Polimorfonucleares

RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SMF – Sistema Mononuclear Fagocitário

T_{CM} – Células T de Memória Central

T_{EM} – Células T de Memória Efetora

T_{EMRA} – Células T de Memória Efetora Altamente Diferenciadas

TGF – Transforming Grown Factor

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TNF- α – Tumor Necrosis Factor α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Leishmanioses: aspectos gerais e transmissão	18
1.2. Epidemiologia.....	20
1.3. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL).....	22
1.4. Resposta imunológica à LCL	25
1.5. Diferenciação das células T em células T de memória.....	30
1.6. Imunorregulação	36
1.6.1. Senescência replicativa ou celular.....	36
1.6.2. Anergia celular	43
1.6.3. Exaustão celular.....	46
2. JUSTIFICATIVA	51
3. OBJETIVO	52
3.1. Objetivos específicos	53
4. METODOLOGIA.....	53
4.1. Aspectos éticos e teste de elegibilidade do estudo	53
4.2. Seleção dos pacientes.....	54
4.3. Amostras dos Pacientes.....	54
4.4. Separação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC).....	55
4.5. Diagnóstico Molecular	55
4.6. Análise por Citometria de Fluxo	57
4.7. Análise da produção de citocinas	58
4.8. Análise de proliferação	59
4.9. Marcação do telômero por hibridação fluorescente <i>in situ</i>	59

4.10. Análise Estatística.....	59
5. RESULTADOS	60
5.1. Avaliação da expressão de marcadores de superfície associados à senescência celular em pacientes com LCL.....	60
5.2. Avaliação da expressão de marcadores intracelulares associados à senescência celular em pacientes com LCL	61
5.3. Avaliação do tamanho do telômero como característica associada à senescência celular em pacientes com LCL	63
5.4. Avaliação da diferenciação das células T em diferentes populações de memória de pacientes com LCL	65
5.5. Análise da capacidade proliferativa das subpopulações de células T de memória através da expressão de Ki67.....	66
5.6. Análise da atividade da enzima telomerase em células T de memória efetora altamente diferenciadas.....	69
5.7. Análise do perfil funcional das células T através da expressão de mediadores inflamatórios.....	71
5.8. Análise do perfil secretor das células T CD8 ⁺ de memória efetora altamente diferenciadas.....	72
5.9. Correlação entre a produção de mediadores inflamatórios e o acúmulo de células T de memória efetora altamente diferenciadas em pacientes com LCL.....	73
5.10. Correlação entre o acúmulo de células T de memória efetora altamente diferenciadas e o tamanho da lesão e da expressão de LCA em pacientes com LCL	76
6. DISCUSSÃO	78
7. CONCLUSÃO.....	86
REFERÊNCIAS.....	87
ANEXOS	105
Anexo A – Termo de consentimento livre esclarecido	105

Anexo B – Artigo: “Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis”	107
--	-----

‘

1. INTRODUÇÃO

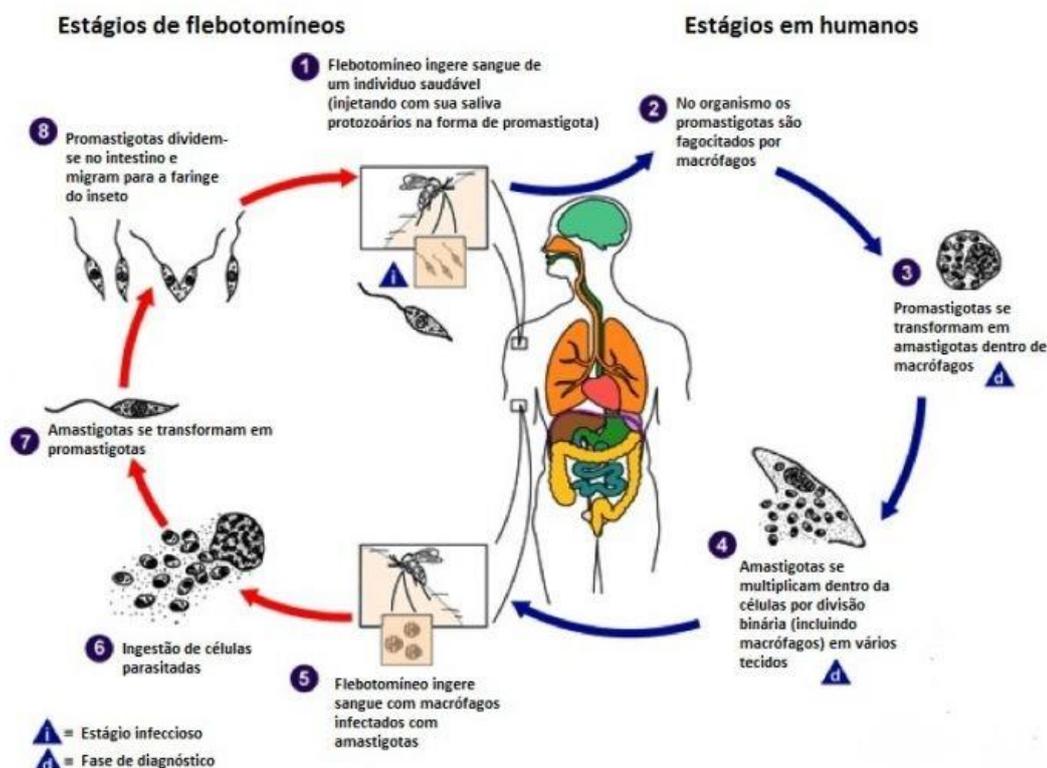
1.1. Leishmanioses: aspectos gerais e transmissão

As leishmanioses representam um grupo de doenças crônicas que afetam uma variedade de mamíferos, incluindo o homem. A transmissão ocorre quando fêmeas infectadas de insetos pertencentes ao gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomya*, ao realizarem o repasto sanguíneo, transferem as formas infectantes regorgitadas do parasito na derme do hospedeiro. Essas formas são rapidamente fagocitadas pelas células do sistema mononuclear fagocitário (SMF) e células polimorfonucleares (PMN) (BATES, 2007; BEATTIE & KAYE, 2011; KAYE & SCOTT, 2011).

Mais de 90 espécies de flebotomíneos apresentam importância médica, e cerca de 70 espécies animais são descritas como reservatórios naturais dos parasitos do gênero *Leishmania* (WHO, 2016). Atualmente mais 20 espécies diferentes de protozoários pertencentes ao gênero *Leishmania* são capazes de causar as Leishmanioses no homem (WHO, 2016). As espécies de *Leishmania* podem ser encontradas em duas formas diferentes durante seu ciclo de vida: amastigotas e promastigotas. As formas amastigotas são estruturas cilíndricas encontradas parasitando células do SMF do hospedeiro vertebrado, em órgãos como baço, fígado, pele, mucosas e tecidos linfoides (NEELAM & SHANO, 2010).

Após o repasto sanguíneo, as amastigotas migram para o lúmen do trato digestivo das fêmeas do inseto e passam por um processo de desenvolvimento extracelular no qual a célula desenvolve um flagelo (BEATTIE & KAYE, 2011). Essas novas formas são chamadas de promastigotas procíclicas, que, após sofrerem um processo de diferenciação, a metaciclogênese, tornam-se promastigotas metacíclicas infectantes que se acumulam na parte anterior do trato digestivo do vetor. O ciclo está completo quando o flebotomíneo, ao alimentar-se novamente, ingere as formas amastigotas ou as células infectadas presentes no sangue no hospedeiro (BATES, 2007; KAYE & SCOTT, 2011) (FIGURA 1).

Figura 1 – Ciclo de vida da *Leishmania*



Os flebotomíneos regurgitam na pele do hospedeiro as formas promastigotas do parasito (1) que são fagocitadas pelos macrófagos e outros fagócitos (2). Dentro dos fagócitos as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas (3) e infectam outras células fagocíticas mononucleares. Durante o repasto sanguíneo (5), os flebotomíneos adquirem as formas amastigotas do parasito, que migram para o intestino (6) do inseto e se diferenciam em formas promastigotas (7). Posterior a isso, as formas promastigotas são capazes de migrar para a faringe do inseto, diferenciando-se novamente em formas infectantes. Dessa forma, estão aptas para reiniciar um novo ciclo de transmissão.

Fonte: Global Health, 2019.

Parâmetros como a espécie e a genética do parasito em associação com o estado imunológico e nutricional do hospedeiro vão determinar o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença (REITHINGER *et al.*, 2007). Assim, as leishmanioses possuem duas principais formas: a Leishmaniose Visceral (LV), ou Kalar-azar, e a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA).

A LTA pode ser encontrada em regiões que se estendem desde o México até a Argentina (YADON, 2013), e é causada por diferentes espécies do parasito, como *L.*

braziliensis, *L. mexicana* (THOMAZ-SOCCOL *et al.*, 1993), *L. amazonensis* e *L. guianensis* (BARRAL *et al.*, 1995). A LTA compreende diferentes formas clínicas: Leishmaniose Difusa (LD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC) e Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL).

A LCL é a forma mais encontrada da doença e caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões ulceradas, únicas ou múltiplas, identificadas pela presença de bordas elevadas e/ou pápulas granulomatosa na derme, que podem curar-se de forma espontânea após alguns meses ou anos (SALMAN, RUBEIZ & KIBBI, 1999).

Parasitas do gênero *Leishmania* podem levar ainda ao desenvolvimento da Leishmaniose Disseminada (LD), caracterizada pela presença de centenas de lesões de padrões variados, papulares, nodulares e/ou, menos frequentemente, lesões ulceradas difusas, ao longo do corpo, muitas vezes comprometendo as mucosas. Além disso, a LD é uma doença grave, desfigurante, de difícil tratamento e de grande impacto socioeconômico (CARVALHO *et al.*, 1994; COSTA *et al.*, 1986).

Em alguns casos, anos após o tratamento para LCL e longos períodos de incubação, os parasitos podem tornar-se altamente invasivos e acometer mucosas e cartilagens das regiões nasofaríngeas e do palato, gerando graves ulcerações com intenso infiltrado inflamatório, podendo levar a dificuldades respiratórias e alimentares, bem como infecções secundárias (DAVID & CRAFT, 2009). O desenvolvimento da LMC muitas vezes está associado a um estado de imunossupressão do hospedeiro em decorrência de diversos fatores, como o uso de drogas e doenças que deprimem o sistema imunológico como a AIDS (ANTINORI, SCHIFANELLA & COBERLLINO, 2012; OKWOR & UZONNA, 2013).

1.2. Epidemiologia

As leishmanioses apresentam uma ampla distribuição mundial, sendo encontradas em mais de 89 países (REITHINGER *et al.*, 2007) (FIGURA 2). Atualmente, estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas encontram-se infectadas, especialmente em países de clima tropical e subtropical (WHO, 2010). Em todo o mundo são registrados de 700 mil a 1 milhão de novos casos, e aproximadamente 30 mil mortes por leishmaniose por ano (WHO, 2016).

No Brasil, casos de leishmaniose foram notificados em todos os estados, com uma ocorrência média de 26 mil casos por ano de 2000 a 2009, sendo que neste período foram 5 mil óbitos. Em 2015, a região Norte foi a região que mais notificou casos no Brasil, mais de

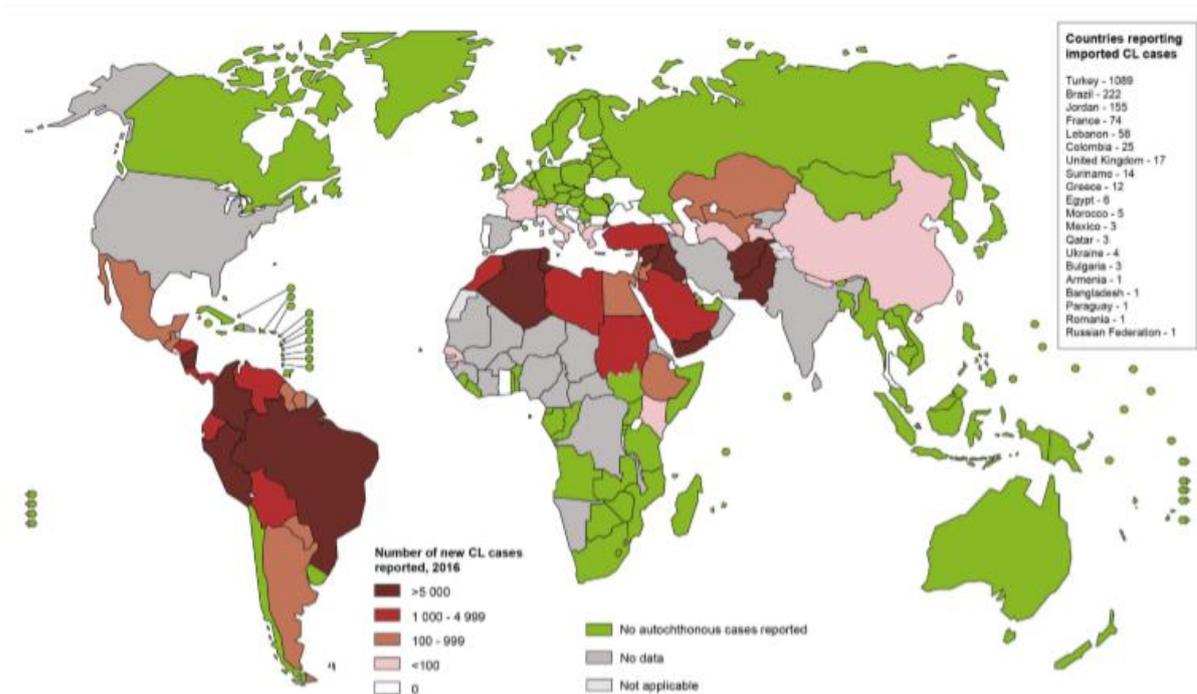
8,9 mil, seguidos pelas regiões Nordeste (5,1 mil) Centro-Oeste (2,9 mil), Sudeste (1,7 mil) e Sul (493) (PORTAL DA SAÚDE, 2017).

A *L. braziliensis* é a principal causa de LTA na América do Sul, sendo a LC é a leishmaniose mais comum. Aproximadamente 95% dos casos de LC ocorrem nas Américas, e dois terços da ocorrência mundial concentram-se em apenas 6 países: Afeganistão, Algeria, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Anualmente, são atribuídos a LC de 600 mil a 1 milhão de novos casos por ano em todo mundo (WHO, 2016). Apesar disto, a maioria dos pacientes é assintomática. A taxa de manifestação da doença corresponde a 3,7:1, indicando que a maioria dos pacientes com *L. braziliensis* não desenvolvem a doença, tendo portanto, uma infecção subclínica (FOLLADOR *et al.*, 2002).

No entanto, na última década, foi possível observar um aumento no número de casos de infecções por *Leishmania sp*, tanto em áreas endêmicas quanto em áreas não endêmicas (BEATTIE & KAYE, 2011). Isso se deve ao fato de que pacientes coinfetados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (Human Immunodeficiency Virus – HIV) apresentam maiores chances de desenvolver os sintomas clínicos da doença. Brasil, Etiópia e Índia são os países que apresentam as maiores taxas de coinfeção no mundo. Além disso, fatores como condições socioeconômicas, desnutrição, mobilidade populacional, mudanças climáticas e alterações no meio ambiente (WHO, 2016) favorecem o aparecimento de novos casos da doença.

Estudos já mostraram que o avanço da idade está diretamente associado ao desenvolvimento das formas disseminada e mucocutânea da leishmaniose. A idade do hospedeiro tem sido um fator determinante no desenvolvimento do tamanho da úlcera durante a LCL causada por *L. braziliensis* e no tempo de cura da lesão (JIRMANUS *et al.*, 2012). Além disso, a idade do indivíduo também representa um importante fator em relação aos efeitos colaterais aos antimoniais (ARAUJO-MELO *et al.*, 2010; DINIZ, COSTA & ESCALDA, 2012).

Figura 2 – Distribuição mundial da LC



Fonte: WHO, 2016.

1.3. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

Diferentes espécies do gênero *Leishmania* podem levar a LCL, no entanto a maioria das infecções permanecem assintomáticas (MURRAY *et al.*, 2005). As infecções subclínicas são muito comuns durante a LCL e podem ser identificadas através da resposta positiva ao teste de hipersensibilidade tardia (*Delayed Type Hypersensitivity* – DTH). No entanto pacientes assintomáticos, são caracterizados pela falta de lesão ou cicatriz e pela ausência de histórico de ulcerações crônicas (FOLLADOR *et al.*, 2002; SCHNORR *et al.*, 2012)

Após a picada do inseto vetor, os sintomas da LCL levam entre 2 e 8 semanas para aparecerem. Posterior a incubação, aparecem na pele pequenos nódulos ou pápulas únicas ou em pequenos números no local da picada do inseto (HOCHEDÉZ & CAUMES, 2008; SCHWARTZ, HATZ & BLUM, 2006). Essas manifestações levam ao desenvolvimento da linfadenopatia, característica comum na transmissão da *L. braziliensis* (BARRAL *et al.*, 1995), e que precede a formação da lesão que, posteriormente, desenvolve-se em úlceras bem delimitadas com bordas elevadas (PEARSON & SOUSA, 1996). As ulcerações podem ainda

se apresentar em uma variedade de formas, podendo ser redondas ou ovais, com base eritomatosa e apresentar infiltrado inflamatório; podem ter contornos regulares, com fundo avermelhado e granuloso com ou sem exsudato seropurulento (BRASIL, 2007)

Apesar de as características clássicas da lesão facilitarem seu reconhecimento, ulcerações atípicas decorrentes da LCL podem ser observadas em paciente de áreas endêmicas. Dessa forma, pode haver atraso ou dificuldade no diagnóstico, pois, clinicamente, essas lesões se assemelham a outras lesões cutâneas, como esporotricose, infecções fúngicas, lúpus eritematoso, eczema, entre outras. Portanto, o diagnóstico diferencial muitas vezes é necessário (AKILOV, KHACHEMOUNE & HASAN, 2007; BARI & RAHMAN, 2008; CEYHAN *et al.*, 2008).

Em alguns casos, as úlceras podem tornar-se crônicas (KROIDL *et al.*, 2014). Tamanho, severidade e extensão, aparência clínica, cura espontânea e tempo de duração da lesão podem variar dependendo da espécie do parasito e das características intrínsecas do hospedeiro (INCHÁUSTEGUI *et al.*, 1918; PETERS & KILLICK-KENDRICK, 1987). A presença do parasito leva a uma cicatrização lenta e crônica, e mesmo após anos de cicatrização os parasitos podem ser encontrados na pele do hospedeiro. As úlceras, em sua maioria, não causam dor e podem se curar de forma espontânea, no entanto o tratamento pode levar meses e deixar marcas permanentes na pele (PEARSON & SOUSA, 1996).

A resolução da lesão pode levar vários meses ou até anos, e mesmo após a cura terapêutica, o parasito ou seu material genético pode ser encontrado nas cicatrizes destes indivíduos (SCHUBACH *et al.*, 1998a; 1998b). Além disso, infecções bacterianas secundárias podem aparecer no local onde as lesões se desenvolveram, influenciando seu tamanho, forma e gravidade, levando ao atraso ou impedindo o processo de cura e cicatrização (PISCOPO & MALLIA AZZOPARDI, 2007).

A cura espontânea das ulcerações causadas durante a LCL pode garantir uma longa proteção contra a doença, e isso varia dependendo da espécie de *Leishmania* infectante. Já a resolução da doença gera o desenvolvimento de uma cicatriz permanente na pele do indivíduo (YANIK *et al.*, 2004). A cicatrização ocorre da periferia para o centro da lesão e pode deixar uma depressão na pele com pigmentação desigual e telangiectasia, ou, ainda, pode ocorrer uma cicatriz retrátil com centro hipopigmentado e periferia hiperpigmentada, bem como deformidade local devido à grande destruição tecidual (INCHÁUSTEGUI, 1918; SEIDELIN, 2016; VERA-IZAGUIRRE *et al.*, 2006)

Anos após a infecção, aproximadamente 25% dos pacientes acometidos, mas já curados, desenvolvem a forma mais severa da LTA, a LMC. Estudos já mostraram o aparecimento da LMC concomitantemente ao desenvolvimento das lesões causadas pela LCL (BOAVENTURA *et al.*, 2006; DIMIER-DAVID *et al.*, 1993). E ainda, após a cura terapêutica, cerca de 30% dos pacientes com LCL sofrem recidivas com o aparecimento de úlceras semelhantes às aquelas anteriormente desenvolvidas, sendo que a sintomatologia pode ser mais branda ou mais severa que no início da infecção (REITHINGER *et al.*, 2007).

Um fator importante na reativação da doença é a imunossupressão ocasionada, por exemplo, pela infecção por HIV, que, juntamente com a deficiência nutricional do indivíduo, leva ao agravamento da LCL e ao aparecimento de manifestações clínicas atípicas e de difícil tratamento (TALAT, ATTARWALA & SALEEM, 2014).

Muitos fatores são responsáveis por direcionar o curso da infecção e o desenvolvimento das diferentes formas clínicas da doença. Entre eles podemos citar o estado nutricional, a idade e a genética do hospedeiro, a carga parasitária e a rota de inoculação do parasito, a espécie do parasito e a competência do sistema imunológico (BASU & RAY, 2005; HANDMAN, ELSO & FOOTE, 2005). Além disso, a infectividade, importante no estabelecimento da infecção, vai depender de como o hospedeiro foi infectado, de qual o nível de infectividade do inseto, do número de picadas e de insetos presentes no momento da transmissão (HIRVE *et al.*, 2016).

Nesse contexto, a resposta imunológica do hospedeiro é crucial no desenvolvimento das manifestações clínicas da doença. Por exemplo, indivíduos infectados por *L. amazonensis* capazes de montar uma efetiva resposta imunológica mediada por células frequentemente desenvolvem a LCL; já indivíduos que apresentam defeitos na resposta mediada por células T desenvolvem LD, manifestações mais grave da doença (LOPES *et al.*, 2016; RIBAS-SILVA *et al.*, 2013; SAKTHIANADESWAREN, FOOTE & HANDMAN, 2009; SAMARANAYAKE *et al.*, 2016).

Estudos baseados em histopatologia e citometria de fluxo mostraram que as células T correspondem à metade do número de células presentes no infiltrado inflamatório durante a LCL, demonstrando, assim, a participação das células T no desenvolvimento da doença (RIDLEY *et al.*, 1980; MAGALHÃES *et al.*, 1986; DA-CRUZ *et al.*, 2005; MENDES-AGUIAR *et al.*, 2009).

Portanto, durante a patogênese da Leishmaniose, a complexa interação entre os componentes da resposta imunológica inata e adquirida do hospedeiro é responsável por guiar o curso da infecção, favorecendo o aparecimento dos sintomas da doença ou levando ao desenvolvimento da forma subclínica, a capacidade de cura espontânea e a cronicidade da infecção (SCOTT, 2005).

1.4. Resposta imunológica à LCL

Nas últimas décadas tem sido observado um aumento no número de casos de LCL em decorrência do número de pacientes transplantados, em uso de medicamentos imunossupressores ou infectados pelo HIV, condições que levam a supressão do sistema imunológico (AYATOLLAHI, FATTAHI & SHAHCHERAGHI, 2014; SHARQUIE & NAJIM, 2004).

De maneira geral, pacientes com LCL desenvolvem linfadenopatia regional, com aparecimento de uma pápula no local da picada (BARRAL *et al.*, 1993; 1995). Pouco tempo depois, o local da lesão torna-se ulcerado e com um intenso infiltrado inflamatório (PIRMEZ *et al.*, 1993). Nesse momento a presença do parasito torna-se escassa (BACELLAR *et al.*, 2000; GAZE *et al.*, 2006; RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; SALDANHA *et al.*, 2017), no entanto, é provável que um pequeno número deles persista nas cicatrizes cutâneas ao longo da vida do paciente (PEREIRA *et al.*, 2017).

Quando as formas promastigotas metacíclicas do parasito são regurgitadas pelo inseto vetor e penetram através da epiderme do hospedeiro, elas são fagocitadas por fagócitos, como os macrófagos residentes na pele, e por células de Langerhans (GUERRERO *et al.*, 2017). Já no interior dos fagolisossomos formados após a fagocitose, as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas e se proliferam rapidamente (KANE & MOSSER, 2000).

O controle da replicação do parasito está associado à produção das citocinas TNF- α e IFN- γ secretadas pelas células T antígeno-específicas capazes de promover a ativação de macrófagos ao estado leishmanicida. Nesse momento, os macrófagos produzem moléculas efetoras que podem eliminar o parasito intracelular (INIESTA *et al.*, 2001).

Estudos já mostraram que pacientes com LCL apresentam altos níveis de arginase no local da lesão. A arginase é uma enzima presente em macrófagos e neutrófilos que participa da produção de espécies reativas de oxigênio (ABEBE *et al.*, 2010; INIESTA *et al.*, 2006). Além disso, estudos *in vitro* demonstraram que, após o encontro com o parasito, os

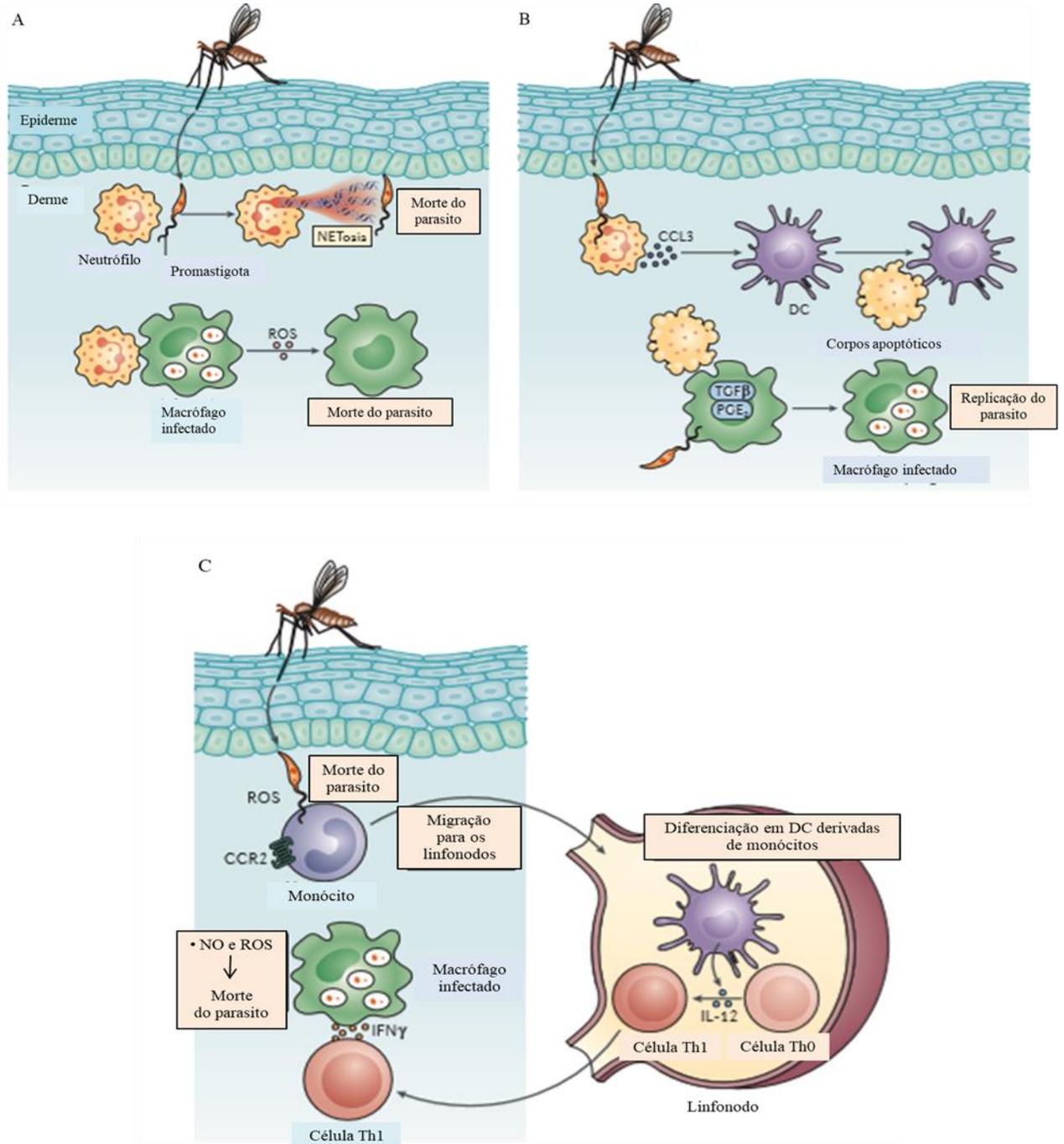
macrófagos derivados de monócitos passaram a expressar quimiocinas, como ligante de quimiocina 8 (CXCL8), ligante de quimiocina 2 (CCL2) e ligante de quimiocina 9 (CXCL9), atraindo neutrófilos, monócitos e células T ativadas para o sítio da infecção, o que contribui para a patogênese da lesão (GIUDICE *et al.*, 2012).

Os neutrófilos rapidamente recrutados para o sítio da infecção (PETERS *et al.*, 2008) possuem um papel dúbio no controle e na eliminação do parasito. Na infecção por *L. amazonensis*, os neutrófilos são capazes de liberar uma rede filamentosa, denominada NETs, do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*, capaz de eliminar as formas promastigotas (GUIMARAES-COSTA *et al.*, 2009; ROCHAEL *et al.*, 2015). Além disso, em infecções por *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, os neutrófilos auxiliam na eliminação do parasito por meio da interação com os macrófagos infectados. Os neutrófilos são capazes de expressar marcadores apoptóticos em sua superfície, estimulando a sua fagocitose pelas Células Dendríticas (DC) e pelos macrófagos. Esse mecanismo leva a uma diminuição da ativação das DC e, conseqüentemente, da apresentação atingênica para células CD4⁺ Th1 e T CD8⁺, favorecendo, assim, sobrevivência do parasito no interior da célula do hospedeiro (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2012; 2015) (FIGURA 3).

Algumas DC derivadas dos monócitos inflamatórios recrutados para a lesão, ao se diferenciarem, migram para os linfonodos (LEON; LOPEZ-BRAVO & ARDAVIN, 2007). Juntamente com essas células, residem células assassinas naturais (*Natural Killers* – NK) produtoras do IFN- γ responsável por aumentar a secreção de IL-12 pelas DC (SCHARTON & SCOTT, 1993). Portanto, as DC iniciam a resposta imunitária antígeno-específica e são, nesse momento, as principais fontes de secreção de IL-12, citocina essencial no desenvolvimento de uma resposta protetora mediada por células CD4⁺ Th1 (VON STEBUT *et al.*, 1998) (Figura 3).

Assim como as DC, os monócitos se encontram parasitados horas após a infecção e, ao contrário dos macrófagos, não necessitam da ativação por IFN- γ para a produção de altos níveis de espécies reativas de oxigênio durante a explosão respiratória (GONÇALVES *et al.*, 2011; NG *et al.*, 2008). A produção de espécies reativas de oxigênio e de óxido nítrico (*Nitric Oxide* – NO) correspondem aos dois principais mecanismos de eliminação do parasito, embora o NO seja mais importante em camundongo. O NO é capaz de se difundir através da membrana celular e eliminar os parasitos que se encontram no interior das células infectadas e no entorno destas (OLEKHNOVITCH *et al.*, 2014).

Figura 3 – Participação das células da imunidade inata e adquirida no controle da infecção por *Leishmania* spp



Durante a infecção, os neutrófilos possuem um papel dúbio no mecanismo de controle da parasitemia. Estes fagócitos participam tanto da eliminação do parasito extracelular, através liberação de armadilhas extracelulares (NETs) quanto de parasitas intracelulares por ativarem macrófagos infectados, induzindo a produção de espécies de oxigênio (a). Além disso, os neutrófilos apoptóticos localizados na pele recrutam Células Dendríticas (DC) e macrófagos para o sítio da infecção. Assim, os neutrófilos são capazes de suprimir a ativação dessas células, favorecendo replicação do parasito e regulando negativamente a ativação de células Th1 e T CD8⁺ (b). Em contrapartida, monócitos recrutados do sangue produzem altos níveis de espécies reativas de oxigênio, culminando na morte do parasito. Esses monócitos são capazes de se diferenciar em DCs e migrarem para os linfonodos. Uma vez nos linfonodos, os monócitos diferenciados atuam na diferenciação das células Th0 em Th1 através da produção de IL-12. As células Th1 ativadas migram para o sítio da lesão e secretam citocinas, como IFN γ , induzindo a produção de Óxido Nítrico (NO) e/ou intensificando a explosão respiratória pelo macrófagos promovendo a eliminação do parasito.

Em indivíduos imunocompetentes, o controle da parasitemia durante a LCL ocorre através da ativação de células Th1 produtoras de IFN- γ , IL-12 e fator de necrose tumoral α (TNF- α – Tumor Necrosis Factor α). No entanto, estudos já demonstram haver um equilíbrio entre as respostas Th1 e Th2 medida pela produção de IL-4 e IL-5, citocinas que fornecem suporte à resposta mediada por anticorpos e TGF- β e IL-10, responsáveis por regular o processo inflamatório (BACELLAR *et al.*, 2000; COFFMAN *et al.*, 1988). Dessa forma, a resposta Th2 relaciona-se à resposta anti-inflamatória e ao sucesso no estabelecimento da infecção (CASTELLANO *et al.*, 2009; NICODEMO *et al.*, 2012).

Além disso, durante a infecção por *L. braziliensis*, células Treg (CD4⁺ CD25⁺) podem ser identificadas na lesão dos pacientes com LCL. Essas células também são capazes de produzir altos níveis de IL-10 e TGF- β 1 e possivelmente contribuir no controle da exacerbação da resposta inflamatória (CAMPANELLI *et al.*, 2006).

A IL-10, citocina relacionada ao processo anti-inflamatório, tem a capacidade de controlar a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , sendo, portanto, associada ao controle da intensa resposta inflamatória responsável pela destruição tecidual (O’GARRA *et al.*, 2004). Além disso, durante a LC e LMC, a presença de IL-10 pode regular a produção de IL-17. A IL-17, apesar de contribuir na defesa do organismo contra diferentes patógenos, contribui com o processo inflamatório por meio do recrutamento de neutrófilos e com a produção de IL-1, IL-6 e TNF- α (KORN *et al.*, 2009). De forma semelhante, TGF- β é conhecida por suprimir a

diferenciação das células T CD4⁺, induzindo a conversão das células naive em células Treg, além de reduzir a produção de IL-2 e IFN- γ e suprimir a ativação de macrófagos, DC e NK (YOSHIMURA, WAKABAYASHI & MORI, 2010).

Estudos já mostraram que pacientes curados anteriormente, acometidos por LC ou LMC, diminuem não só a secreção de IFN- γ e TNF- α , mas, também, de IL-2, demonstrando a importância dessas citocinas na patogênese dessas doenças (CARVALHO *et al.*, 2013). Assim, é possível observar que 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).

Estudos mostraram que células mononucleares do sangue periférico (do inglês *Peripheral Blood Mononuclear Cells* – PBMC) de pacientes reinfetados produzem baixas concentrações de IFN- γ e altos níveis de IL-4 quando estimuladas com antígenos de leishmania, demonstrando a importância da resposta Th2 durante a fase crônica da doença (AJDARY *et al.*, 2000). No entanto, altas concentrações de IFN- γ podem ser observadas na fase inicial da doença e são reguladas pela produção de IL-10, citocina associada ao aumento da parasitemia no local da lesão. Portanto, o perfil de citocinas gerado pela resposta inflamatória pode variar de acordo com o tempo de infecção (LOUZIR *et al.*, 1998; PIRMEZ *et al.*, 1993; RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; ROCHA *et al.*, 1999).

Embora o controle da infecção dependa, principalmente, da produção de IFN- γ pelas células TCD4⁺, a infecção pela *Leishmania sp* também resulta na ativação e na expansão de células T CD8⁺ antígeno-específicas (BELKAID *et al.*, 2002).

Diferentemente das células T CD4⁺, as células T CD8⁺ são precocemente ativadas durante a infecção e produzem altos índices de IFN- γ responsáveis por direcionar a diferenciação das células Th1 (POMPEU *et al.*, 2001). Embora o perfil de resposta Th1 e a frequência de células T CD4⁺ produtoras de TNF- α e IFN- γ sejam decisivos no controle da parasitemia, a exacerbação desta resposta é responsável pela patogênese e progressão da lesão observada em pacientes com LC (BACELLAR *et al.*, 2000; CARVALHO *et al.*, 2007).

Em lesões antigas, grandes quantidade de células T CD8⁺ reativas ao antígeno de leishmania foram identificadas por Da-Cruz *et al.* (2005). Esses achados sugerem a participação das células T CD8⁺ no processo de cura dos pacientes com LC. De forma semelhante, a análise sistêmica da citotoxicidade das células TCD8⁺ durante a infecção por *L. major* pode ser associada à proteção (BOUSOFFARA *et al.*, 2004). No entanto, apesar de

muitos estudos demonstrarem a participação destas células nos mecanismo de resposta imunológica protetora, a presença de células T CD8⁺ citotóxicas tem sido associada ao dano tecidual durante leishmaniose mucocutânea e à patogênese das lesões cutâneas em indivíduos com LC (BARRAL-NETO *et al.*, 1995; BRODSKYN *et al.*, 1997).

Assim sendo, o estudo de biópsias retiradas de pacientes com LCL causada por *L. braziliensis* demonstrou que as células TCD4⁺ correspondem à principal fonte produtora de IFN- γ responsável pela intensa resposta inflamatória e pela eliminação do parasito e que, apesar das células TCD8⁺ também produzirem esta citocina, sua principal função é a citotoxicidade (SANTOS *et al.*, 2013).

Em indivíduos assintomáticos, a principal fonte de IFN- γ são células T CD8⁺ (CARDOSO *et al.*, 2015), no entanto a produção de IFN- γ e TNF- α nesses pacientes é menor quando comparada com pacientes que desenvolvem a doença (FOLLADOR *et al.*, 2002; NOVOA *et al.*, 2011), bem como a atividade de citotoxicidade dessas células. Nesse contexto, em infecções subclínicas, a diminuição da citotoxicidade não permite que o dano tecidual e a formação das lesões ocorram, diferentemente de pacientes com LC. A efetividade no controle da doença em pacientes assintomáticos conta com a participação das células T CD8⁺ na ativação de macrófagos e, conseqüentemente, na eliminação do parasito (CARDOSO *et al.*, 2015).

Portanto, é possível observar que a ação conjunta e complementar entre a resposta imunológica inata e adaptativa tem um papel crucial na proteção do hospedeiro contra *Leishmania* (GORAK *et al.*, 1998). E, que além disso, durante a LCL, a indução de um perfil de resposta Th1 leva à formação de células T de memória antígeno-específicas (KLING & KORNER, 2013), demonstrando a importância do processo inflamatório e da produção do IFN- γ /TNF- α no mecanismo de diferenciação das células T (RODRIGUES *et al.*, 2014).

1.5. Diferenciação das células T em células T de memória

As células T naive, ao encontrarem-se com o antígeno passam por um processo de proliferação e diferenciação, tornando-se células T efetoras. Estas migram para os tecidos periféricos e para locais onde haja processos inflamatórios em curso, a fim de eliminar ao patógeno (ZHANG & BEVAN, 2011). Após o processo agudo de infecção, a maioria das células efetoras sofre apoptose, e uma pequena parcela diferencia-se em células de memória antígeno-específicas (HAMMALUND *et al.*, 2003).

A células de memória podem ser caracterizadas pela sua capacidade de auto renovação e por desempenharem importantes funções efetoras, além disso, possuem habilidade para responder rápida e especificamente a reexposição antigênica. Mesmo na ausência do patógeno ou antígeno, essas células são capazes de persistirem durante longos períodos no organismo (SATHALIYAWALA *et al.*, 2013; SAULE *et al.*, 2006). Isso pode ser observado em indivíduos vacinados contra varíola, enfermidade mundialmente erradicada, que mesmo após 75 anos de imunização possuíam células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória específica contra o vírus (HAMMARLUND *et al.*, 2003; COMBADIÈRE *et al.*, 2004). No entanto, para manutenção da imunidade em longo prazo, o principal mecanismo e o mais efetivo é a estimulação patogênica periódica (GOURLEY *et al.*, 2004).

Até o nascimento a maioria das células T circulantes são naive. A diferenciação das células T naive em células T de memória vai depender da exposição aos diferentes antígenos ao longo da primeira década de vida do indivíduo, sendo que, durante este período, a frequência de células de memória aumenta consideravelmente (COSSARIZZA *et al.*, 1996). Nos primeiros trinta anos de vida, as células de memória já diferenciadas atingem a homeostase, ou equilíbrio, e permanecem assim por longos períodos durante a vida adulta do indivíduo (SAULE *et al.*, 2006). As células de memória podem circular por diferentes tecidos e órgãos dependendo da expressão de moléculas de superfície que, além de determinar sua localização ou endereçamento, auxiliam na prática de suas funções. Além disso, citocinas como IL-15 e IL-7 secretadas no local onde residem estas células vão possibilitar sua homeostase e sua sobrevivência, respectivamente (TOKOYODA *et al.*, 2009).

Desde a década de 80 a expressão de moléculas de superfície é utilizada para a identificação e classificação das células. Terry, Brown & Beverly (1988) e Cebrian *et al.* (1987) demonstraram que moléculas como CD45R (atualmente identificados como CD45RA e CD45RO) poderiam diferenciar as células T naive de determinadas populações de memória da mesma forma que a coexpressão de CD27 (membro da superfamília de receptores de TNF) e do receptor C-C de quimiocina 7 (CCR7 – *CC- chemokine receptor 7*), ambos responsáveis pelo endereçamento para os linfonodos (HAMANN *et al.*, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1999). CD45RA e CD45RO são proteínas de alto e baixo peso molecular, respectivamente, e correspondem a variação do gene que codifica para a expressão da molécula CD45R. CD45RO é um marcador de superfície encontrado na maioria das células T de memória e pode ser encontrado mais frequentemente em indivíduos idosos (CEBRIAN *et al.*, 1987;

SANDERS, *et al.*, 1988; TERRY, BROWN & BEVERLY, 1988; MERKENSCHLAGE *et al.*, 1987; AKBAR *et al.*, 1988; COSSARIZZA *et al.*, 1996).

As células de memória podem ser classificadas em subpopulações, a partir da expressão de diferentes moléculas de superfície, local em que residem e função que desempenham. Desta forma, as células T de memória central (T_{CM} – *Central Memory*), são células capazes de expressar altos níveis de moléculas coestimuladoras como CD28 e circulam entre os órgãos linfóides. Assim como as células naive, as células T_{CM} expressam os receptores de endereçamento CD62L (L-selectina) e CCR7 necessários para transmigração pelas vênulas do endotélio alto (*High Endothelial Venules* – HEV) e migração para seu sítio de localização (PICKER *et al.*, 1993).

Portanto, a combinação na expressão das diferentes moléculas de superfície pode definir as funções efetoras das células T de memória. Como por exemplo, células $T_{CM} CD8^+ CD45RA^- CD27^+$ são capazes de produzir IL-2 e IFN- γ , mas possuem baixa capacidade citolítica. Além disso, quando comparadas com as células naive, as T_{CM} respondem mais efetivamente à estimulação antigênica, são menos dependentes de coestimulação, são capazes de aumentar o nível de expressão de CD40L e, assim, serem mais efetivas na estimulação de DC e células B (GEGINAT *et al.*, 2004).

Diferentemente das células T_{CM} , células de memória efetora (T_{EM} – *Effector Memory*) não expressam mais estes marcadores de superfície como CD62L e CCR7 e passam a apresentar em sua superfície um grupo específico de receptores de quimiocinas e moléculas de adesão necessárias para o seu direcionamento para os locais onde o processo inflamatório se encontra ativo (SALLUSTO *et al.*, 2004). Além disso, células $T_{EM} CD8^+ CD45RA^- CD27^-$ são capazes de produzir altos níveis de TNF- α e IFN- γ , mas não IL-2, apresentam grande potencial citolítico e produzem elevados níveis de perforinas (HAMANN *et al.*, 1997; SALLUSTO *et al.*, 1999).

As células T_{EM} circulam, preferencialmente, entre o sangue e os tecidos periféricos sendo mais frequentemente encontradas nos pulmões, fígado e intestino, onde podem eliminar rapidamente as células infectadas e/ou secretar citocinas pró-inflamatórias (SALLUSTO *et al.*, 2004; WENG, AKBAR & GORONZY, 2009). Estudos revelaram que entre populações de células T de memória circulantes, as células T_{CM} são mais frequentemente encontradas como subpopulações de células $TCD4^+$, já as T_{EM} são mais abundantes como células $CD8^+$, mostrando que a proporção entre essas células pode variar (SALLUSTO *et al.*, 2004).

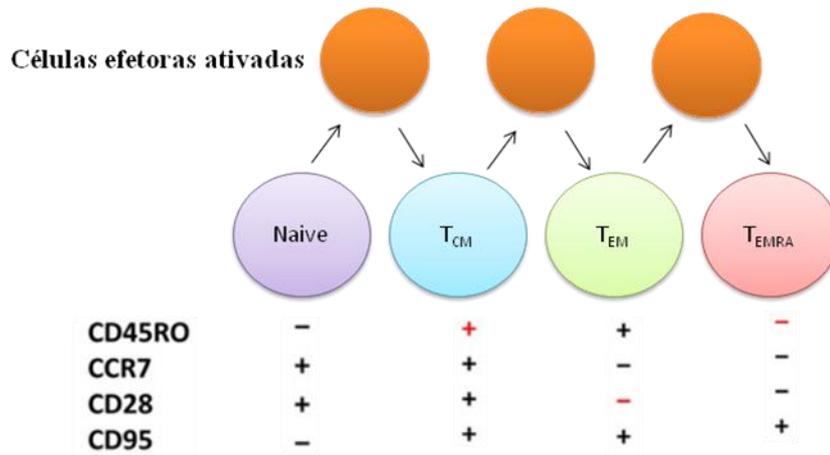
Assim como as células T_{EM} , células T de memória efetora altamente diferenciadas (T_{EMRA} – *Effector Memory RA*) circulam preferencialmente entre o sangue e os tecidos periféricos (WENG, AKBAR & GORONZY, 2009). Estas podem se diferenciar a partir de células T_{EM} na presença de IL-15. Nesse contexto, essas células passam a reexpressar o marcador de superfície de células naive CD45RA (LUGLI *et al.*, 2010), no entanto podem ser caracterizadas pela ausência da expressão da molécula de adesão CD62L, das moléculas coestimuladoras CD28 e CD27 e por possuem os menores telômeros entre as subpopulações de memória (ROMERO *et al.*, 2007).

As populações de células T_{EMRA} tendem a acumular-se com o avanço da idade e durante infecções virais persistentes (EFFROS, CAI & LINTON, 2003; LIBRI *et al.*, 2011; KOVAIOU & GRUBECK-LOEBENSTEIN, 2006; PAWELEC & DERHOVANESSIAN, 2011). Além disso, o aumento nos níveis das células T_{EMRA} tem sido associado à mortalidade, à redução da resposta imunológica do hospedeiro, à vacinação, à perda das populações antígeno-específicas e da capacidade replicativa e às doenças inflamatórias e autoimunes, como artrite reumatoide (BURNS & GOODWIN, 1997; COOK *et al.*, 1987; MUSHER *et al.*, 1986).

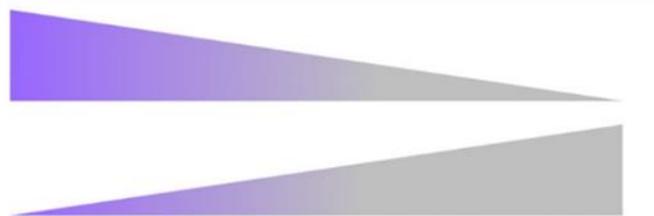
Células T_{EMRA} $CD45RA^+CCR7^-$ são mais frequentemente encontradas em subpopulações de linfócitos T $CD8^+$ (SALUSTO *et al.*, 1999), além disso, são células que respondem rapidamente ao desafio e apresentam habilidade de produzir altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e grânulos citotóxicos, apesar da sua baixa capacidade proliferativa decorrente de seu estado de maturação ou diferenciação. Esse processo é marcado pela expressão de marcadores extra e intracelulares, como KLRG-1 (*Killer-cell Lectin like Receptor G1*), CD57 (β -1, *3-Glucuronyltransferase-1*) (BRENCHLEY *et al.*, 2003) e a histona de fosforilação (H2AX – *Phosphorylation of Histone*), e é denominado de senescência imunológica ou replicativa (DI MITRI *et al.*, 2011).

Diante dos diferentes perfis das células T de memória, que incluem fenótipo, função e expressão gênica (RUFER *et al.*, 2003; SALLUSTO *et al.*, 1998), é possível propor que o amadurecimento das células de memória segue uma progressão linear de diferenciação, no qual células menos diferenciadas (células T naive e T_{CM}) dão origem a células mais diferenciadas (T_{EM} e T_{EMRA}) em resposta a estimulação antigênica ou à produção de citocinas que promovem a homeostase (GEGINAT, LANZAVECCHIA & SALLUSTO, 2003). A diferenciação progressiva das células de memória faz com que elas adquiram ou percam funções específicas (SALLUSTO *et al.*, 2004) (FIGURA 4).

Figura 4 – Diferenciação das células T de memória



- Capacidade de circular entre órgão linfóides.
- Capacidade regenerativa.
- Capacidade proliferativa.



- Capacidade de circular entre órgão periféricos.
- Capacidade funcional dependente do antígeno.
- Função efectora.

Após a seleção negativa, as células T naive deixam o timo em direção aos linfonodos. Uma vez em contato com o antígeno cognato reconhecido através do complexo de histocompatibilidade (Major histocompatibility complex- MHC) presente nas células apresentadoras de antígenos (Antigen-presenting cells - APCs) as células T naive tornam-se células T efectoras. As células T efectoras vão desempenhar as suas funções na tentativa de eliminar a infecção ou as células disfuncionais através da secreção de mediadores inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e grânulos citotóxicos. Após o fim da fase aguda e o controle da infecção, a grande maioria das células T efectoras sofre apoptose. A pequena população remanescente vai se diferenciar em células de memória. As células de memória antígeno-específicas são células que sobrevivem durante longos períodos no organismo, mesmo na ausência da estimulação antigênica, e apresentam uma importante resposta efectora após a reexposição ao antígeno. A constante estimulação antigênica, bem como o perfil inflamatório de doenças crônicas e também o avanço da idade do indivíduo, levam à diferenciação progressiva das células T de memória. A diferenciação destas células segue uma progressão linear, na qual as células menos diferenciadas dão origem às células mais diferenciadas (células T naive, T_{RM}, T_{CM}, T_{EM}, T_{EMRA}), fazendo com estas adquiram ou percam funções. A expressão de moléculas de superfície nas células T de memória irá determinar sua localização, bem como as funções que tais células irão desempenhar.

Nesse contexto, células $T_{RM} CD4^+$ têm demonstrado possuir um importante papel no controle das leishmanioses. Essas células são precocemente ativadas durante a infecção e são amplamente distribuídas no local da lesão. Além disso, elas podem se manter na pele por longos períodos mesmo na ausência do patógeno (GLENNIE *et al.*, 2015) assim como as células T_{CM} . Durante a reestimulação antigênica, as células T_{RM} produzem $IFN-\gamma$ e recrutam rapidamente células T efetoras para o local da infecção, promovendo assim o controle da infecção, garantindo uma ação protetora ao hospedeiro (NELSON & SCOTT, 2016). Além disso, a taxa de indivíduos curados infectados por *L. braziliensis* que apresentam novas lesões após a reinfecção é mínima, indicando que as células de memória, geradas a partir da exposição ao parasito, garantem uma proteção em longo prazo (JIRMANUS *et al.*, 2012).

A resposta protetora em indivíduos curados após a LC ou LMC, foi evidenciada por Carvalho *et al.*, (2013). Eles demonstraram que esses pacientes perdem grande parte das células Th1 antígeno-específica circulantes, comprovado pela ausência na produção das citocinas IL-2 e $IFN-\gamma$ analisadas após estimulação *in vitro*. No entanto, os pacientes mantiveram a capacidade de responder ao antígeno de *Leishmania* e apresentaram teste de hipersensibilidade tardia positivo. Esses achados sugerem, portanto, que a principal fonte de produção de $IFN-\gamma$ nestes pacientes são as células T $CD4^+$ de memória efetora (CARVALHO *et al.*, 2013), assim como demonstraram Keshavarz Valian *et al.* (2012), durante a LC causada por *L. major* ou *L. tropica*.

Células $T_{EM}, CD4^+$ e $CD8^+$ são mais frequentemente encontradas na lesão do paciente que na sua circulação sanguínea, sendo assim, são capazes de desempenhar suas funções e garantir a homeostase do tecido (WHERRY *et al.*, 2003). Em contrapartida, células T_{CM} são mais comumente encontradas na circulação. Uma vez diferenciadas em células T_{CM} antígeno-específicas, essas células migram para os linfonodos e, ao serem reestimuladas, apresentam grande capacidade proliferativa e funcionam como um importante reservatório para a diferenciação de células T_{EM} antígeno-específicas (SALLUSTO *et al.*, 2004; ZAPH *et al.*, 2004).

Além disso, Covre *et al.* (2019), ao estudarem o papel das células T_{EMRA} durante a LCL, demonstraram que estas células se apresentam em proporções significativamente maiores quando comparadas com as mesma população de células em indivíduos saudáveis. Além disso, as células T_{EMRA} de indivíduos infectados com *L. braziliensis* apresentam um quadro disfuncional de suas funções efetoras, especialmente células $CD8^+$, mostrando uma

exacerbação da resposta inflamatória mediada pela secreção de citocinas pro-inflamatórias e grânulos citotóxicos. Desta forma, após a ativação, células T_{EMRA} apresentam-se altamente citotóxicas, produzem altos níveis de IFN- γ , TNF- α , perforinas e granzimas (KALIA *et al.*, 2010; PIPKIN *et al.*, 2010).

As células de memória possuem um papel crucial na defesa do organismo contra uma variedade de patógenos, no entanto, a manutenção destas células ocorre a partir da proliferação de um *pool* limitado de células T pré-existentes que possuem um limite de divisões antes de cessar o seu ciclo (BRUNS *et al.*, 2009; CAMPISI & D'ADDA DI FAGAGNA, 2007). Um dos processos que favorece a expansão e diferenciação das células de memória é a estimulação antigênica (DI MITRI *et al.*, 2011; WALLACE *et al.*, 2011).

Fatores como a estimulação antigênica, longos períodos de estabilidade e numerosas divisões celulares, fazem com que as células de memória passem por um processo conhecido como senescência imunológica ou replicativa, mecanismo associado ao aumento da susceptibilidade a infecções. Esse processo relaciona-se em parte pela disfunção imunológica ocasionada pelo envelhecimento do sistema imunológico e pelo declive dos processos fisiológicos (COSSARIZZA *et al.*, 1996; GORONZY & WEYAND, 2005; SAULE *et al.*, 2006).

1.6. Imunorregulação

1.6.1. Senescência replicativa ou celular

A senescência replicativa possui um importante papel na regeneração (JUN & LAU, 2010) e remodelamento tecidual durante o desenvolvimento embrionário e após o dano gerado aos tecidos (JUN & LAU, 2010; RAJAGOPALAN & LONG, 2012; MUÑOZ-ESPIN *et al.*, 2013; STORER *et al.*, 2013) ocasionado por diferentes fatores. Em tecidos jovens, células senescentes interrompem sua proliferação e secretam mediadores pró-inflamatórios com a finalidade de recrutar fagócitos a fim de favorecer sua fagocitose e promover a renovação tecidual (BAVIK *et al.*, 2006). Esse processo é benéfico ao organismo, uma vez que o mecanismo senescência/limpeza/regeneração promove sua homeostase. No entanto, esse equilíbrio pode ser interrompido durante o avanço da idade e também durante infecções crônicas que apresentem um perfil pró-inflamatório persistente, favorecendo o acúmulo de células senescentes (MUÑOZ-ESPIN & SERRANO, 2014).

A senescência replicativa ou celular foi descrita formalmente pela primeira vez na década de 1950 por Hayflick & Moorhead (1961). Em seu experimento os pesquisadores demonstraram que fibroblastos mantidos em cultura possuíam uma capacidade limitada de divisões (conhecido como limite de Hayflick), mecanismo irreversível (CAMPISI & D'ADDA DI FAGAGNA, 2007). Naquele momento era sabido apenas que essas células apresentavam uma vida útil de divisões limitada, posteriormente conhecida como senescência replicativa ou celular (HAYFLICK, 1965; HAYFLICK & MOORHEAD, 1961).

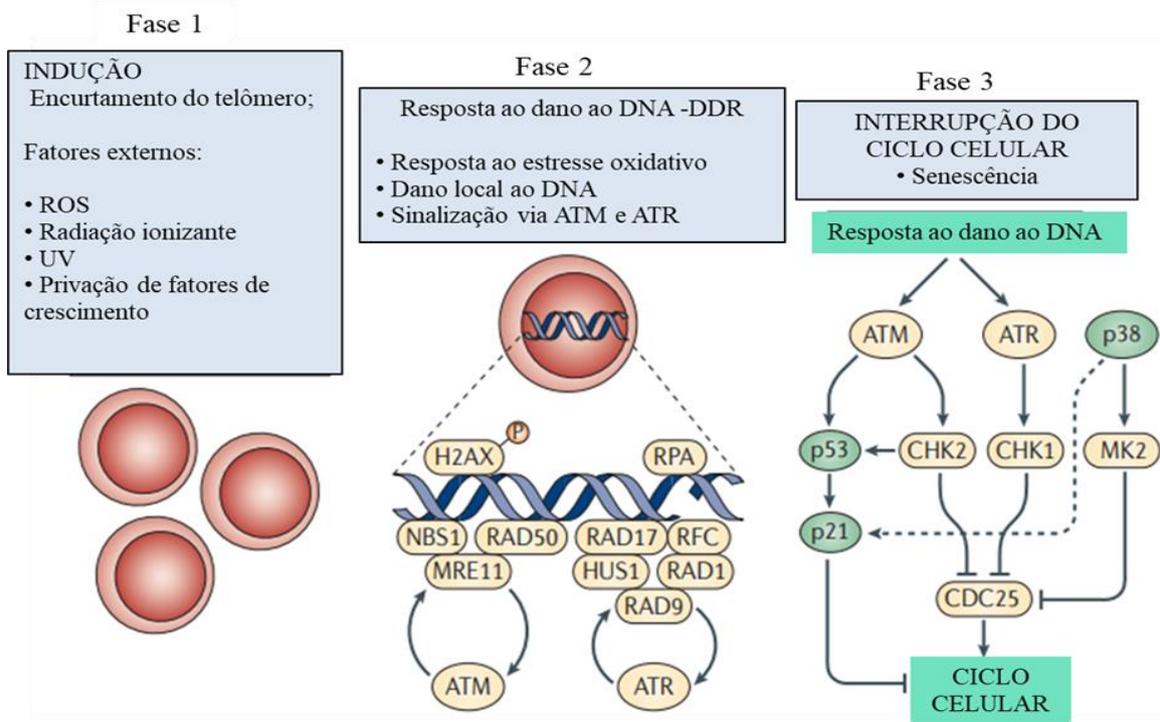
Durante o processo de divisão celular, a célula promove a extensão do DNA telomérico a fim de compensar o seu encurtamento promovido pela ação das nucleases. Para que isso ocorra, um complexo sistema é acionado a fim regular o mecanismo de extensão do telômero e permitir que a reposição do DNA telomérico seja ideal (LEVY & BLACKBURN, 2004). Esse processo requer a participação da enzima telomerase que consiste em uma transcriptase reversa ribonucleoprotéica formada por uma unidade catalítica denominada hTERT e uma porção de RNA chamado de hTERC ou hTRC (BLACKBURN, 2005).

O telômero é um complexo nucleoprotéico hexamérico composto por uma sequência simples de repetidas bases nitrogenadas localizado na região terminal do cromossomo de células eucariontes (MATTERN *et al.*, 2004; BLACKBURN, 2005). Esse complexo de DNA e proteínas é responsável por proteger o DNA cromossomal da degradação enzimática, por impedir a ligação deste com outros telômeros ou ainda com partes degradadas de DNA. Esses mecanismos têm a finalidade de evitar recombinações inapropriadas que podem levar a instabilidade do DNA e ainda permitir a perda de informações genéticas repassadas durante a divisão da célula (BLACKBURN, 2005).

A cada divisão celular, o DNA do telômero é degradado (LEVY *et al.*, 1992; DAHSE *et al.*, 1997; BLACKBURN, 2005). Em média, as células T perdem cerca de 50 pb de DNA telomérico a cada divisão, mas essa perda pode ser aumentada durante a infecções virais crônicas, como no caso de pacientes que recebem tratamento anti-retroviral (ART) para HIV-1, onde a perda pode chegar a 250 pb de DNA (HOTCKISS *et al.*, 1999). Quando os telômeros se tornam criticamente curtos ou quando o DNA sofre algum dano, as células desencadeiam a ativação proteína γ H2AX (PASSOS *et al.*, 2010), componente de um complexo de histonas (CAMPISI & D'ADDA DI FAGAGNA, 2007), desencadeando a ativação das vias de sinalização da resposta ao dano no DNA (Damage DNA Response -

DDR) no interior da célula, levando a interrupção do ciclo celular (AKBAR & HENSON, 2011) (FIGURA 5).

Figura 5 – Desenvolvimento da senescência celular



A indução persistente dos danos gerados ao DNA, dependentes ou independentes do telômero (1), desencadeia a ativação das proteínas quinases ATM/ATR que, por sua vez, levam ao recrutamento de moléculas de sinalização associadas à resposta ao dano ao DNA (DDR) no interior da célula (2). Dependendo da extensão, da natureza e da localização do dano gerado ao DNA, a DDR desencadeia diferentes mecanismos fisiológicos, como apoptose, parada transitória ou interrupção permanente do ciclo celular, caracterizando a senescência replicativa. Fonte: Adaptado de AKBAR & HENSON, 2011.

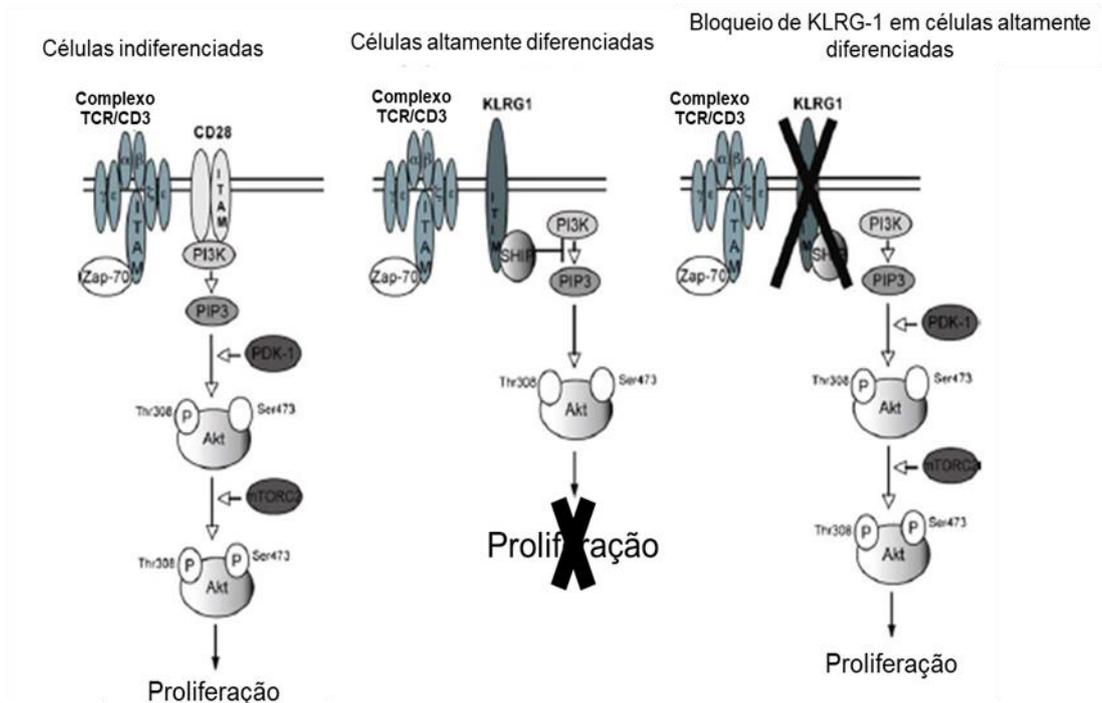
Diferente das demais células somáticas, os linfócitos T humanos são capazes de sobreviver por longos períodos dentro do organismo como células de memória. Isso só é possível devido a sua capacidade de restaurar a ação enzimática da telomerase, essencial na manutenção do potencial proliferativo da célula (HODES, HATHCOCK & WENG, 2002). No entanto, após a ativação recorrente proveniente da estimulação antigênica crônica, a diferenciação progressiva das células T faz com que estas desenvolvam um fenótipo de células terminalmente diferenciadas ($T_{EMRA} - CD45RA^+ CD27^- CD28^- CCR7^-$) (DI MITRI *et*

al., 2011; WALLACE *et al.*, 2011). Junto a esse processo, as células T_{EMRA}, assim como as células T_{EM}, perdem a capacidade de regulação da enzima telomerase levando à erosão do telômero e à perda progressiva da capacidade proliferativa (AKBAR & VUKMANOVIC-STEJIC, 2007; BLACKBURN, 2005; FLETCHER *et al.*, 2005), característica do processo de senescência celular dependente do telômero (FUMAGALLI *et al.*, 2012).

Di Mitri *et al.* (2011) relataram que o controle da atividade da telomerase nestas células pode estar relacionado, em parte, com a ativação espontânea de proteína quinase p38 (MAPK – *Mitogen-Activated protein Kinase*), por mecanismo ainda desconhecidos. Portanto, o aumento na ativação de p38 em células T_{EMRA} pode regular negativamente a ação da enzima telomerase e induzir a apoptose destas células (GORONZY *et al.*, 2005).

Apesar de células T_{EMRA} apresentarem um encurtamento dos seus telômeros, estas possuem telômeros mais longos que outras células de memória, indicando que a senescência pode estar associada a mecanismos independentes da erosão do telômero (DI MITRI *et al.*, 2011). Assim sendo, outros elementos podem levar a interrupção do ciclo celular como fatores externos: produção de espécies reativas de oxigênio, a ativação da proteína p53 e o estresse ambiental; ou a expressão de marcadores de supressão imunológica como KLRG-1 (HENSON & AKBAR, 2009) (FIGURA 6), CD57 (BRENCHLEY *et al.*, 2003) provocada pela estimulação antigênica persistente e inflamação crônica.

Figura 6 – Senescência replicativa marcada pela expressão do marcador de superfície KLRG-1



A via de sinalização da proteína quinase B (Akt), ativada através sinais indiferenciados de CD28, resulta em várias funções celulares diferentes, incluindo a iniciação da proliferação de célula (1). A perda na expressão da molécula coestimuladora CD28 em associação com diferentes fatores como a expressão de KLRG-1 faz com que a células percam sua capacidade proliferativa. KLRG-1 possui um motivo ITIM capaz de recrutar a fosfatase SHP-1 que por sua vez bloqueia a ação da fosfatidil inositol 3 quinase (PI3K) impedindo a fosforilação de AKT e consequentemente a proliferação celular (2). O bloqueio na expressão de KLRG-1 faz com que as células retomem sua capacidade de proliferação (3).
 Fonte: Adaptado de MAHNKE *et al.*, 2013.

Embora as células T_{EM} e T_{EMRA} apresentem defeitos de proliferação, elas ainda apresentam uma potente resposta efetora (DUNNE *et al.*, 2012; HAMANN *et al.*, 1997; LIBRI *et al.*, 2011). As células senescentes desempenham um importante papel na imunorregulação da resposta inflamatória através da produção de citocinas, moléculas de adesão (MINAMINO & KOMURO, 2007; FREUND *et al.*, 2010;), fatores de crescimento, quimiocinas e proteases, característica conhecida como fenótipo secretor associado à senescência (Senescence Associated Secretory Phenotype – SASP) (COPPE *et al.*, 2008). Esta, portanto, confere uma diferença entre as células T senescentes das células T exaustas, pois células que apresentam sinais de exaustão além de apresentarem defeitos de proliferação

perdem progressivamente sua capacidade efetora (KUCHROO *et al.*, 2008; WHERRY *et al.*, 2003).

A inflamação crônica é caracterizada pela presença, mesmo que em baixas concentrações, de elementos pertencentes à resposta pró-inflamatória e/ou a estimulação antigênica persistente. Esse processo pode ser associado a diferentes doenças crônicas relacionadas à idade do paciente como desordens neurodegenerativas, doenças cardiovasculares e câncer (NATHAN & DING, 2010).

Estudos já mostraram haver um aumento no número de células senescentes em diferentes tecidos de indivíduos idosos (CAMPISI *et al.*, 2011), e que estas células desempenham um importante papel na imunorregulação da resposta inflamatória por meio do seu perfil SASP (COPPE *et al.*, 2008; FREUND *et al.*, 2010; MINAMINO & KOMURO, 2007), responsável pela manutenção do processo inflamatório. Esse perfil pró-inflamatório gerado pelas células senescentes pode ser importante na prevenção de tumores malignos por favorecerem a eliminação das células doentes (KANG *et al.*, 2011; LUJAMBI *et al.*, 2013). No entanto, a senescência associada à inflamação crônica pode promover a progressão de tumores (CAMPISI *et al.*, 2011) bem como outras doenças relacionadas à idade cronológica do indivíduo como osteoporose, catarata (BAKER *et al.*, 2011) e aterosclerose (ROSS, 1999).

Dessa forma, pesquisadores já relataram que indivíduos idosos, previamente infectados com citomegalovírus (CMV), apresentam altos níveis de IgG anti-CMV e um aumento significativo na viremia quando comparados com indivíduos jovens (PARRY *et al.*, 2016). Além disso, indivíduos idosos apresentam um aumento na expansão oligoclonal das células CD8⁺ devido a aumento na frequência e na gravidade das recidivas durante a infecção pelo CMV, quando comparados com indivíduos mais jovens (STOWE *et al.*, 2007). E ainda, as várias implicações geradas a partir da infecção por CMV em indivíduos idosos pode levar a redução progressiva da eficácia à vacinação e também da habilidade em responder à infecção pelo vírus da influenza, fazendo com que o indivíduo idoso adoça mais facilmente em decorrência do envelhecimento do seu sistema imunológico (GOODWIN, VIBOUD & SIMONSEN, 2006; SIMONSEN *et al.*, 2007).

Da mesma forma, estudos demonstraram que, em infecções causadas pelo HIV, às células T CD8⁺ antígeno-específicas desenvolvem características de células senescentes, como a perda progressiva da sua capacidade proliferativa e a redução no tamanho dos seus telômeros, favorecendo o mecanismo de apoptose (BRENCHLEY *et al.*, 2003). Nesse

contexto, a diminuição no número de células TCD8⁺ favorece o estabelecimento da doença e a piora do prognóstico, levando ao aumento de infecções oportunistas.

A presença do patógeno, mesmo que em níveis extremamente baixos, impõe um estresse permanente ao sistema imunológico (KAHAN *et al.*, 2015). Isso faz que seja gerada uma intensa resposta mediada pelas células T CD8⁺, levando a morte das células, que se proliferaram, na tentativa de manter a homeostase do linfonodo (PENNOCK *et al.*, 2013). As células que sobrevivem são selecionadas e vão garantir o *pool* de células de memória antígeno-específicas com importante potencial proliferativo que irão responder a uma nova infecção (BELLON & NICOT, 2017).

O aumento no número de células senescentes com perfil fenotípico altamente diferenciado também está relacionado a doenças graves, que podem levar o indivíduo ao óbito, como doenças autoimunes e infecções crônicas persistentes (COOK *et al.*, 1987; BURNS & GOODWIN, 1997).

Estudos já demonstraram que, em pacientes com LMC e LCL, a diferenciação das células TCD8⁺, marcada pela expressão de marcadores senescência, pode ser associado à progressão da doença. Pesquisas mostraram que pacientes com níveis elevados de células T_{EMRA} tendem a sofrer maiores números de recidivas e são menos responsivos ao tratamento. Além disso, esses pesquisadores puderam observar que pacientes coinfectados com *Trypanosoma cruzi* possuem um número ainda maior de células com perfil altamente diferenciado quando comparados com pacientes que apresentavam apenas uma das enfermidades (ALBAREDA *et al.*, 2006; APPAY & ROWLAND-JONES, 2004; PARODI *et al.*, 2016).

Covre *et al.*, (2019) evidenciaram que durante a infecção por *L. braziliensis* pacientes com LCL, apresentam um acúmulo de populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ com características de senescência replicativa. Essas células expressam um conjunto de marcadores de supressão extra e intracelulares como CD57 (PARODI *et al.*, 2016) KLRG1, p38 MAPK e da histona H2AX fosforilada (γ H2AX). Além disso, pode ser observado também que populações de células T de memória de pacientes com LCL possuem uma redução na atividade da enzima telomerase decorrentes da estimulação antigênica persistente e do processo inflamatório crônico (COVRE *et al.*, 2019). Eles demonstraram também que a infecção por *L. baziliensis* leva ao aumento na produção de citocinas inflamatórias e grânulos citotóxicos pelas células TCD8⁺ senescentes (T_{EMRA}) semelhante ao perfil secretor associado

a senescência (SASP). Além disso, os pesquisadores mostraram que células T_{EMRA} se acumulam na circulação e apresentam uma correlação positiva com o tamanho da lesão de pacientes com LCL, demonstrando a importância destas células na patogênese da doença (PARODI *et al.*, 2016; COVRE *et al.*, 2019).

De forma semelhante, pesquisas demonstraram que durante a infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), os níveis KLRG1 encontram-se elevados e que esses níveis sofreram redução após o tratamento (HENAO-TAMAYO *et al.*, 2011). Isso sugere uma correlação positiva entre a expressão de KLRG1 e a progressão/cronificação da tuberculose.

Nesse contexto, é importante perceber que mecanismos imunorregulatórios estão envolvidos em uma variedade de processos relacionados à resposta imunológica e são responsáveis por determinar o curso da infecção ou o estabelecimento e o desenvolvimento de diferentes doenças infecciosas e crônicas. Portanto, estudos que visem o entendimento de mecanismos como a senescência celular, bem como exaustão e anergia das células T, vêm se destacando nas últimas décadas (FIGURA 7).

1.6.2. Anergia celular

O conceito de anergia foi primeiramente descrito em 1908 por Von Pirquet para descrever a ausência de resposta ao teste de hipersensibilidade tardia a tuberculina em indivíduos infectados com o vírus do sarampo (VON PIRQUET, 1908 *apud* TURK, 1987). Em 1980, Nossal & Pike utilizaram esse termo ao perceberem que a estimulação antigênica, em camundongos, promovia tolerância em células B. A partir desse momento, surgiu também o termo anergia clonal, pois os pesquisadores observaram que a tolerância gerada era antígeno-específica, diferentemente dos testes realizados na pele (NOSSAL & PIKE, 1980).

O mecanismo de tolerância pode ser dividido em tolerância central e periférica. A tolerância central faz com que células T que apresentam alta afinidade por antígenos próprios ou apresentam autoreatividade sejam eliminadas durante seu desenvolvimento no timo ou sofram diferenciação em células Treg (KLEIN *et al.*, 2014). Uma vez que a eliminação das células T autorreativas não seja eficiente, o mecanismo de tolerância periférica é ativado. Esse mecanismo pode promover a eliminação de células autorreativas antígeno-específicas logo após a ativação de seu TCR, e pode ainda promover a anergia destas células e/ou suprimir suas atividades por meio da ativação das células Treg (DAVIS, 2015; MUELLER, 2010).

Portanto, o mecanismo de tolerância pode ser definido como aquele no qual a célula encontra-se inativa funcionalmente mesmo após o encontro com o antígeno, no entanto sobrevive por longos períodos em estado de hiporesponsividade (DAVIS, 2015; MUELLER, 2010).

Durante processo de anergia ou hiporesponsividade, as células T passam a produzir baixas concentrações da citocina IL-2 e são incapazes de se proliferar diante da reestimulação antigênica devido à deficiência na coestimulação e/ou a forte estimulação coinibitória. Portanto, a anergia pode ser caracterizada por uma variedade de limitações funcionais que incluem divisão celular, diferenciação e produção de citocinas (SCHWARTZ, 1989; 1990; 2003).

A anergia é um estado específico para as células Treg. As diferentes populações de células Treg, sendo estas as naturais (originárias do timo) ou induzidas (formadas a partir de precursora $CD4^+CD25^-$ nos órgãos linfoides periféricos), eram descritas como anérgicas (SCHWARTZ, 2003).

Além disso, células Treg expressam constitutivamente a molécula ou receptor coinibitório CTLA-4 em sua superfície, uma característica particular do mecanismo de anergia destas células. CTLA-4 é uma molécula que compete com receptor CD28 nas APCs por apresentar grande afinidade pelo seu ligante, mas ao contrário de CD28 não age de forma direta na sua regulação. Este mecanismo inibe a ação de CD28, inviabilizando a transdução de sinal para o interior da célula e conseqüentemente sua proliferação (CARRRENO *et al.*, 2000). Dessa forma, a expressão e ativação de CTLA-4 evita a exacerbação da resposta imunológica por limitar a expansão clonal de células T antígeno-específicas (LEE *et al.*, 1998; MARENGERE *et al.*, 1996).

O receptor CTLA-4 pode induzir mecanismos supressores responsáveis por ativar diferentes proteínas quinases, como Akt, essenciais para a via de ativação celular dependente de CD28 (MARENGERE *et al.*, 1996; LEE *et al.*, 1998; MILLWARD, ZOLNIEROWICZ & HEMMINGS, 1999).

A anergia é um processo autônomo e a presença do antígeno pode ser ou não um fator essencial neste momento. Do mesmo modo o estado de hiporesponsividade pode ser revertido ou não pela presença de IL-2, dependendo das circunstâncias nas quais as células se encontram. Desta forma, a anergia das células T pode ser um importante mecanismo de

proteção do organismo contra o desenvolvimento de doenças autoimunes por induzir tolerância periférica (DAVIS, 2015; MUELLER, 2010; WELLS, 2009).

Muitos estudos têm focado no esclarecimento dos mecanismos da anergia associados ao desenvolvimento das doenças autoimunes e do câncer. Durante o desenvolvimento do tumor, a resposta imunológica é afetada, sendo, portanto, ineficiente por causa da ativação ineficaz das células T antígeno específicas, capazes de reconhecer e destruir as células tumorais (BAITSCH *et al.*, 2012)

A evidência da anergia das células T durante no câncer é indireta, uma vez que existe uma ausência na identificação de marcadores celulares que caracterizem a perda funcional destas células durante o processo. No entanto, estudos já descrevem haver um desequilíbrio na expressão de receptores da família B7 no microambiente capazes de estimular ou inibir a resposta imunológica mediada pelas células T. Assim sendo, durante o desenvolvimento do tumor, as APCs expressam, dentre outros, elevados níveis de receptores, como B7-H1 (PD-L1) e B7-DC (PD-L2) e baixos níveis de B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), promovendo um ambiente propício para o desenvolvimento do câncer em decorrência da baixa expressão de receptores coestimuladores e aumento na expressão de receptores coinibitórios. Estudos já demonstraram que o bloqueio de receptores da família B7 podem reduzir o crescimento tumoral *in vivo* (CURIEL *et al.*, 2003; ZOU & CHEN, 2008).

O conjunto de fatores transcricionais que promovem a anergia é complexo e muitos destes fatores também estão envolvidos no mecanismo de exaustão celular das células T. Apesar disso, células TCD8⁺ exaustas ou anérgicas possuem diferenças funcionais, como demonstrado em modelo de infecção crônica por LCMV. Ademais, evidências sugerem que o desenvolvimento dessas diferentes populações de células T seja diferente durante a resposta imunológica antitumoral (CRESPO *et al.*, 2013; KIM & AHMED, 2010; WHERRY *et al.*, 2007).

A exaustão celular é um estado disfuncional progressivo ou gradual das células T, que varia de acordo com o contexto e da quantidade de antígenos presente no microambiente; em contrapartida, a anergia ocorre precocemente durante a formação tumoral, por exemplo (KIM & AHMED, 2010; WHERRY, 2011; WHERRY & KURACHI, 2015).

1.6.3. Exaustão celular

A exaustão celular pode ser definida pela redução da capacidade efetora das células T, caracterizada pela baixa expressão de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ e citotoxicidade, além da redução da capacidade proliferativa destas células favorecendo a deleção das populações antígeno específicas. Este mecanismo torna as células mais resistentes à reativação (WHERRY *et al.*, 2003; WHERRY, 2011) e ocorre em decorrência da estimulação persistente ou repetidas em ambientes inflamatórios crônicos como durante o câncer, o desenvolvimento de doenças autoimunes ou infecções crônicas (CRESPO *et al.*, 2013).

Para que se tenha uma resposta imunológica eficiente, contra patógenos intracelulares, é necessário que as células T apresentem baixos níveis de apoptose e elevada capacidade proliferativa e polifuncional (LUKENS *et al.*, 2008).

Durante a fase aguda da infecção, as células T são capazes de eliminar o patógeno, levando a formação de células de memória capazes de responder de forma mais rápida e eficiente a uma reinfecção (WHERRY, 2011). No entanto, durante a infecção crônica a eficiência das células T torna-se menos notável, e estas células podem sofrer apoptose ou perda progressiva de suas funções efectoras levando a exaustão celular (BLACKBURN *et al.*, 2009).

Vários fatores contribuem para a exaustão das células T durante o processo infeccioso, entre eles estão a carga parasitária do hospedeiro, o tempo de infecção, os níveis de células CD4⁺ e células T reguladoras e o tipo e células apresentadora de antígeno (ANGELOSANTO & WHERRY, 2010). Em infecções virais, a concentração nos níveis do patógeno apresenta uma função importante na exaustão de células T CD8⁺, e essas células possuem um papel crucial na progressão de doenças crônicas (BETTS *et al.*, 2006; WHERRY, 2011). Em contrapartida, em infecções parasitárias, a carga parasitária apenas parece não ser capaz de levar ao mecanismo de exaustão celular, sendo, portanto, o somatório dos fatores citados acima, responsáveis por este processo (SNYDER *et al.*, 2008).

Grande parte dos agentes infecciosos é capaz de evadir às defesas do sistema imunológico do hospedeiro. Alguns antígenos bacterianos, como proteína α -cristalina, são de grande importância para a sobrevivência das bactérias no organismo. A proteína α -cristalina é capazes de impedir a fusão do fagolisossomo, impossibilitando a degradação da estrutura bacteriana pelos macrófagos e pelas células dendríticas (SIDDIQUI *et al.*, 2014; SREEJIT *et*

al., 2014), o que favorece a redução nos níveis de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras e o aumento na produção de citocinas supressoras, como TGF- β , IL-10 e IL-4 (ROBERTS *et al.*, 2007).

As citocinas TGF- β e IL-10 inibem a ação das células do sistema imunológico responsáveis pela resposta inflamatória, regulam de forma negativa a expressão de moléculas coestimuladora e favorecem a expressão de receptores inibitórios, também conhecidos como marcadores de exaustão celular, como PD-1, TIM-3 e LAG-3 (SIDDIQUI *et al.*, 2014; SREEJIT *et al.*, 2014). O mecanismo de exaustão celular pode ser considerado uma estratégia de evasão do sistema imunológico elaborado pelas bactérias, dificultando a ação da resposta imunológica adaptativa durante a infecção crônica (JURADO *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2013).

Embora a expressão de receptores inibitórios seja benéfica na contenção do progresso de doenças autoimunes, esse princípio não se aplica ao desenvolvimento de tumores malignos e doenças infecciosas crônicas (McKINNEY *et al.*, 2015).

Estudos utilizando a infecção por *M. tuberculosis* (*Mtb*), demonstraram que altos níveis de PD-1 são expressos em células T CD4⁺ e CD8⁺ tanto em pacientes suscetíveis quanto em pacientes resistentes ao tratamento (JURADO *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2013; SADA-OVALLE *et al.*, 2015). O aumento no nível de expressão de receptores inibitórios leva ao declínio na capacidade efetora das células T antígeno-específicas que, em associação com a exacerbação na produção de citocinas pró-inflamatórias, é responsável pelo insucesso/falha da resposta imunológica na eliminação do *Mtb* e também pelo agravamento das lesões teciduais que ocorrem durante a tuberculose humana (ADEKAMBI *et al.*, 2012; KEE *et al.*, 2012; SINGH *et al.*, 2014).

Os receptores coinibitórios podem influenciar a qualidade funcional da resposta imunológica mediada por células T, e seu bloqueio pode favorecer uma modulação positiva no reestabelecimento resposta imunológica (JURADO *et al.*, 2008). Bandaru *et al* (2014) e Hassan *et al* (2015) mostraram, utilizando PBMC de pacientes com tuberculose, que através do bloqueio de PD-1 as células T são capazes restaurar sua capacidade proliferativa e efetora, com reestabelecimento na produção de citocinas como IFN- γ e IL-2 por células T CD4⁺ antígeno-específicas, e de recuperar a capacidade citolítica pelas células T CD8⁺ (BANDARU *et al.*, 2014; HASSAN *et al.*, 2015). Portanto, o bloqueio de PD-1 representa uma abordagem

promissora no combate à infecção crônica por *Mtb* (SINGH *et al.*, 2013; JAYARAMAN *et al.*, 2016).

Além das doenças bacterianas, as doenças ocasionadas por protozoários afligem grande parte da população mundial e são responsáveis por causar grave morbidade e ampla mortalidade principalmente nos países subdesenvolvidos (GIGLEY *et al.*, 2012).

Estudos já demonstraram que pacientes com cardiopatia chagásica apresentam um aumento na expressão do receptor inibitório CTLA-4 em células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras (ALBAREDA *et al.*, 2006) e nos níveis de apoptose entre estas células (BLACKBURN & WHERRY, 2007). Além disso, a expressão de CTLA-4 está relacionada ao aumento nas lesões cardíacas de pacientes com intensa miocardite (ANTROBUS *et al.*, 2005). Outro receptor coinibitório relacionado à modulação da resposta imunológica mediada por células T durante a doença de Chagas é PD-1. Estudos experimentais em camundongos mostraram haver um aumento na expressão desses receptores em linfócitos derivados do baço e do infiltrado inflamatório no tecido cardíaco durante a fase aguda da infecção (GUTIERREZ *et al.*, 2011)

Martins *et al.* (2004) demonstraram que o bloqueio de CTLA-4 permite a melhora na resposta inflamatória, a diminuição da parasitemia tecidual e aumento na taxa de sobrevivência dos animais infectados durante a fase aguda da infecção (GRAEFE *et al.*, 2004). Em contrapartida, o bloqueio de PD-1 apesar de reduzir a carga parasitária, promoveu o aumento na mortalidade dos camundongos (GUTIERREZ *et al.*, 2011), provavelmente em decorrência a exacerbação da resposta inflamatória.

Do mesmo modo como ocorre na doença de Chagas, a expressão de CTLA-4 tem sido associada a gravidade de outras doenças crônicas como a malária humana (SCHLOTMANN *et al.*, 2000). Estudos demonstraram haver uma alta expressão de PD-1 em células T CD8⁺ de memória efetora (HOME-DEBETS *et al.*, 2013), aumento na coexpressão de PD-1 e LAG-3 em células T CD4⁺ e diferenciação atípica em células B de memória isoladas de crianças quenianas, que possuíam histórico de longa exposição ao *Plasmodium falciparum*. Esses relatos mostram haver uma correlação entre a expressão destes receptores e a cronicidade da infecção e também que o parasito é capaz de levar a alterações fenotípicas nos perfis destas células, indicando exaustão celular. (HOME-DEBETS *et al.*, 2013; ILLINGWORTH *et al.*, 2013).

Outros autores mostraram que indivíduos infectados com *Plasmodium vivax* apresentavam níveis de PD-1 significativamente mais elevados, tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺, antes do tratamento e que estes níveis tendem a cair após o tratamento (COSTA *et al.*, 2003) e ainda, que PD-1 apresenta um importante papel nos níveis de apoptose e disfunção das células T durante a malária (WYKES *et al.*, 2014).

A resposta mediada por células T é essencial na proteção contra o protozoário *Toxoplasma gondii* por meio da produção de IFN- γ e TNF- α , bem como através da citotoxicidade por meio de granzimas e perforinas. Embora ambas as subpopulações de células T tenham um importante papel no controle da doença, estudos mostraram que a depleção de células T CD8⁺ pode levar a diminuição na sobrevivência de camundongos durante a encefalite toxoplásmica (ET) (TAIT & HUNTER, 2009). Outros autores relataram que a expressão dos receptores inibitórios TIM-1 e TIM-3 em células altamente diferenciadas, tanto Th1 quanto Th2 respectivamente, são capazes de modular o perfil da resposta e, que a expressão TIM-3 em células Th1 parece estar envolvido na reativação da ET (BIN *et al.*, 2003).

Durante a infecção pelo *Toxoplasma gondii*, as células TCD8⁺ passam a expressar, além de TIM-3, PD-1. Como consequência, estas células sofrem um aumento no nível de apoptose e diminuição na resposta secundária a antígenos, perdendo gradativamente sua capacidade polifuncional e tornando-se exausta. O tratamento prolongado com anti-PDL-1 foi capaz de evitar a morte de camundongos C56/BL6 antes suscetíveis à toxoplasmose (BHADRA *et al.*, 2011).

Assim como em outras doenças crônicas, durante a Leishmaniose ocorre um aumento na expressão de PD-1 em células T CD4⁺ e CD8⁺ associado à progressão da doença (ESCH *et al.*, 2013). O processo infeccioso persistente cria um microambiente negativo para a geração de células de memória, como demonstrado durante a infecção murina por *Leishmania major* deficiente em arginina (MOU *et al.*, 2013). Além disso, a expressão destes receptores, em células T CD8⁺, parece estar associada à suscetibilidade da infecção por *Leishmania donovani* (JOSHI *et al.*, 2009) e também por *Leishmania mexicana* em humanos e camundongos (HERNÁNDEZ-RUIZ & BECKER, 2006; LIANG *et al.*, 2006).

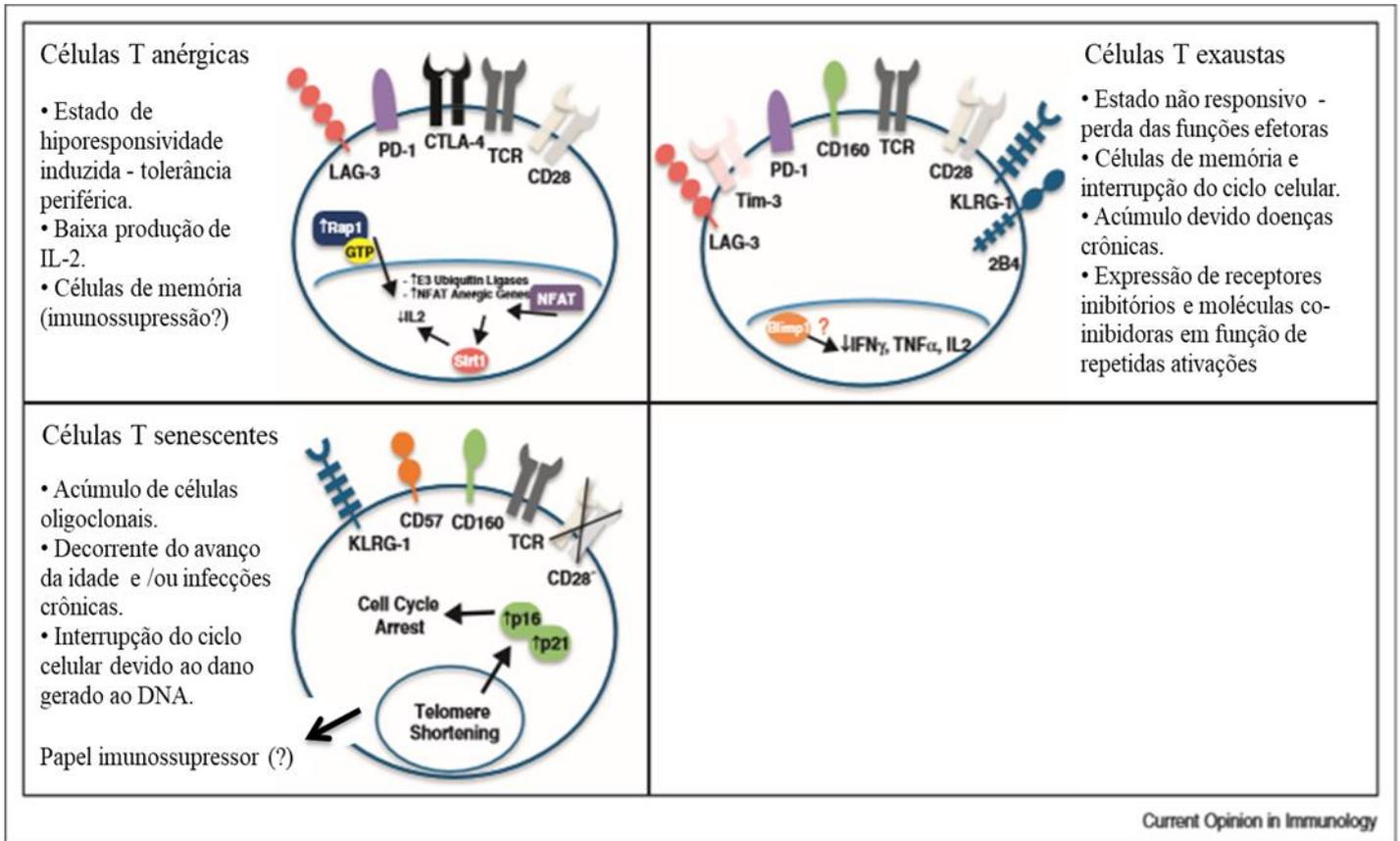
Usando PBMC de cães com leishmaniose visceral, naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, Esch *et al.* (2013) verificaram que existia uma diminuição na produção de IFN- γ , na proliferação de células T CD4⁺ em resposta a estimulação antigênica e aumento

na produção de IL-10, caracterizando o fenótipo de exaustão associado à expressão de PD-1. Estas mesmas características foram observadas em células T CD8⁺ durante a Leishmaniose cutânea difusa (HERNÁNDEZ-RUIZ *et al.*, 2010; SAID *et al.*, 2010; WHERRY *et al.*, 2003; WHERRY, 2011), a leishmaniose cutânea pós calaza e também em pacientes infectados com *Leishmania Guanyensis* (BOURREAU *et al.*, 2007; SAHA *et al.*, 2007).

Estudos mostraram que, após do bloqueio de IL-10 e B7-H1 (PD-L1), as taxas de apoptose entre as células T, retiradas de cães infectados, foi significativamente menor no grupo de animais sintomáticos do que no grupo daqueles que não apresentavam sintomas. Esses achados corroboram com a ideia de que, PD-1 é capaz de agir de forma direta, por meio da interação com seu ligante, e indireta através da regulação na produção de IL-10 produzida por monócitos durante a infecção por *Leishmania* (ESCH *et al.*, 2013). Portanto, é possível hipotetizar que, a exaustão concomitante de células T CD4⁺ e CD8⁺, que ocorre no início da infecção, leva ao agravamento das lesões causadas durante a leishmaniose visceral. (WHERRY, 2011; ESCH *et al.*, 2013).

Embora muito estudos tenham sido publicados na última década, a fim de elucidar o evento de exaustão celular e trazer novas perspectivas de tratamentos em doenças, como câncer e infecções crônicas, muito ainda precisa ser esclarecido. A exaustão celular é um importante mecanismo que atua na regulação da resposta imunológica e seu entendimento e aplicação tornam-se importantes ferramentas no restabelecimento da resposta e melhora na qualidade de vida dos indivíduos.

Figura 7 – Quadro comparativo entre mecanismo imunorreguladores



A anergia pode ser caracterizada pela hiporesponsividade diante da baixa coestimulação ou de fortes sinais dos receptores de supressão, levando a produção limitada de IL-2 (A); A exaustão celular corresponde a perda progressiva da capacidade efetora e proliferativa decorrente da expressão de receptores inibitórios em consequência da constante estimulação antigênica (B); A senescência celular pode ser dependente ou independente do telômero e caracteriza-se pela perda da capacidade proliferativa decorrente da diferenciação e divisão progressiva das células T (C); as células T semelhantes às células-tronco caracterizam-se pela capacidade de auto renovação. Fonte: Adaptado de CRESPO *et al.*, 2013.

2. JUSTIFICATIVA

As Leishmanioses são consideradas um importante problema de saúde pública. Anualmente, no Brasil os gastos com diagnóstico, tratamento e campanhas de conscientização e divulgação são superiores a 75 milhões de reais. Só no ano de 2015 foram registrado mais de 19 mil novos casos no Brasil.

A LCL é a forma clínica mais comumente encontrada de leishmaniose. Apesar de possibilitar uma resposta favorável, o tratamento para LCL ainda apresenta limitações por não garantir a cura estéril do paciente ou a eliminação total do parasito do organismo. Esse fator, pode levar ao aparecimento futuro de recidivas ou desenvolvimento de formas clínicas mais graves da doença, como LMC ou LD.

A resposta imunológica mediada por células T tem importância crucial no controle da infecção por *L. braziliensis* e na imunopatogênese da LCL. Nesse contexto, a constante estimulação antigênica decorrente da ineficácia em eliminar o parasito, bem como o ambiente pró-inflamatório crônico, observado nos pacientes, faz com que as células T, diferenciem-se progressivamente. Esse processo, pode favorecer o desenvolvimento de um fenótipo celular terminalmente diferenciado, conhecido como senescência celular, que leva a perda da capacidade proliferativa e aumento do potencial inflamatório inespecífico. O aumento na frequência de células senescentes, já foi associado a doenças graves, como doenças autoimunes e infecções crônicas persistentes, que pode levar o indivíduo ao óbito. No entanto, essa característica celular ainda não foi avaliada durante a LCL.

Dessa forma, o estudo da resposta imunológica durante a LCL, abre novas perspectivas para o entendimento da etiopatogênese da doença e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Assim, a identificação do perfil de senescência celular durante a LCL pode fornecer dados importantes na compreensão das características imunológicas associados a imunopatogênese da LCL, bem como contribuir para o entendimento dos fatores envolvidos no desenvolvimento das lesões e/ou controle do parasito. Essas características podem auxiliar na futura elaboração de vacinas e novas drogas que utilizem a imunomodulação da resposta inflamatória, através do bloqueio de receptores e vias de sinalização presentes na imunosenescência. Apesar do desenvolvimento de uma vacina contra as leishmanioses ser a profilaxia ideal no combate à doença, essas novas formas de tratamento, podem garantir uma melhor qualidade de vida aos pacientes e evitar as limitações do tratamento atual.

3. OBJETIVO

Caracterizar a senescência celular em linfócitos T de memória através da expressão de marcadores de superfície intra e extracelulares em pacientes com LCL, bem como o perfil secretor e atividade funcional destas células.

3.1. Objetivos específicos

1. Avaliar as características relacionadas à senescência celular como tamanho do telômero, atividade da enzima telomerase e a expressão dos marcadores de senescência KLRG-1, CD57, γ H2AX, e p38 em células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas de pacientes com LCL;
2. Avaliar o perfil de células de memória durante a LCL;
3. Avaliar a capacidade proliferativa das populações de memória durante a infecção por *L. braziliensis*;
4. Avaliar as características funcionais das populações de memória, por meio da produção dos mediadores inflamatórios como as citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10, granzima B e perforinas;
5. Avaliar a expressão do receptor de endereçamento CLA em células T CD4⁺ e CD8⁺ durante a LCL;
6. Correlacionar a frequência de células T de memória efetoras altamente diferenciadas com tamanho da lesão de pacientes com LCL.

4. METODOLOGIA

4.1. Aspectos éticos e teste de elegibilidade do estudo

Todos os procedimentos deste estudo foram realizados de acordo com as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa envolvendo seres humanos. Logo, este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM), da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), sob o registro de número 33025214.5.0000.5071.

Os participantes do projeto, incluindo os casos e controles, foram informados sobre os objetivos e a metodologia do projeto, bem como assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (ANEXO A), como autorização para os procedimentos necessários para execução do projeto de pesquisa. As amostras de sangue e pele foram recolhidas por indivíduos adequadamente qualificados e todos os dados pessoais são mantidos em sigilo, de acordo com a prática habitual.

4.2. Seleção dos pacientes

Os pacientes elegíveis para participar deste projeto de pesquisa possuíam diagnóstico confirmado de leishmaniose cutânea determinado pelos exames físico, como avaliação das manifestações clínicas, e laboratorial realizado através da avaliação da presença de do parasito no esfregaço sanguíneo e no tecido cutâneo através da reação em cadeia da polimerase (PCR). Os pacientes foram recrutados no Centro de Pesquisa Clínica (CPC) do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM). Os critérios de inclusão foram:

- Pacientes com idade entre 18 e 65 anos;
- Não ser portador do vírus HIV, Hepatite B ou C, CMV ou possuir qualquer outra doença crônica;
- Aceitar o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- Possuir leishmaniose cutânea, causada por *L. braziliensis*, diagnosticada recentemente, e não ter iniciado o tratamento.

Para compor o grupo controle, foram selecionados indivíduos saudáveis que não apresentavam leishmaniose, e assim como os pacientes não possuíam doenças crônicas. Para isso, o plasma de todos os voluntários foi testado a partir dos seguintes testes rápidos: Vírus da Hepatite C (HCV) (Imuno-Rápido[®] – Wama) Vírus da Hepatite B (HBV) (VIKIA[®] HBsAg - BioMérieux), Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) (Rapid-Check[®] HIV1 e 2 – NDI) e Citomegalovírus (CMV) (Onsite). Os testes foram realizados por meio de ensaio imunoenzimático – ELISA – de acordo com as instruções dos fabricantes.

4.3. Amostras dos Pacientes

Aliquotas de sangue periférico (40 mL) dos pacientes com leishmaniose cutânea, atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) foram gentilmente cedidas pelo Professor Aloísio Falqueto, membro do Departamento de Medicina Social da UFES e coorientador deste projeto.

Para o estudo foram selecionados 26 pacientes e 16 controles. A maioria dos pacientes com LCL foi do sexo masculino (67%) e tinham idade entre 18 e 44 anos. Os pacientes possuíam de 1-4 lesões de tamanhos variados (tamanho médio da lesão: 313mm²). Além disso, a média de duração da doença, desde o aparecimento da lesão até o início do

tratamento, era de 65,4 dias. Assim como os pacientes, a maioria dos indivíduos saudáveis era do gênero masculino (80%) e tinha entre 24-52 anos (TABELA 1).

Tabela 1 – Caracterização dos indivíduos arrolados no estudo

	Pacientes		Controles saudáveis	
	Média \pm SD	Range	Média \pm SD	Range
Sexo (M/F)	11/6	NA	10/5	NA
Idade	30.7 \pm 11.6	18 - 44	34.9 \pm 10.6	24 - 52
Duração da doença (Dias)	65.4 \pm 32.6	30 -120	NA	NA
Número de lesões	1.92 \pm 1.16	1 - 4	NA	NA
Tamanho da lesão (mm ²)	313 \pm 83	200 - 500	NA	NA
Células brancas do sangue	8708 \pm 2472	6843-12334	6970 \pm 1730	5782 - 9124

Características clínicas dos 17 pacientes com LCL e 16 indivíduos saudáveis. DP: Desvio Padrão; NA: Não se aplica; LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada; CS: Controle saudável. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

4.4. Separação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (PBMC)

Para a retirada das PBMC do sangue total, 40 ml de sangue foram coletados em tubos heparinizados. A amostra foi então transferida para um tubo cônico graduado de 50 mL e diluído em tampão fosfato salino (*Phosphate Buffer saline* – PBS). Posteriormente, 30 mL do sangue diluído foram gentilmente adicionados a 20 mL de Ficoll-Hypaque™ PLUS (GE Healthcare®). O tubo foi centrifugado a 580 g/20 min, sem freio e sem aceleração, à temperatura ambiente. Após a centrifugação a camada de células mononucleares (buffy coat ou anel) foi retirada utilizando-se uma pipeta Pasteur, e transferida para um novo tubo de 50 mL. O PBMC foi lavado por duas vezes com PBS a 580 g/10 min e 300 rpm/10 min, respectivamente. As células foram contadas em hemocitômetro e congeladas em nitrogênio líquido para utilização posterior.

4.5. Diagnóstico Molecular

Para o diagnóstico molecular, fragmentos de tecidos cutâneos provenientes dos 26 pacientes com suspeita de LCL foram submetidos a extração de DNA. O DNA da pele dos indivíduos foi extraído, utilizando-se o kit HiPurA™ Multi-Sample DNA Purification,

segundo instrução do fabricante. Brevemente: Foram adicionados ao fragmento do tecido o tampão de ressuspensão e a proteinase K (20 mg/mL). As amostras passadas no vórtex para auxiliar na disrupção do tecido e posteriormente colocadas no banho seco à 55°C por 4 horas. Após a digestão do tecido, foi acrescentado o tampão de lise e o material foi incubado por 10 min a 70°C no banho seco. Ao lisado foi adicionado etanol (96%-100%), gentilmente homogeneizado, e este foi transferido para a coluna spin. O material foi centrifugado e lavado com solução pré-lavagem por 2 vezes. Por fim, acrescentou-se o tampão de eluição, e após 1 min de incubação, o tubo foi centrifugado (etapa realizada por 2 vezes). O DNA extraído foi armazenado no freezer -20°C.

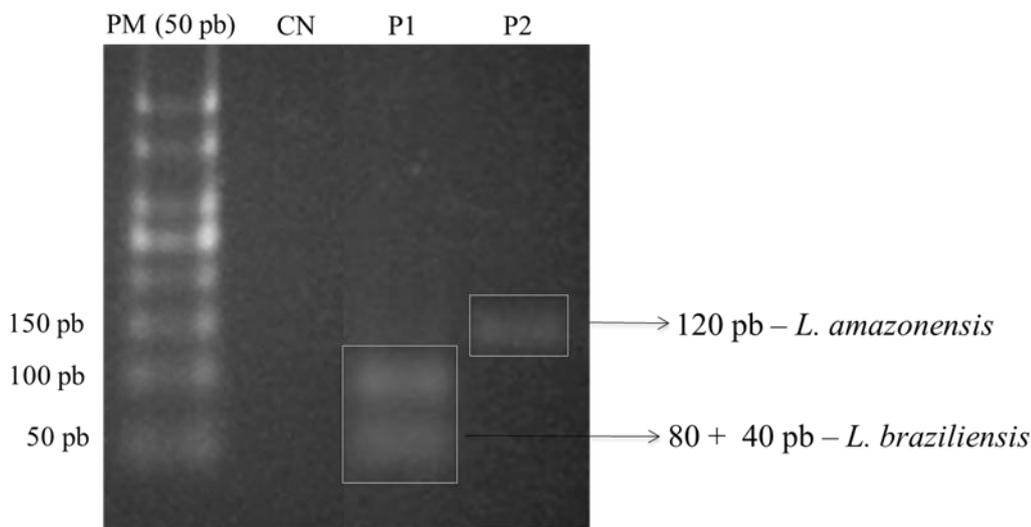
Após a extração do DNA, o material foi amplificado por PCR para posterior confirmação da presença do parasito *L. braziliensis*. Para isso, foram utilizados de 1 a 5µg de DNA e adicionados: Tampão 10x (1%), mix dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (0,2 mM cada) (Invitrogen®), MgCl₂ (1,5mM) (Invitrogen®), Oligo RFLP1 (Forward (150): GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA) (0,5µM), Oligo RFLP2 Reverse: (152)(G/C)(G/C)(G/C)(A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAA CCC C) (0,5µM), Taq DNA polimerase (2,5U/µl) (Invitrogen®) e água ultra pura. Os primers utilizados neste processo são comuns as espécies *L. amazonensis*, *L. baziliensis* e *L. chagasi*. As condições de reação para a amplificação do DNA da *Leishmania sp* foram: Passo 1: 5 min - 95°C; Passo 2: 30s - 95°; Passo 3: 30s - 60°C; Passo 4: 30s - 72; Passo 5: Repetir os passo 2 e 4 por 34 vezes; Passo 6: 30s - 60°C; Passo 7: 5min -72°C; Passo 8: manter à 4°C.

Para a digestão dos *amplicons*, utilizou-se enzima de restrição HAE III (10U/uL) (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%. A enzima HAE III é capaz de clivar o DNA amplificado anteriormente em diferentes pares de bases, permitindo a identificação da espécie de *Leishmania* presente na lesão.

Muitos métodos moleculares baseados em PCR vem sendo utilizados para diagnósticos e identificação das espécies de *Leishmania*. Tendo em vista que outro parasita do gênero *Leishmania* pode causar a LCL e que este seria um fator excludente na seleção dos pacientes, os fragmentos de biópsias de pacientes com suspeita de LCL, foram submetidas à PCR-RFLP. Do total de biópsias analisadas, a maioria foi positivas para espécie de *L. braziliensis*, conforme observado pelo padrão de 40pb+80pb. Dois pacientes tiveram

confirmação para *L. amazonensis*, identificados por meio do padrão 120pb, e foram excluídos do trabalho.

Figura 8 – Diagnóstico molecular dos pacientes arrolados no estudo



Eletroforese em gel de agarose 3% demonstrando o padrão de base de *L. braziliensis* identificada por duas bandas, 40 pb e 80 pb; A seta indica o padrão de pares de base da cepa de *L. amazonensis* – 120pb. PM: Peso Molecular; CN: Controle negativo; P1 e P2: pacientes 1 e 2; pb: pares de base. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

4.6. Análise por Citometria de Fluxo

Para as análises *ex vivo* da expressão dos marcadores extracelulares e intracelulares, as células mononucleares do sangue periférico (PBMC) foram transferidas para uma placa de 96 poços de fundo cônico e centrifugadas a 400 g/7 min. Após esse período, as células foram ressuspensas em 200ul de solução FAC'S buffer (BD Biosciences®) e novamente centrifugadas. Posteriormente, foram incubadas por 30 min a 4°C com os anticorpos extracelulares (CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD45RA, KLRG-1, CD57, CD107a e CLA) conforme listado na Tabela 2, e fixadas com paraformaldeído 1%.

Para a análise dos marcadores intracelulares, p38 e γ H2AX, as PBMCs foram fixadas com tampão *Cytofix* (BD Bioscience®) morno por 10min a 37°C. Posteriormente as células foram permeabilizadas com tampão Perm III (BD Bioscience®) por 30 min a 4°C e incubadas com os anticorpos intracelulares, listados na Tabela 2, por 30 min em temperatura ambiente.

Para a marcação de h-TERT foi utilizado o kit de permeabilização (Invitrogen, Paisley, UK) de acordo com as instruções do fabricante. Todas as amostras foram avaliadas utilizando-se o citômetro Fortessa X-20 (BD Biosciences®) e analisadas no FlowJo software (Treestar®).

Tabela 2: Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

Anticorpo	Fluoróforo	Clone	Anticorpo	Fluoróforo	Clone
Lived/dead	UV Zombie (Biolegend®)		Ki67	Alexa Fluor 647	B56 (BD BioSciences®)
CD3	PECF 594	UCHT1 (BD BioSciences®)	CD45RA	PE-Cy7	HI100 (Biolegend®)
CD4	Brilliant Violet 711	OKT-4 (Biolegend®)	CD107a	Brilliant Violet 605	(Biolegend®)
CD8	APC-H7	SK1 (BioSciences®)	CLA	FITC	HECA-452 (BioScience®)
KLRG-1	APC	2F1 (Biolegend®)	Rabbit anti hTERT/Mouse anti-rabbit	Alexa Fluor 674 (Abcam®)	
CD57	Alexa Fluor 421	NK-1 (BD BioSciences®)	γ H2AX	Alexa Fluor 647	pSER139 (BD Bioscience®)
CD27	Brilliant Violet 786	U28 (BD BioSciences®),	pp38	Alexa fluor 488	Pt180/pY182 (BD Bioscience®)
CD28	Brilliant Violet 510	CD28.2 (Biolegend®)	-	-	-

Lista de anticorpos utilizados para a avaliação das características fenotípicas das células T por citometria de fluxo. Análise em PBMCs e sobrenadante de PBMC, *ex vivo* e de células em cultura.

4.7. Análise da produção de citocinas

Para a análise da produção de citocinas, o sobrenadante das células mononucleares do sangue periféricos foram transferidas para uma placa de 96 poços, fundo reto, previamente sensibilizada com 0,5ug/mL de anti-CD3 (OKT3) (Biolegend®) e incubadas na presença de 10ug/mL de promastigotas de *L. braziliensis* (LbAg) por 72h a 37° C/ 5%CO₂ na presença de 5ng/mL rhIL-2. Os níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e Granzima B foram analisados por CBA (*Cytokine Bead Assay*) de acordo com o protocolo fornecido pelo fabricante. As amostras foram avaliadas utilizando-se o citômetro Fortessa X-20 (BD Biosciences®) e analisadas no FlowJo software (Treestar®).

A avaliação das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e da proteína C reativa do soro dos pacientes foi realizada por ELISA de acordo com as instruções do fabricante (R&D Systems).

4.8. Análise de proliferação

Para a análise do perfil proliferativo das PBMCs, estas foram transferidas para uma placa de 96 poços, fundo reto, previamente sensibilizada com 0,5ug/mL de anti-CD3 (OKT3) (Biolegend®) 72h a 37°C/ 5%CO₂ na presença de 5ng/mL rhIL-2. Posteriormente, as células foram lavadas com PBSA e incubadas com KI67-Alexa Fluor 647 (clone B56 – BD Bioscience) por 30 min no escuro em temperatura ambiente, utilizando-se *Foxp3 Staining Buffer Set* (Miltenyi Biotec, Bisley, UK). As amostras foram avaliadas utilizando-se o citômetro Fortessa X-20 (BD Biosciences®) e analisadas no FlowJo software (Treestar®).

4.9. Marcação do telômero por hibridação fluorescente *in situ*

A avaliação do comprimento do telômero foi realizado em células CD4⁺ e CD8⁺ previamente isoladas por seleção negativa usando VARIOMACS system (MiltenyiBiotec®) de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, as células foram lavadas e fixadas para uma lâmina Poli-L-lisina através da citocentrifugação (Cytospin, Thermo Scientific, USA), fixadas em etanol (96-100%) e acetona (100%) e armazenadas no freezer -80°C. As amostras foram então fixadas em PFA, desidratadas em etanol frio antes da permeabilização e bloqueadas com BSA. As lâminas foram lavadas antes da desidratação adicional por meio de um gradiente de etanol e secas a temperatura ambiente antes da hibridação com a sonda PNA (C3TA2)₃ (Panagene, TelC Cy3, # 14 1224PL-01) durante 2 h no escuro, como descrito em (RIDELL *et al.*, 2015). As lâminas foram subsequentemente lavadas em formamida / SSC antes da montagem com o Vectorshield/DAPI (Vector Laboratories, EUA). As imagens foram adquiridas por microscopia confocal Leica SPE2 utilizando o software LAS X versão 3.3.0 (Leica Microsystem, Wetzlar, Alemanha) e a fluorescência da região de interesse foi medidas por ImageJ.

4.10. Análise Estatística

Para as análises comparativas dos dados obtidos foi utilizado o GraphPad Prism. O teste de normalidade KS foi previamente utilizado e a significância estatística foi avaliada por meio do teste *t* de Student para amostras pareadas ou ANOVA para amostras não pareadas com correção de Tukey usada após teste hoc. Foi utilizado o teste Mann-Whitney para todas

as amostras contínuas com variações não paramétricas. Os intervalos de confiança foram de 95% e o nível de significância para $p < 0,05$.

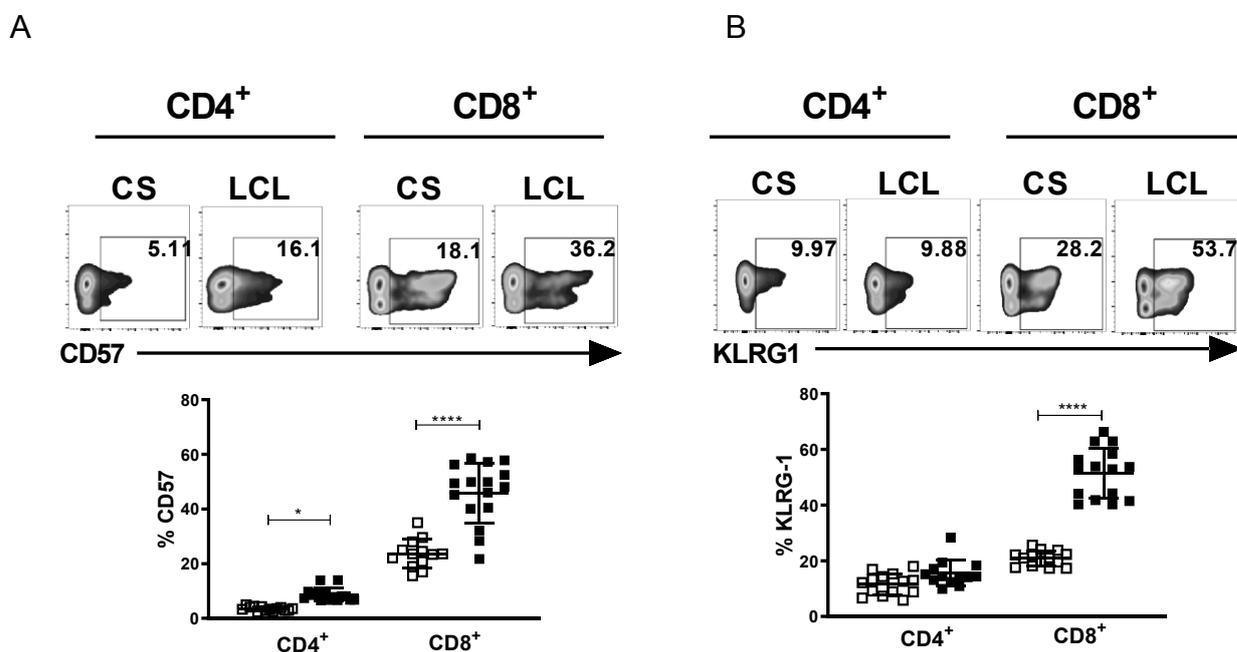
5. RESULTADOS

5.1. Avaliação da expressão de marcadores de superfície associados à senescência celular em pacientes com LCL

Após realizar os testes de elegibilidade dos pacientes arrolados no estudo, nossas análises se voltaram para a avaliação das mudanças fenotípicas, associadas à senescência, apresentadas pelas células T durante a estimulação antigênica crônica. Dessa forma, nós avaliamos a expressão dos marcadores de superfície CD57 e KLRG-1, uma vez que estudos vêm demonstrando a relação desses marcadores com o desenvolvimento das características relacionadas a senescência (HENSON & AKBAR, 2009; BRENCHLEY *et al.*, 2003). Assim sendo, os resultados mostraram que células TCD4⁺ de pacientes com LCL expressam níveis significativamente mais elevados receptores CD57 do que tais células em indivíduos saudáveis (FIGURA 9 A). A mesma diferença pode ser observada quando comparamos a expressão de CD57 em células CD8⁺ entre pacientes e indivíduos saudáveis (FIGURA 9 A).

A molécula de superfície KLRG-1 é constitutivamente expressa na superfície de células T, no entanto, nossos resultados demonstraram que indivíduos com LCL, quando comparados com indivíduos saudáveis, apresentam níveis significativamente maiores de KLRG-1 em células TCD8⁺ (FIGURA 9 B). De forma diferente, não observamos diferenças na expressão de KLRG-1 em células CD4⁺ de pacientes com LCL quando comparados com indivíduos saudáveis (FIGURA 9 B).

Figura 9 – Caracterização de marcadores de senescência em populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com LCL



Análise, *ex vivo*, por citometria de fluxo, em PBMC de pacientes com LCL (n=16) e indivíduos saudáveis (n=14). *Dot plots* representativos e dados cumulativos dos marcadores de superfície CD57 (A) e KLRG-1 (B). Os gráficos mostram as médias +_ SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

* p < 0,05; **** p < 0,0001; LCL: Leishmanise Cutânea Localizada; CS: Controle saudável. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

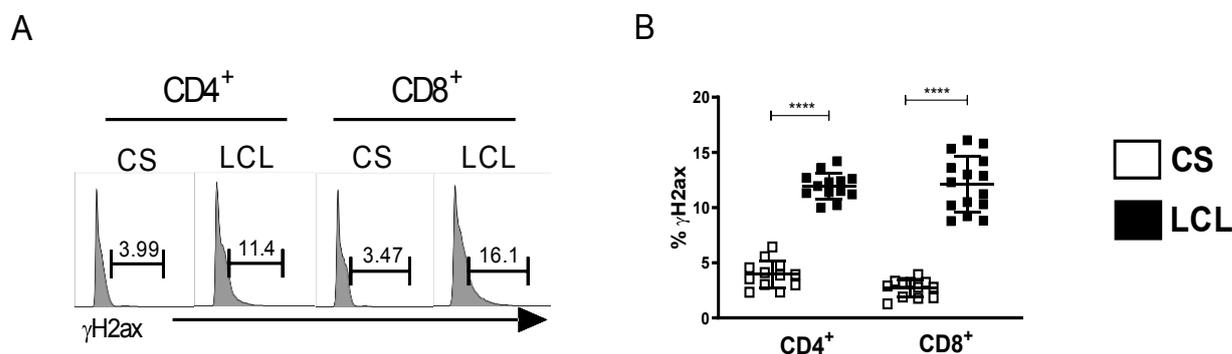
5.2. Avaliação da expressão de marcadores intracelulares associados à senescência celular em pacientes com LCL

O processo de senescência replicativa é progressivo e caracterizado primeiramente pelo acúmulo persistente de danos gerados ao DNA, no entanto esse processo pode ser consequência não apenas de eventos como o encurtamento do telômero (senescência celular dependente do telômero) (ROMERO *et al.*, 2007), mas também de danos gerados ao DNA por fatores externos como a radiação ultravioleta, ativação da proteína p53 e o estresse ambiental (senescência celular independente do telômero) (CAMPISI & D'ADDA DI FAGAGNA,

2007). Esses eventos levam à interrupção do ciclo celular, e a ativação da proteína fosforilada γ H2ax e da proteína quinase p38, decorrentes deste processo, indicam importantes marcadores na caracterização da senescência celular.

Nesse contexto, após demonstrar o aumento na expressão de receptores de supressão extracelulares CD57 e KLRG-1, nosso objetivo foi analisar a imunexpressão de marcadores intracelulares também associados à senescência replicativa. Assim sendo, nossas análises demonstraram que células TCD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com LCL apresentam níveis significativamente maiores na expressão da proteína histona fosforilada γ H2ax quando comparamos com as mesmas células de indivíduos saudáveis (FIGURA 10 A e B). Estes dados sugerem que a infecção por *L. braziliensis* leva ao aumento na expressão γ H2ax e consequentemente, em associação a outros marcadores, ao desenvolvimento de características de senescência célula.

Figura 10 – Análise da expressão da proteína do complexo de histonas γ H2AX em populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com LCL



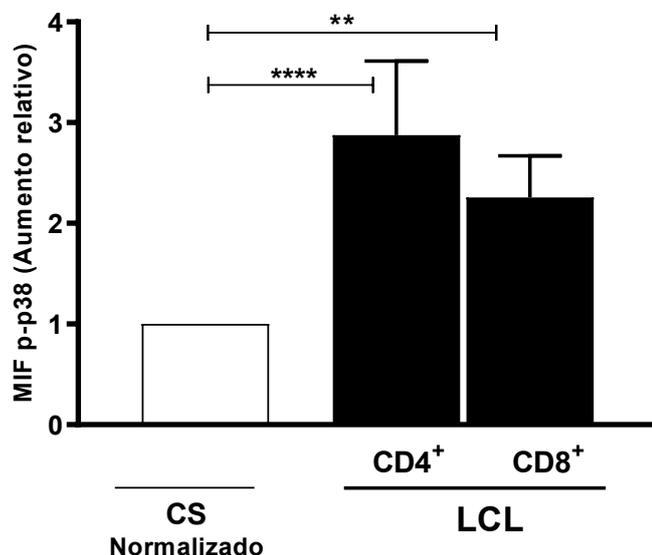
Análise, *ex vivo*, por citometria de fluxo em PBMC de pacientes com LCL (n=16) e indivíduos saudáveis (n=14). Histograma representativo (A) e dados cumulativos (B) de γ H2ax. Os gráficos mostram as médias \pm SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

p < 0,0001; LCL: Leishmanise Cutânea Localizada; CS: Controle saudável. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

Da mesma forma, nossas análises demonstraram que células TCD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com LCL apresentam níveis significativamente maiores na expressão da proteína

quinase p38 fosforilada quando comparamos com as mesmas células de indivíduos saudáveis (FIGURA 11).

Figura 11 – Análise da expressão da proteína quinase p38 fosforilada em populações de células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos com LCL



Análise, *ex vivo*, por citometria de fluxo em PBMC de pacientes com LCL (n=16) e indivíduos saudáveis (n=14). Análise quantidade da média de intensidade de fluorescência da expressão p38 fosforilada normalizada com o grupo CS. Os gráficos mostram as médias +_ SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

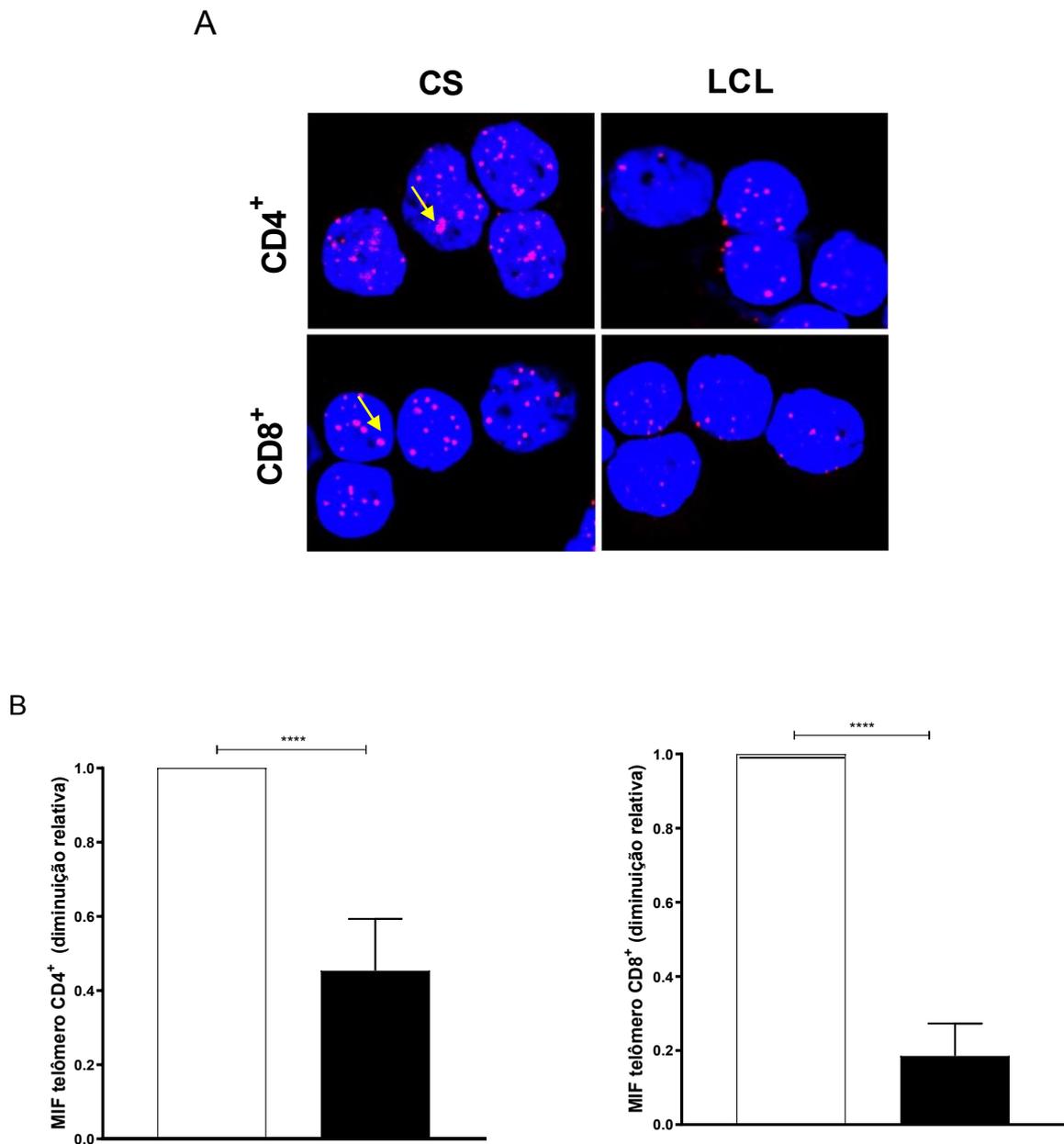
** p < 0,01 **** p < 0,0001; LCL: Leishmaniose cutânea localizada; CS: Controle saudável; MFI: Média de intensidade de fluorescência. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.3. Avaliação do tamanho do telômero como característica associada à senescência celular em pacientes com LCL

Após avaliar a expressão de marcadores intracelulares associados aos danos gerados ao DNA, nosso estudo teve como objetivo analisar o tamanho do telômero, uma vez que durante a divisão celular, o DNA telomérico é degradado fazendo com que a célula perca sua capacidade proliferativa levando a senescência replicativa (DAHSE *et al.*, 1997). Desta forma, nossos resultados demonstraram que células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos acometidos por LCL apresentaram uma redução significativa do tamanho de seus telômeros quando comparados com indivíduos saudáveis (FIGURA 12 A e B). Através de microscopia confocal,

é possível observar, em vermelho, a presença significativamente menor do telômero em indivíduos infectados por *L. braziliensis* quando comparados com indivíduos saudáveis (FIGURA 12 A).

Figura 12 – Avaliação do tamanho do telômero nas populações de células T CD4+ e CD8+



Análise, *ex vivo*, em PBMC de pacientes com LCL (n=16) e indivíduos saudáveis (n=14). Análise por hibridação *in situ* dos telômeros de células T CD4⁺ e CD8⁺ isoladas (A). As setas amarelas indicam (em vermelho) a presença do telômero anteriormente hibridado com a sonda (C3TA2)₃ conjugada com Cy5. Núcleos corados com DAPI. Análise quantitativa da média de intensidade de fluorescência, níveis normalizados com o grupo CS (B). Os gráficos mostram as médias ± SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

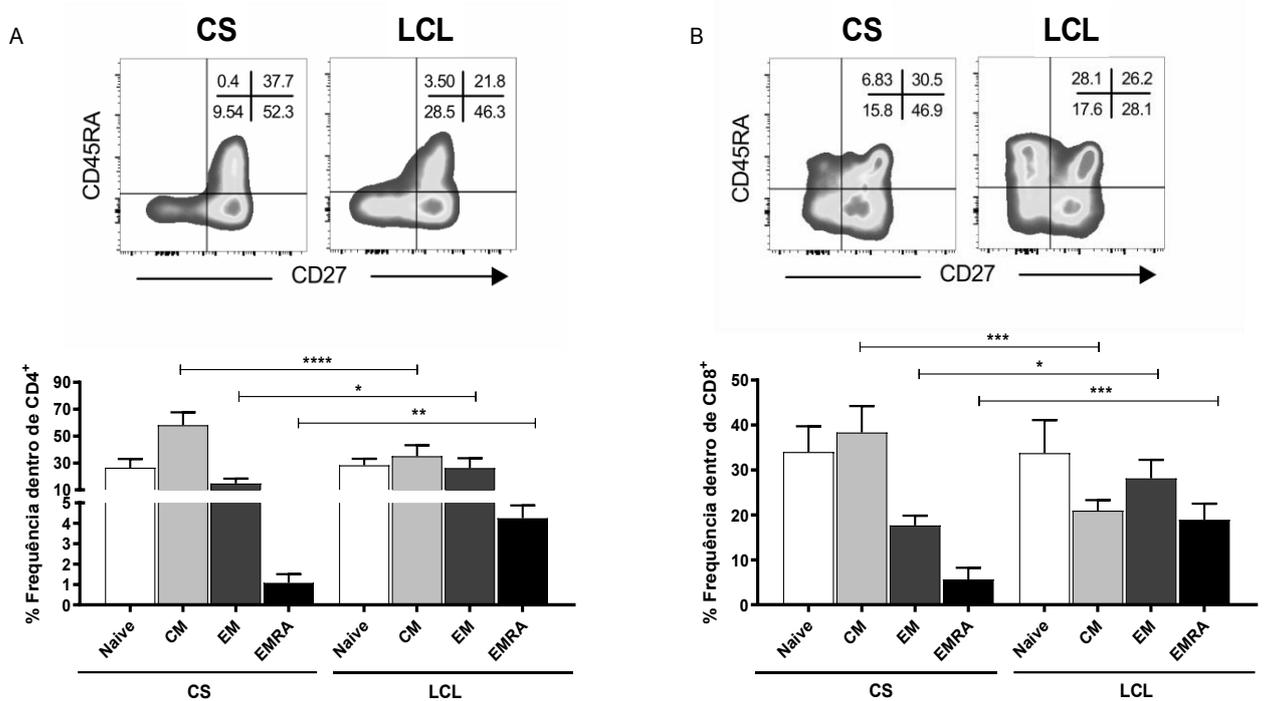
* p < 0,05; ** p < 0,01 **** p < 0,0001; LCL: Leishmaniose cutânea localizada; CS: Controle saudável; mIF: Média de intensidade de fluorescência. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.4. Avaliação da diferenciação das células T em diferentes populações de memória de pacientes com LCL

As células CD4⁺ e CD8⁺ podem ser divididas em células de memória central (CD45RA⁻ CD27⁺), células de memória efetora (CD45RA⁻ CD27⁻) e células de memória efetora altamente diferenciadas (CD45RA⁺CD27⁻) por meio de sua caracterização fenotípica determinada pela expressão de moléculas de superfície.

DI MITRI *et al.* (2011) demonstraram que células de memória efetora altamente diferenciadas correspondem à maioria das células que apresentam características de células senescentes. Nesse contexto, nossas análises demonstraram que pacientes com LCL apresentam quantidades significativamente maiores de células T CD4⁺ (13A) e CD8⁺ (13B) de memória central, efetora e memória efetora altamente diferenciadas quando comparados com indivíduos saudáveis. O processo de senescência celular pode ser associado ao avanço da idade do indivíduo e à estimulação antigênica persistente, e também aos processos inflamatórios crônicos (DI MITRI *et al.*, 2011; WALLACE *et al.*, 2011) observados em pacientes com LCL. Em contrapartida, entre a população de células de memória central, tanto T CD4⁺ quanto CD8⁺, esta diferença não foi observada. Além disso, não foram observadas diferenças entre as populações de células T circulantes de pacientes com LCL e indivíduos saudáveis, indicando um aumento proporcional dessas populações de células (dado não mostrado).

Figura 13 – Acúmulo de células de memória efetora altamente diferenciadas em pacientes com LCL



Análise, *ex vivo*, em PBMC de indivíduos com LCL (n=16) e saudáveis (n=14). *Dot plots* representativos e dados cumulativos das subpopulações de memória caracterizadas pela expressão dos receptores de superfície CD45RA e CD27 dentro da população de células T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B). Os gráficos mostram as médias \pm SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

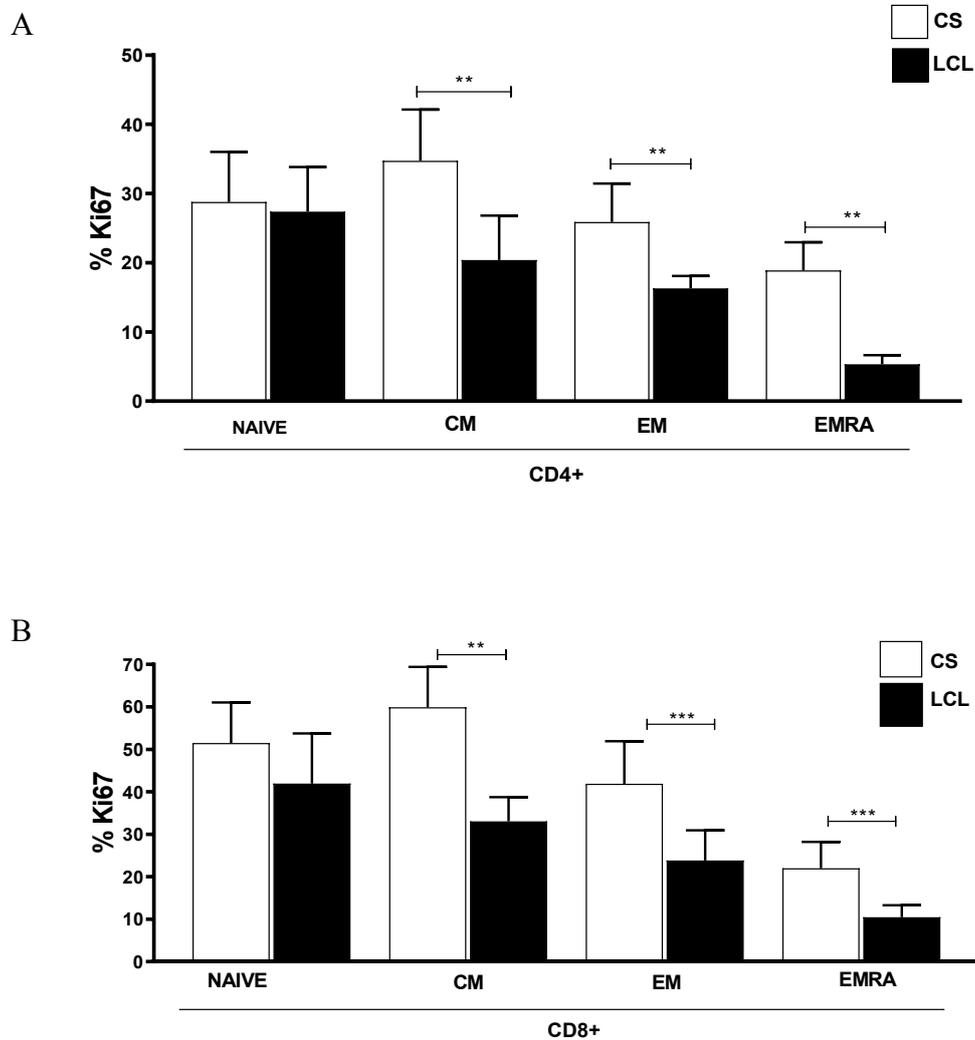
* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001; **** p < 0,0001. LCL: Leishmanise Cutânea Localizada; CS: Controle saudável; CM: memória central; EM, memória efetora; EMRA: memória efetora altamente diferenciada. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.5. Análise da capacidade proliferativa das subpopulações de células T de memória através da expressão de Ki67

A infecção crônica e a constante estimulação antigênica fazem com que as células percam a sua capacidade de expressar moléculas coestimuladoras, como CD27 e CD28, levando à perda progressiva da sua capacidade proliferativa. Além disso, os fatores supracitados favorecem a diminuição na atividade da enzima telomerase e, conseqüentemente, o encurtamento do telômero, levando à interrupção do ciclo celular. Esse processo pode ser

comprovado por meio da análise na expressão da proteína do ciclo celular KI67. Tendo em vista que células de memória efetora altamente diferenciadas correspondem à maioria das células senescentes (DI MITRI *et al.*, 2011) presentes em indivíduos acometidos por doenças crônicas, nossos resultados mostraram que as células T CD4⁺ (14A) e CD8⁺ (14B) de memória efetora altamente diferenciadas de pacientes com LCL expressam significativamente menos Ki67, após a estimulação *in vitro*, quando comparados com indivíduos saudáveis. Esses resultados demonstram uma relação inversa entre a expressão de Ki67 e a senescência celular, confirmando que a infecção crônica causada durante a LCL leva à perda da capacidade proliferativa das células T de memória. Da mesma forma, células de T CD4⁺ (FIGURA 14 A) e CD8⁺ (FIGURA 14 B) de memória central e efetora de pacientes com LCL também apresentam diminuição do seu potencial proliferativo quando comparadas com as mesmas células de indivíduos saudáveis.

Figura 14 – Análise da capacidade proliferativa das subpopulações de células T de memória através da expressão de Ki67



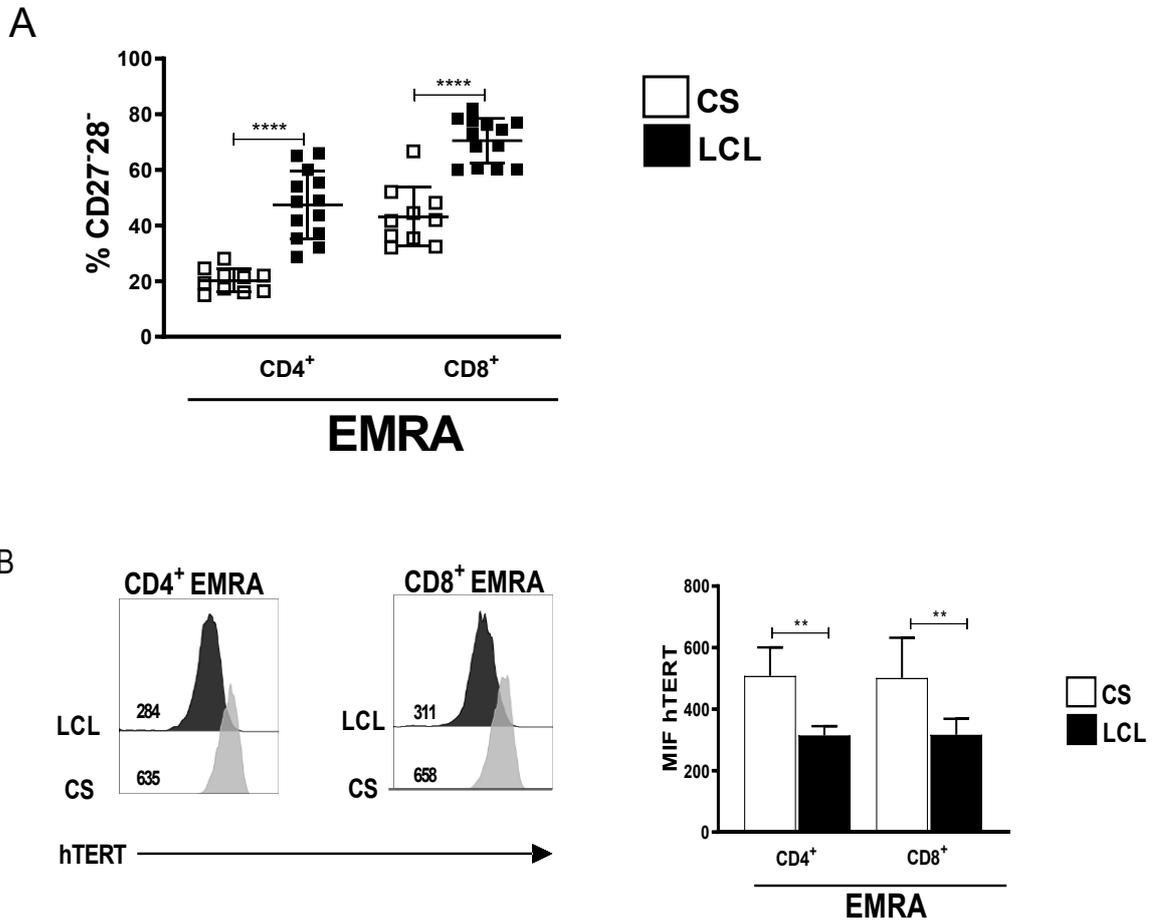
Análise, *in vitro*, por citometria de fluxo, em PBMC estimulado com anti-CD3 por 72h de indivíduos com LCL (n=16) e saudáveis (n=14). Análise da expressão de Ki67 nas diferentes subpopulações de memória dentro de CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B). Os gráficos mostram as médias +_ SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001; **** p < 0,0001. LCL: Leishmanise Cutânea Localizada; CS: Controle saudável; CM: memória central; EM, memória efetora; EMRA: memória efetora altamente diferenciada. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.6. Análise da atividade da enzima telomerase em células T de memória efetora altamente diferenciadas.

Os linfócitos T humanos, ao contrário das demais células somáticas, são capazes de restaurar a ação enzimática da telomerase, essencial na manutenção do potencial proliferativo da célula (HODES *et al.*, 2002). No entanto, após a ativação recorrente e decorrente da estimulação antigênica crônica, os linfócitos perdem a capacidade de regulação da telomerase, favorecendo a erosão do telômero e a interrupção do ciclo celular (AKBAR & VUKMANOVIC-STEJIC, 2007). Além disso, a perda de moléculas coestimuladoras, decorrente de fatores como idade, estimulação antigênica persistente e inflamação crônica (DIMITRI *et al.*, 2011; WALLACE *et al.*, 2011), favorecem a redução ou a inativação da ação da enzima telomerase (BLACKBURN, 2005). Nesse contexto, nossos resultados demonstraram que células T CD4⁺ e CD8⁺ de memória altamente diferenciadas de indivíduos com LCL sofrem a perda simultânea na expressão de CD28 e CD27 (FIGURA 15 A) além de apresentam uma diminuição progressiva na atividade da telomerase quando comparadas com essas células em indivíduos saudáveis, identificados através da redução na expressão da unidade catalítica da enzima telomerase, hTERT (FIGURA 15 B).

Figura 15 – Análise da atividade da enzima telomerase e ausência da expressão de CD27 e CD28 em células T de memória efetora altamente diferenciadas



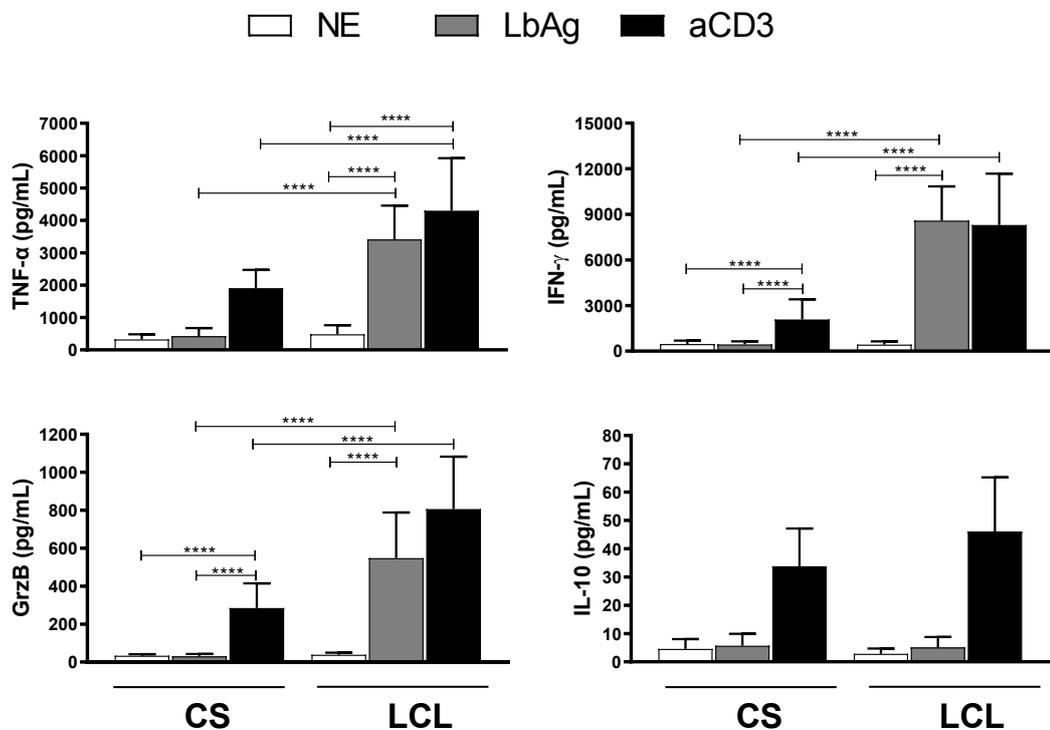
A análise, *ex vivo*, por citometria de fluxo, em PBMC de pacientes com LCL (n=14) e indivíduos saudáveis (n=12). Avaliação da perda simultânea da expressão das moléculas coestimuladoras CD27 e CD28 (A). Histograma representativo e dados cumulativos da expressão da unidade catalítica da enzima hTERT (B). Os gráficos mostram as médias \pm SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001; ****p < 0,0001. LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada; CS: Controle saudável; Células de memória efetora Altamente Diferenciada (EMRA – CD45RA⁺CD27⁻); hTERT (human telomerase reverse transcriptase). Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.7. Análise do perfil funcional das células T através da expressão de mediadores inflamatórios

Durante infecções crônicas, as células T apresentam um importante papel no curso da resposta imunológica por serem capazes de produzir diferentes mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas. Dessa forma, nossos resultados mostraram que PBMCs de pacientes com LCL estimuladas com anti-CD3 expressam níveis significativamente maiores de TNF- α , IFN- γ e granzima B quando comparados com indivíduos saudáveis (FIGURA 16). Da mesma forma, a estimulação antigênica com LbAg (antígeno de *L. braziliensis*) induziu um aumento na expressão desses mediadores inflamatórios nos pacientes quando comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo haver um acúmulo de células T antígeno-específicas nesses pacientes. Quando comparamos expressão de IL-10 após a estimulação antigênica entre os pacientes e os indivíduos saudáveis, percebemos que não há diferença entre os níveis desta citocina (FIGURA 16), indicando um desequilíbrio entre os perfis de resposta pró e anti-inflamatórios antígeno-específica.

Figura 16 – Análise da produção de mediadores inflamatórios pelas células mononucleares do sangue periférico



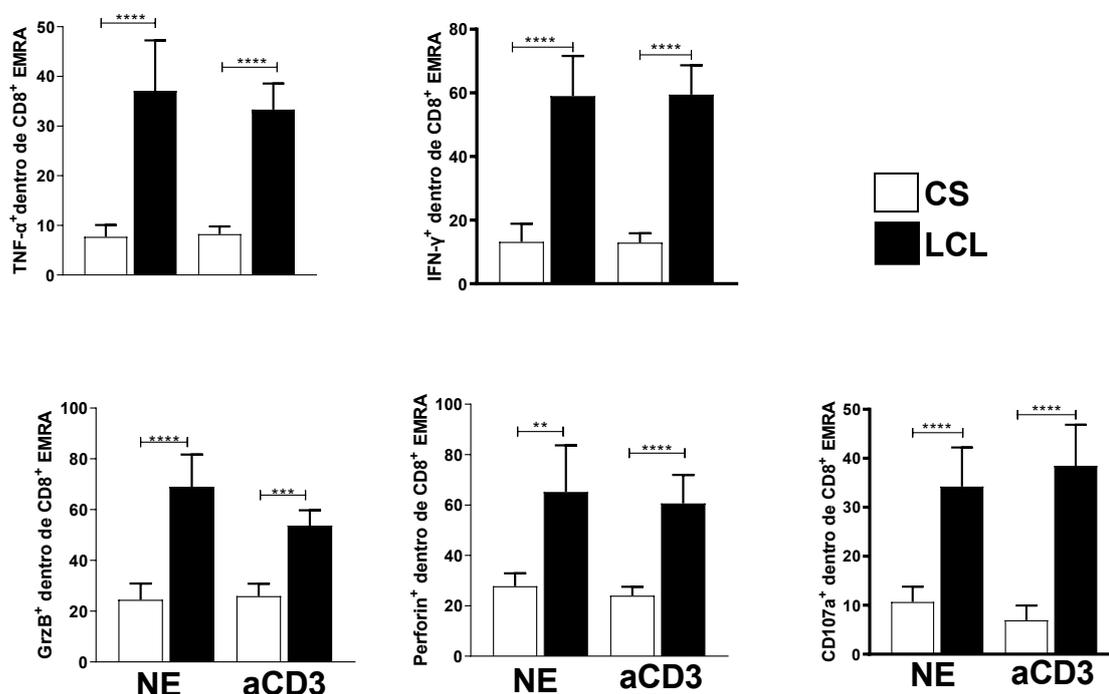
Análise, *ex vivo*, dos níveis das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-10 e granzima B de pacientes (n=14) e indivíduos saudáveis (n=13) realizada no sobrenadantedas da cultura celular por CBA. As células foram estimuladas com 10ug/mL de promastigotas de *L. braziliensis* (LbAg) ou 0,5ug/mL de anti-CD-3 por 72 h. Os gráficos mostram as médias +_ SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

p < 0,001; *p < 0,0001. LCL: Leishmaniose cutânea localizada; CS: Controle saudável. NE: Não estimulado. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

5.8. Análise do perfil secretor das células T CD8⁺ de memória efetora altamente diferenciadas.

As células senescentes desempenham um importante papel na imunorregulação da resposta inflamatória por meio da produção de mediadores inflamatórios (FREUND *et al.*, 2010; MINAMINO & KOMURO., 2007). Assim sendo, após verificar a presença e o acúmulo de células de memória em pacientes com LCL e comprovar os defeitos proliferativos a elas associados, nós verificamos a capacidade efetora das células T de memória efetora altamente diferenciadas, uma vez que os defeitos funcionais estão também associados à senescência. Assim, nossos resultados mostraram que células T CD8⁺ efetoras altamente diferenciadas de pacientes com LCL expressam níveis significativamente mais elevados das citocinas TNF- α , IFN- γ , perforinas, granzima B e CD107a, após a estimulação com anti-CD3, quando comparado com as mesmas células de indivíduos saudáveis (FIGURA 17). Esses resultados comprovam que células efetoras altamente diferenciadas apresentam um perfil secretor tipicamente pró-inflamatório.

Figura 17 – Análise da expressão de mediadores inflamatórios pelas células T CD8+ de memória efetora altamente diferenciadas



A análise, *in vitro*, por citometria de fluxo, em PBMC de pacientes com LCL (n=13) e saudáveis (n=11) estimulados ou não com 0,5ug/mL de anti-CD3 por 24h. Análise representativa de dados cumulativos dos níveis de expressão dos mediadores pró-inflamatórios TNF- α , IFN- γ , perforinas, granzima B e CD107a,. Os gráficos mostram as médias \pm SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

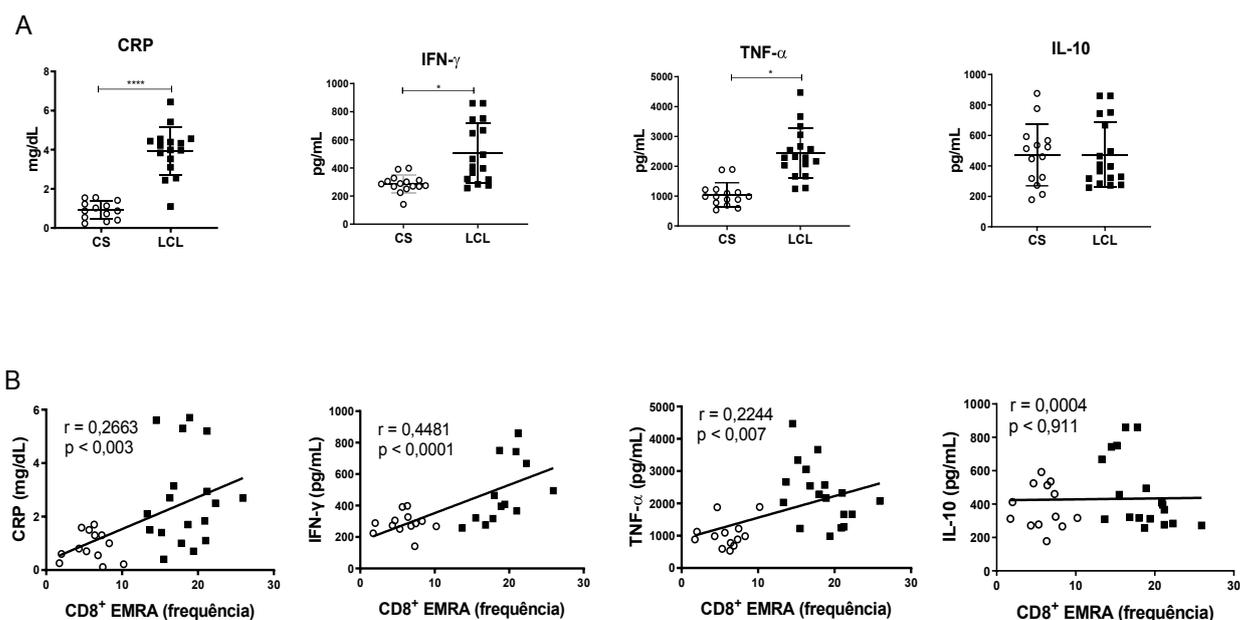
** p < 0,01; ****p < 0,0001. LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada; CS: Controle saudável; NE: Não estimulado; EMRA: Memória efetora altamente diferenciada. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

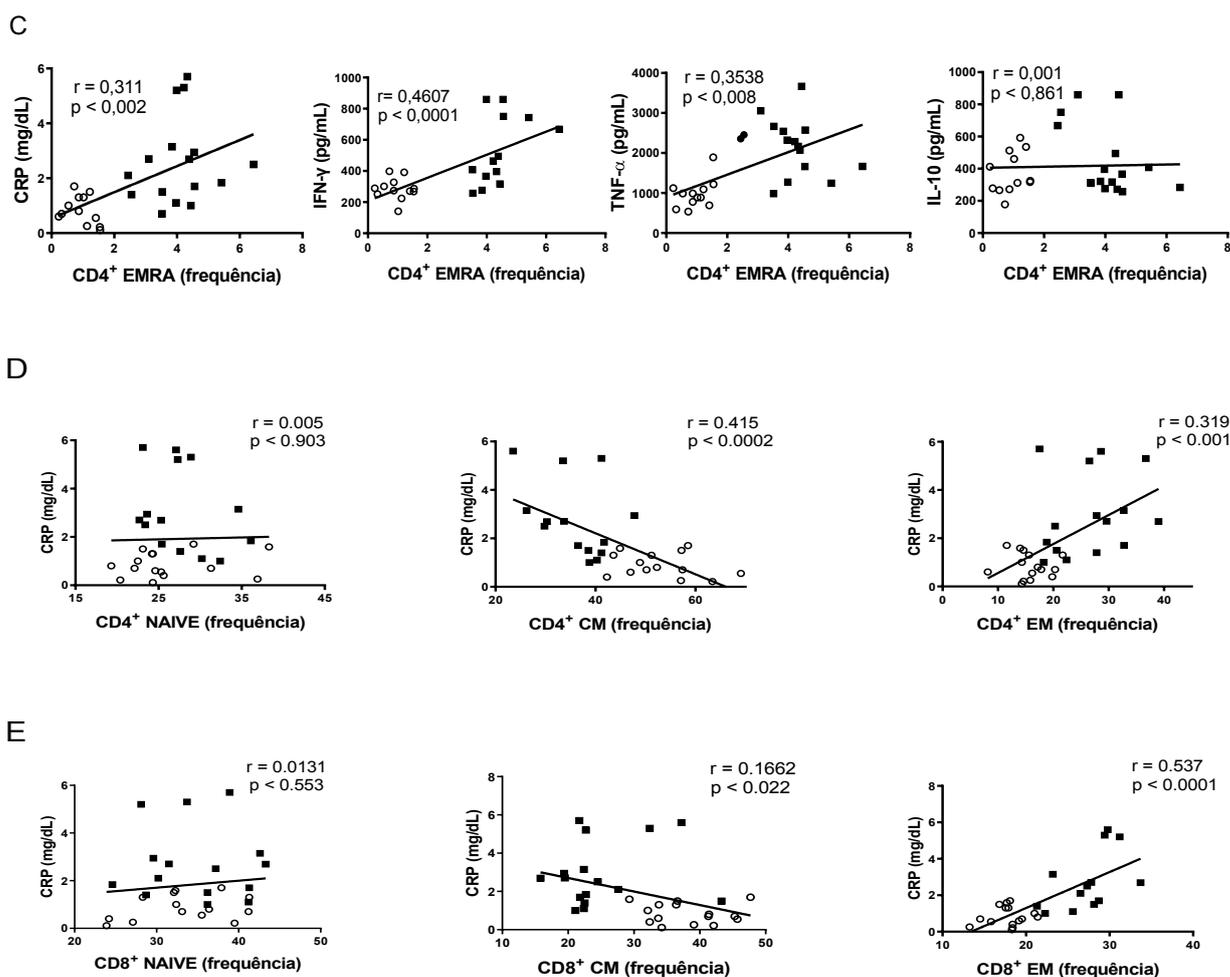
5.9. Correlação entre a produção de mediadores inflamatórios e o acúmulo de células T de memória efetora altamente diferenciadas em pacientes com LCL

Estudos mostraram que TNF- α e IFN- γ possuem um papel crucial no controle ou eliminação de patógenos como a *Leishmania sp* (PIRMEZ *et al.*, 1993). A análise sistêmica da expressão de mediadores inflamatórios no plasma de pacientes com LCL pode ser associada ao desenvolvimento de um perfil fenotípico e disfuncional característico do processo de senescência celular. Dessa forma, nossos dados mostraram que pacientes com LCL apresentam um aumento significativo nos níveis de proteína C reativa, relacionada à presença do processo infeccioso em curso, bem como das citocinas TNF- α e IFN- γ , mas não

IL-10 (Figura 18A). A citocina IL-10 favorece a supressão da resposta pró-inflamatória (ROBERTS *et al.*, 2007). O aumento nos níveis de citocinas pró-inflamatórias e o controle na produção de IL-10 nos permitem inferir que durante a LCL a exacerbação da resposta imunológica ou a produção disfuncional de citocinas inflamatórias, característica do processo de senescência, favorece a progressão da doença. Dessa forma, ao analisar a secreção dessas citocinas com a frequência de células T de memória efetora altamente diferenciadas, nossos resultados mostraram que o aumento nos níveis de TNF- α e IFN- γ apresenta correlação positiva com presença de destas células que apresentam características de células senescentes ou de memória efetora altamente diferenciadas, diferentemente da produção de IL-10 em populações de células T CD8⁺ (FIGURA 18 B) e CD4⁺ (FIGURA 18 C).

Figura 18 – Análise da expressão de mediadores inflamatórios e da proteína C reativa e sua correlação com a frequência de células TCD4⁺ e CD8⁺ de memória efetora altamente diferenciadas





Análise, por ELISA, dos níveis de proteína C reativa, TNF- α , IFN- γ e IL-10 no plasma de pacientes com LCL (n=16) e indivíduos saudáveis (n=15) (A). Os gráficos mostram as médias \pm SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*. Análise da correlação destes mediadores com a frequência de células T CD8⁺ (B) e CD4⁺ (C) de memória efetora altamente diferenciadas por meio do teste de correlação de Pearson e da proteína C reativa nas demais subpopulações de memória dentro de CD4⁺ (D) e CD8⁺ (E).

* $p < 0,05$; **** $p < 0,0001$. LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada; CS: Controle saudável; CM: Memória central; EM: memória efetora; EMRA: memória efetora altamente diferenciada. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

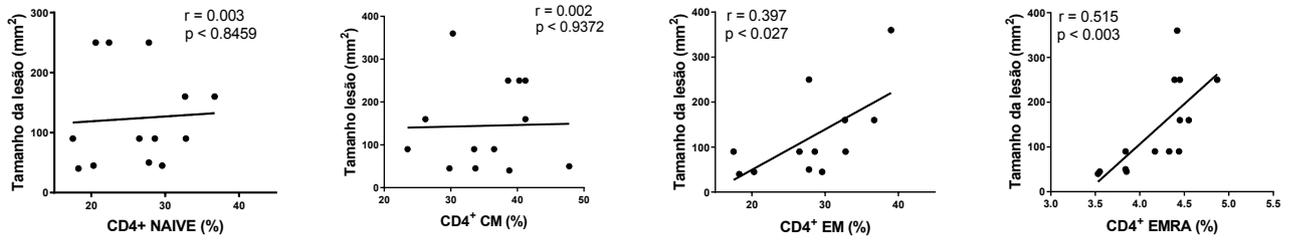
5.10. Correlação entre o acúmulo de células T de memória efetora altamente diferenciadas e o tamanho da lesão e da expressão de LCA em pacientes com LCL

A infecção por *L. braziliensis* leva ao acúmulo de células de memória efetora altamente diferenciadas, e estas células apresentam a capacidade de produzir altos níveis de mediadores inflamatórios, como o TNF- α , assim como as células de memória efetora O TNF- α , sendo uma citocina importante durante o processo de eliminação do parasito; no entanto, sua ação favorece a progressão da doença e, conseqüentemente, o agravamento das lesões (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2000). Nesse contexto, nossos resultados mostram haver uma correlação positiva entre a frequência das células de memória efetora e das efetoras altamente diferenciadas, dentro das populações de células T CD4⁺ (FIGURA 19 A) e CD8⁺ (FIGURA 19 B), e o tamanho da lesão, confirmando a importância da função efetora destas células na patogênese da doença. O mesmo resultado não pode ser observado entre as células naive e de memória central, tanto CD4⁺ (FIGURA 19 A) quanto em CD8⁺ (FIGURA 19 B).

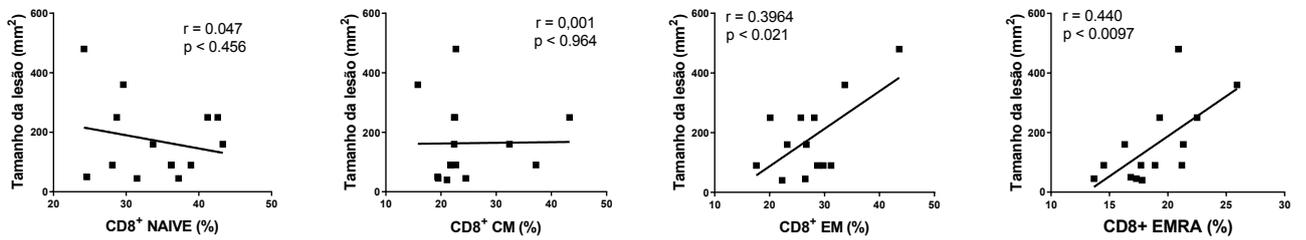
Nossos resultados também demonstraram que populações totais de células T CD4⁺ e CD8⁺ (FIGURA 19 C) e células T de memória efetora altamente diferenciadas de pacientes com LCL apresentam um aumento significativo na expressão de CLA quando comparados com indivíduos saudáveis (FIGURA 19 D). Esses achados sugerem que a LCL induz a expressão de receptores de endereçamento cutâneo, preferencialmente em células T de memória efetora e altamente diferenciadas, favorecendo sua migração para o local da lesão.

Figura 19 – Caracterização na expressão de CLA em células T CD4+ e CD8+ durante a LCL e correlação entre a frequência de células T efetoras altamente diferenciadas e o tamanho da lesão

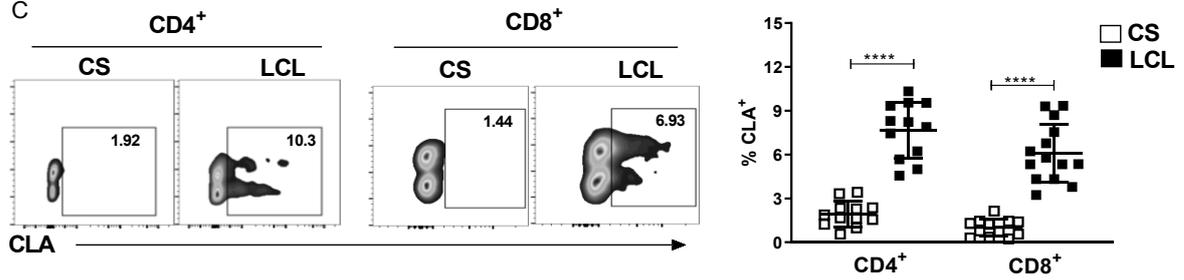
A



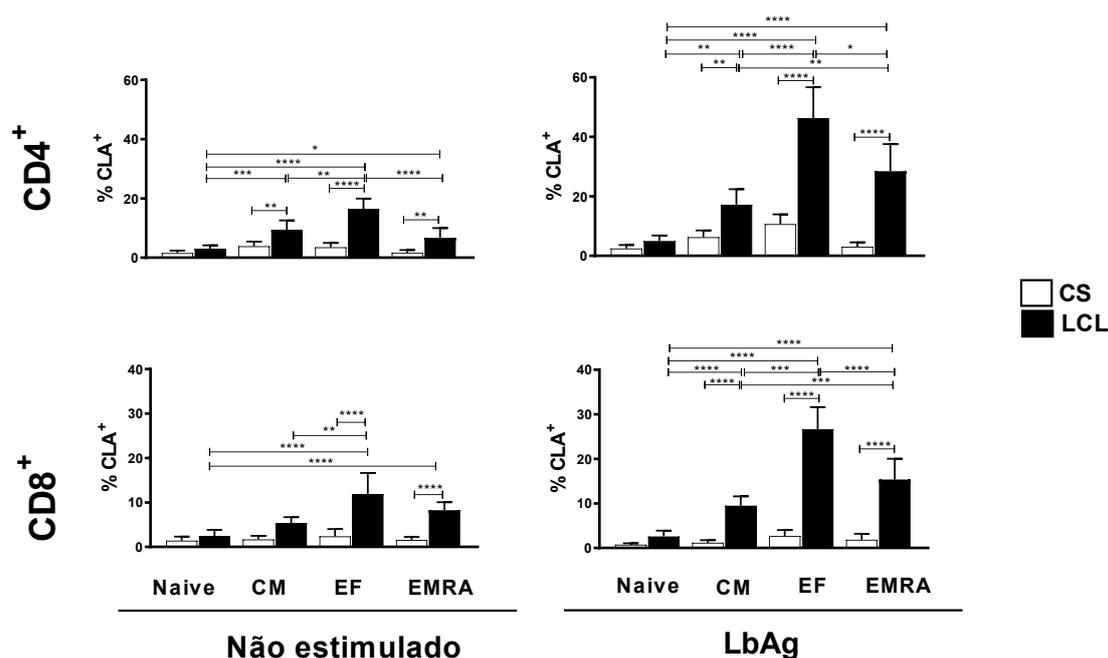
B



C



D



Análise da correlação entre o tamanho da lesão (mm²) de pacientes com LCL (n=14) e a frequência de células T CD4⁺ (A) e CD8⁺ (B) nas diferentes subpopulações de memória; Análise realizada por meio do teste de correlação de Pearson. Dot plots e dados cumulativos da expressão de CLA em células T CD4⁺ e CD8⁺ em pacientes com LCL (n= 14) e indivíduos saudáveis (n=12) (C). Análise, por citometria de fluxo, da expressão de CLA nas diferentes subpopulações de memória realizada em PBMCs estimuladas com 10ug/mL de promastigostas de *L. braziliensis* (LbAg) por 72 h de indivíduos com LCL (n=14) (D). Os gráficos mostram as médias \pm SEM. Para a análise estatística foi utilizado ANOVA com correção de Turkey para teste *Post Hoc*.

* p < 0,05; ** p < 0,01; ***p < 0,001; **** p < 0,0001; LCL: Leishmanise Cutânea LCA: Leucocyte-Associated Antigen; CM: Memória central; EM: Memória efetora; EMRA: Memória efetora altamente diferenciada. Fonte: Elaborada pela autora, 2019.

6. DISCUSSÃO

Grande parte dos agentes infecciosos é capaz de se evadir das defesas do sistema imunológico do hospedeiro. Esses microorganismos usam de diversas estratégias de evasão, como mecanismos que favorecem a redução nos níveis de IFN- γ pelas células T CD4⁺ e CD8⁺ efetoras e o aumento na produção de citocinas supressoras como TGF- β , IL-10 e IL-4 (ROBERTS *et al.*, 2007). As Citocinas TGF- β e L-10 inibem a ação das células do sistema

imunológicos responsáveis pela resposta inflamatória, regulam de forma negativa a expressão de moléculas coestimuladoras e favorecem a expressão de receptores de supressão (SIDDQUI *et al.*, 2014; SEREEJIT *et al.*, 2014) dificultando a ação da resposta imunológica adaptativa durante a infecção crônica (JURADO *et al.*, 2008; SINGH *et al.*, 2013).

Embora a expressão de receptores de supressão imunológica seja benéfica na contenção do progresso de doenças autoimunes, este princípio não se aplica ao desenvolvimento de tumores malignos e doenças infecciosas crônicas (McKINNEY *et al.*, 2015).

Estima-se que cada pessoa possua de 8 a 12 infecções crônicas durante a vida (VIRGIN, WHERRY & AHMED, 2009). Essas infecções desempenham um importante papel no declínio da capacidade efetora do sistema imunológico associado à senescência celular.

O receptor KLRG-1, associado à senescência celular, é amplamente expresso em células CD8⁺ durante infecções crônicas (ROSSHART *et al.*, 2008). O aumento significativo da expressão de KLRG-1 pode ser relacionado com a progressiva diferenciação das células T, sugerindo que infecções repetidas e persistentes estimulam a expressão deste receptor (ITO *et al.*, 2006; OUYANG *et al.*, 2003a; 2003b; THIMME *et al.*, 2005; VOEHRINGER, KOSCHELLA & PIRCHER, 2002).

Estudos já demonstraram que durante a infecção pelo *Mtb* os níveis KLRG1 encontram-se elevados e que estes níveis sofreram redução após o tratamento, sugerindo uma coorelação positiva entre a expressão de KLRG1 e a progressão/cronificação da tuberculose (HENAO-TAMAYO *et al.*, 2011). Além disso, Cyktor *et al.* (2013) demonstraram que camundongos C57BL/6 deficientes em KLRG-1 apresentavam maior sobrevida e diminuição da carga bacteriana durante a fase crônica da doença quando comparados a camundongo selvagens.

Outros estudos, usando transferência de células T que expressavam KLRG-1, mostraram que apesar de haver produção de IFN- γ , a capacidade proliferativa dessas células encontrava-se prejudicada (REILEY *et al.*, 2010), denotando haver um correlação entre a expressão de KLRG1 e a frequência de células de memória efetora altamente diferenciadas.

Assim como descrito em doenças crônicas, os resultados deste trabalho demonstraram que as células T CD8⁺ de pacientes com LCL expressam níveis significativamente mais elevados de KLRG-1 quando comparados com indivíduos saudáveis.

Entre as células T CD4⁺ de pacientes com LCL e indivíduos saudáveis não foram encontradas diferenças. Estudos sugerem que, provavelmente, as células TCD8⁺ respondam precocemente à estimulação antigênica ou que a presença do parasite exerça um impacto mais efetivo sobre estas células, provocando uma progressiva proliferação, levando as células a apresentarem um perfil de senescência replicativa e uma exaustão celular mais evidente que as células T CD4⁺ (PARODI *et al.*, 2016).

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.*, 2000). Em modelos de infecção por HIV, CD57 aparece como um importante marcador de senescência celular (BRENCHLEY *et al.*, 2003). Além disso, estudos descreveram que antes do tratamento, pacientes com HIV apresentavam alta frequência de células CD8⁺ senescentes baseando-se na expressão de CD57 e CD28. Da mesma forma, após a quimioterapia, pacientes com câncer de pulmão em estágio avançado demonstram um aumento significativo na população de células T CD8⁺ senescentes, caracterizadas pela expressão de CD57 e pela perda na expressão de CD28 quando comparados com indivíduos saudáveis (ONYEMA *et al.*, 2015).

As células CD4⁺ e CD8⁺ que expressam CD57 são capazes de produzir quantidade suficientes de IFN- γ , no entanto sua capacidade proliferativa, diante da estimulação antigênica, encontra-se prejudicada e, ainda, apresentam certa suscetibilidade a apoptose (BRENCHLEY *et al.*, 2003; CHONG *et al.*, 2008; FOCOSI *et al.*, 2010). Além disso, foi demonstrado que células T CD4⁺ antígeno-específicas de pacientes com tuberculose ativa expressam significativamente mais CD57 quando comparadas com pacientes com infecção latente, sugerindo a importância da estimulação persistente e massiva do patógeno no processo de diferenciação destas células.

Pacientes acometidos por LC apresentam altos níveis de expressão da molécula CD57 nas populações de células TCD8⁺ (PARODI *et al.*, 2016), assim como mostram nossos resultado, bem como pacientes LMC, que além de expressarem significativamente mais CD57 em células T CD8⁺, apresentam o mesmo aumento em células T CD4⁺ quando comparados com indivíduos saudáveis.

Nossos resultados demonstraram, que células T CD4⁺ e CD8⁺ expressam níveis significativamente maiores da histona γ H2AX em pacientes com LCL quando comparados com indivíduos saudáveis, sugerindo que a condição de inflamação crônica, provocada pela

LCL, leva o detrimento de segmentos do DNA. Henson *et al.* (2014) descreveram que além dos defeitos proliferativos gerados a partir da senescência replicativa, as células T CD8⁺ altamente diferenciadas apresentam níveis elevados de dano no DNA e perda da atividade da enzima telomerase. Do mesmo modo, estes estudos demonstraram que o estímulo provocado pelos danos causados ao DNA pode desencadear uma série de cascatas de sinalização como, por exemplo, a ativação via da proteína quinase p38.

A partir de estímulos como fatores de estresse gerados no microambiente e citocinas pró-inflamatórias, a ativação da cascata de sinalização da proteína quinase p38 é desencadeada (NEBRADA & PORRAS, 2000). A proteína quinase p38 é membro da superfamília das MAPK 38 e apresenta-se como molécula reguladora chave de processos biológicos essenciais, como diferenciação celular (ENGELMAN *et al.*, 1998) e apoptose (ZECHNER *et al.*, 1998). Autores já descreveram o aumento na sinalização da proteína p38 em células T CD8⁺ de memória altamente diferenciadas (HENSON *et al.*, 2014) e o envolvimento desta MAP quinase na redução da ação da telomerase e da capacidade proliferativa das células senescentes (HENSON *et al.*, 2014; 2015; LANNA *et al.*, 2013). Esse resultado também pode ser evidenciado em nossas análises, bem como o aumento nos níveis de expressão de receptores de supressão e a expressão de γ H2AX, mecanismos associados à senescência celular, durante a infecção por *L. braziliensis*.

A senescência celular resulta na perda progressiva da capacidade proliferativa das células T durante o processo inflamatório crônico (AKBAR & HENSON, 2013). Os defeitos proliferativos podem ser identificados a partir da marcação da proteína Ki67. A Ki67 localiza-se no núcleo celular e corresponde a uma proteína não histônica (GERDES *et al.*, 1990), presente nos diferentes estágios do ciclo celular (exceto G0) (BROWN & GATTER *et al.*, 1991). Nossos resultados mostraram que a infecção por *L. braziliensis* potencializa os defeitos proliferativos gerados as células T senescentes, uma vez que células de memória em diferentes estágios de diferenciação, especialmente as células altamente diferenciadas, de indivíduos com LCL expressam significativamente menos Ki67 do que indivíduos saudáveis, tanto em células T CD4⁺ quanto em CD8⁺.

As células T CD8⁺ altamente diferenciadas além possuírem defeitos proliferativos, apresentam níveis elevados de dano no DNA e baixa na capacidade regulação da enzima telomerase (HENSON *et al.*, 2014; 2015). Apesar da redução da ação da telomerase e, conseqüentemente da diminuição do telômeros estarem associados ao envelhecimento celular,

Di Mitri *et al.* (2011) e Riddell *et al.* (2014) relataram que células T altamente diferenciadas, diferentemente do que se espera, possuem telômeros maiores que células de memória efetora. No entanto, Romero *et al.* (2007) demonstraram que as diferentes subpopulações de memória apresentam uma diminuição progressiva no tamanho dos telômeros em decorrência da constante diferenciação celular.

Nossos resultados mostraram que em decorrência da constante estimulação antigênica e o ambiente pró-inflamatório crônico gerado pela LCL, as populações de células TCD4⁺ e CD8⁺ de pacientes com LCL apresentam telômeros significativamente menores quando comparados com indivíduos saudáveis. Além disso, quando comparamos e analisamos a atividade da enzima telomerase em células T CD8⁺ de memória efetora altamente diferenciadas, de indivíduos com LCL com indivíduos saudáveis, notamos uma diminuição significativa nos níveis de expressão da unidade catalítica hTERT da enzima telomerase. Isto sugere que a infecção persistente e a inflamação crônica ocasionada pela LCL potencializam o processo de senescência nestas células.

A estimulação antigênica persistente e a inflamação crônica, bem como a idade do hospedeiro desempenham um importante papel na regulação e diferenciação das células T. Estes processos levam as células T a desenvolverem um fenótipo altamente diferenciado, característico de células senescentes. (DI MITRI *et al.*, 2011; WALLACE *et al.*, 2011). Autores já demonstraram haver aumento no número de células de memória efetora altamente diferenciadas durante a infecção por CMV, independente da idade do indivíduo (ALMANZAR *et al.* 2005; CHIDRAWAR *et al.*, 2009; LIBRI *et al.*, 2007). Com base na afirmação dos autores, nossos resultados mostraram-se coerentes uma vez que em nossas análises é possível observar que pacientes com LCL, infecção crônica e persistente, possuem uma quantidade significativamente superior de células altamente diferenciadas, CD4⁺ e CD8⁺, quando comparados com indivíduos saudáveis.

Apesar das células de memória efetora e altamente diferenciadas apresentarem defeitos de proliferação, estas são capazes de expressar altos níveis de granzimas B e perforinas (LIBRI *et al.*, 2011) além de possuírem um importante papel na defesa do organismo contra infecções (BRUNS *et al.*, 2009). Da mesma forma, células T de memória efetora são capazes de produzir grande quantidade de citocinas pró-inflamatórias, IFN- γ e TNF- γ e apresentam uma rápida e eficaz ação citotóxica, durante o processo infeccioso (HAMANN *et al.*, 1997) favorecendo a progressão da doença.

Estudos demonstraram que biópsias retiradas de pacientes com LCL apresentam altos níveis da citocina pro-inflamatória TNF- α (ANTONELLI *et al.*, 2005), produzidos por neutrófilos, células TCD8⁺ ativadas e NK (DA-CRUZ *et al.*, 2002; D'OLIVEIRA Jr *et al.*, 2002; JORDAN & HUNTER, 2010; PIRMEZ *et al.*, 1993). O TNF- α contribui positivamente com a destruição do parasito, no entanto suas funções de citotoxicidade e necrose levam a progressão da doença (RIBEIRO-DE-JESUS *et al.*, 1998; BACELLAR *et al.*, 2000; DA-CRUZ *et al.*, 2002). Dessa forma, a participação das células T CD8⁺ e NK tanto na produção de TNF- α quanto na promoção da ação citotóxica gerada partir da infecção por *L. braziliensis*, apesar de promover a eliminação do parasito favorecem o agravamento das lesões (MACHADO *et al.*, 2002).

Novais *et al.*, (2013) mostraram que o gene associado a produção de granzimas A e B é significativamente mais expresso em lesões de pacientes com LCL do que em indivíduos saudáveis. Pacientes com LCL apresentam uma maior ativação da via de citotoxicidade mediada por células NK quando comparados com pacientes com psoríase, sugerindo que este mecanismo é uma característica da lesão ulcerada e não apenas do processo inflamatório propriamente dito. Estes resultados sugerem que a citotoxicidade é um dos principais mecanismos associados à progressão da doença (NOVAIS & SCOTT, 2015).

A ação citotóxica das células T CD8⁺, mediada pela produção de granzimas B leva a fragmentação do DNA e conseqüentemente a morte da célula alvo (LORD *et al.*, 2003). Nesse contexto, Hernández-Ruiz *et al.*, (2010) demonstraram que o aumento no número macrófagos apoptóticos na lesão de pacientes com LC causada por *L. mexicana* possivelmente estava associado à ação citotóxica de linfócitos T CD8⁺. De modo semelhante, estudos mostraram uma associação positiva entre o processo de necrose e a freqüência de células T CD8⁺ granzima B⁺ (SANTOS *et al.*, 2013).

Santos *et al.* (2013), descreveram que células CD8⁺ cultivadas na presença de macrófagos infectados com *Leishmania*, apesar de produzirem grandes quantidades de granzima B, não são capazes de eliminar o patógeno. A presença do parasito, provavelmente, leva a ativação contínua destas células aumentando assim à produção de grânulos citotóxicos (SANTOS *et al.*, 2013). Além disso, pesquisas comprovaram que células TCD8⁺ retiradas da biópsia de pacientes com LCL, expressavam em sua superfície CD107a sugerindo a degranulação destas células dentro da lesão (NOVAIS *et al.*, 2013; SANTOS *et al.*, 2013) Dessa forma, estudos mostraram que a expressão de granzimas pelas células CD8⁺ está

diretamente relacionada à intensidade do processo inflamatório local e com progressão da doença em pacientes com LCL (FARIA *et al.*, 2009).

De forma semelhante, durante o desenvolvimento da malária cerebral, a presença de células T CD8⁺ citotóxica desempenha um importante papel na imunopatogênese da doença (HAQUE *et al.*, 2011).

Apesar de seu efeito na destruição tecidual, a citotoxicidade mediada pela produção de granzima B constitui um importante mecanismo da resposta imunológica no combate a LC. Estudos demonstraram que pacientes que vivem em áreas endêmicas de transmissão por *L. major* desenvolvem uma resposta imunológica citotóxica específica capaz de proteger o indivíduo de reinfecções (BOUSOFFARA *et al.*, 2004).

Já está bem estabelecido que durante a LCL exista um equilíbrio entre as respostas imunológicas com perfis Th1 e Th2. Em pacientes com LCL a imunopatogênese da lesão está associada a uma vigorosa resposta inflamatória Th1 a presença do antígeno de *Leishmania*. Além disso, o tamanho da lesão correlaciona-se diretamente com os altos níveis na produção da citocina pró-inflamatória TNF- α pelas PBMCs estimuladas pelo antígeno e com a frequência de células T CD4⁺ produtoras de TNF- α e IFN- γ circulantes (ANTONELLI *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Estudos revelaram que logo após a formação da ulceração clássica, as células T de pacientes com LCL e LMC produzem elevados níveis de TNF- α e IFN- γ e baixos níveis de IL-10 (BACELLAR *et al.* 2002; UNGER *et al.*, 2009). No entanto em estágios avançados da doença, as citocinas identificadas em altos níveis são IL-10 e TGF- β . A produção tardia destas citocinas pode indicar a necessidade conter a ação de citocinas pró-inflamatórias produzidas precocemente, após a resolução da fase aguda da doença (HEJAZI *et al.*, 2012; MELBY *et al.*, 1994).

Nossos resultados mostraram haver uma baixa produção de IL-10 sistêmico em pacientes com LCL. Os baixos níveis de IL-10 também foram detectados no sobrenadante de PBMCs retiradas de pacientes com LCL e LMC e estimuladas com antígenos de *Leishmania* (BOURREAU *et al.*, 2009; CAMPANELLI *et al.*, 2006; FARIA *et al.*, 2009). Esse achados podem sugerir haver um desequilíbrio entre as respostas pró e anti-inflamatórias ou ainda que os pacientes estudados encontravam-se no início da infecção (MELBY *et al.*, 1994; HEJAZI *et al.*, 2012).

Análise do infiltrado inflamatório das lesões de pacientes com LCL mostram a presença abundante de linfócitos T, especialmente células T de memória (MAGALHÃES *et al.*, 1986; PIRMEZ *et al.*, 1990). Estudos já demonstraram haver um grande influxo de linfócitos circulantes para o local da lesão uma vez que estas células respondem mais efetivamente a estimulação antigênica pela *L. braziliensis* que aquelas encontradas no sangue (BARRAL *et al.*, 1987; CONCEIÇÃO-SILVA *et al.*, 1990; MODLIN *et al.*, 1985; PIRMEZ *et al.*, 1990). Apesar da resposta efetora das células T ser um importante mecanismo de combate à infecção, sua ação pode levar ao dano tecidual e, conseqüentemente, à progressão da doença (ROCHA *et al.*, 1999; CARVALHO *et al.*, 2007).

A migração linfocitária para tecidos específicos é um processo especializado, direcionado pela interação entre moléculas de adesão e seus ligantes expressos no endotélio vascular e também pela expressão de fatores quimiotáticos (PICKER *et al.*, 1990a; 1990b). Para chegar ao sítio da infecção, os linfócitos expressam integrinas e selectinas que, além de permitirem a adesão destas células no endotélio, guiam-nas aos locais de inflamação (SCHON, ZOLLNER & BOEHNCKE, 2003).

Em doenças inflamatórias como a LCL, para ter acesso ao tecido cutâneo, as células T expressam CLA, VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) e LFA-1 (*Lymphocyte-Associated Antigen-1*), receptores responsáveis por promover a adesão ao endotélio ativado e transmigração dos linfócitos T para o local inflamado. O CLA é um membro da superfamília das selectinas e são comumente expressos em células T de memória. Seu ligante E-selectina expresso no endotélio direciona as células ao local da inflamação (SANTAMARIA-BABÍ, 2004). O CLA tem sido descrito como uma das principais moléculas de endereçamento cutâneo e sendo conseqüentemente associado à patogênese e severidade de diferentes doenças inflamatórias como psoríase (SIGMUNDSDÓTTIR, *et al.*, 2001), hanseníase (SIELING *et al.*, 2007) e dermatites atópicas (ANTÚNEZ *et al.*, 2004)

Em lesões causadas pela dermatite atópica, células T CD8⁺CLA⁺ apresentam um fenótipo de células de memória efetora (AKDIS *et al.*, 1999). Em biópsias de pacientes infectados com *L. braziliensis*, estas células efetoras são predominantemente citotóxicas e correlacionam-se positivamente com a produção de marcadores de citotoxicidade, intensidade de necrose e o tamanho da lesão. Este perfil favorece diretamente o dano tecidual nestes pacientes (SANTOS *et al.*, 2013)

Além disso, Santos *et al.* (2013), demonstraram que pacientes com LCL apresentam um aumento no número de células TCD8⁺ CD45RO⁺ quando comparados com indivíduos saudáveis e, que migração e retenção destas células no sítio da infecção se associa a expressão de CLA (COSTA *et al.*, 2003; LIEBERMAN, 2010; MENDES-AGUIAR *et al.*, 2009). Esses achados foram comprovados pela diminuição na expressão de CCR7, receptor expresso em células efetoras responsáveis por direcionar as células T para os linfonodos (COSTA *et al.*, 2003; SALLUSTO & MACKAY, 2004).

Nossos resultados mostraram, assim como estudos anteriores, que durante a LCL ativa, a estimulação antigênica possivelmente modula a expressão de CLA pelas células T favorecendo a migração destas células para o local da lesão. Esses resultados sugerem que o aumento no nível de expressão de CLA não só influencia a composição celular do infiltrado inflamatório da lesão, mas também favorece a severidade da doença (MENDES-AGUIAR *et al.*, 2009).

A correlação positiva entre o acúmulo de células T senescentes e o tamanho da lesão verificada pelas nossas análises demonstram haver uma forte relação entre a resposta inflamatória sistêmica e local. Isso nos permite inferir que o aumento na expressão dos receptores CLA leva ao recrutamento destas células para o tecido cutâneo, e que a presença dessas células no sítio da infecção possa favorecer a imunopatogênese da lesão.

Apesar dos receptores de supressão e alguns mecanismos associados à senescência celular já terem sido descritos na infecção por HIV e CMV, pouco se sabe sobre o seu papel na imunopatogênese de doenças parasitárias, como a leishmaniose. Portanto, nosso trabalho fornece dados importantes para o entendimento da relação entre a imunopatogênese da LCL e os mecanismos imunológicos associados à diferenciação, proliferação e ação efetora das células T de memória durante o processo de senescência.

7. CONCLUSÃO

Foi possível concluir que a infecção por *L. braziliensis* levou ao desenvolvimento de características de senescência celular em linfócitos T, efetores e de memória, mostrado pela primeira vez nos resultados deste trabalho.

REFERÊNCIAS

- ADEKAMBI, T. *et al.* Distinct effector memory CD4⁺ T cell signatures in latent Mycobacterium tuberculosis infection, BCG vaccination and clinically resolved tuberculosis. **PLoS One**, 7: e36046, 2012.
- AJDARY, S. *et al.* Comparison of the immune profile of nonhealing cutaneous leishmaniasis patients with those with active lesions and those who have recovered from infection. **Infect Immun.**, 68: 1760-1764, 2000.
- AKBAR, A. N.; HENSON, S. M. Are senescence and exhaustion intertwined or unrelated processes that compromise immunity? *Nat. Rev. Immunol.*, 11: 289-295, 2011. PMID: 21436838.
- AKBAR, A. N.; VUKMANOVIC-STEJIC, M. Telomerase in T Lymphocytes: Use It and Lose It? **J. Immunol.**, 178: 6689-6694, 2007.
- AKDIS, M. *et al.* Skin homing (cutaneous lymphocyte-associated antigen-positive) CD8⁺ T cells respond to superantigen and contribute to eosinophilia and IgE production in atopic dermatitis. **J Immunol.**, 163:466-475, 1999.
- AKILOV, O. E., KHACHEMOUNE, A., HASAN, T. Clinical manifestations and classification of Old World cutaneous leishmaniasis. **Int J Dermatol.**, 46 (2): 132-142, 2007.
- ALBAREDA, M. C. *et al.* Trypanosoma cruzi modulates the profile of memory CD8⁺ T cells in chronic Chagas' disease patients. **Int Immunol.**, 18 (3): 465-471, 2006.
- ALMANZAR, G. S. *et al.* Long-term cytomegalovirus infection leads to significant changes in the composition of the CD8⁺ T-cell repertoire, which may be the basis for an imbalance in the cytokine production profile in elderly persons. **J. Virol.**, 79: 3675-3683, 2005.
- ANGELOSANTO, J. M.; WHERRY, E. J. Transcription factor regulation of CD8⁺ – T cell memory and exhaustion. **Immunol. Rev.**, 236: 167–175, 2010.
- ANTINORI, S., SCHIFANELLA, L., COBERLLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis.**, 31 (2): 109-118, 2012.
- ANTONELLI, L. R. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunol Lett.**, 101 (2): 226-230, 2005.
- ANTROBUS, R. D. *et al.* Virus-specific cytotoxic T lymphocytes differentially express cell-surface leukocyte immunoglobulin-like receptor-1, an inhibitory receptor for class I major histocompatibility complex molecules. **J Infect Dis.**, 191: 1842-1853, 2005.
- ANTÚNEZ, C. *et al.* Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte associated antigen+ T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. **Clin Exp Allergy**, 34: 559-566, 2004.
- ARAÚJO-MELO, M. *et al.* Risk factors associated with dizziness during treatment of mucosal leishmaniasis with meglumine antimoniate: 16-year retrospective study of cases from Rio de Janeiro, Brazil. **J Laryngol Otol**, 124: 1056–1060, 2010.
- AYATOLLAHI, J., FATTAHI, B., SHAHCHERAGHI, S. H. Rare variants of cutaneous leishmaniasis presenting as eczematous lesions. **Med J Islam Repub Iran**, 28:71, 2014.

- BACELLAR, O. *et al.* IL-10 and IL-12 are the main regulatory cytokines in visceral leishmaniasis. **Cytokine**, 12 (8): 1228-1231, 2000.
- BACERLLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infect Immun.**, 70: 6734-6740, 2002.
- BAITSCH, S. A. *et al.* The three main stumbling blocks for anticancer T cells. **Trends in Immunology**, 33(7): 364-372, 2012.
- BAKER, D. J. *et al.* Clearance of p16Ink4a-positive senescent cells delays ageing-associated disorders. **Nature**, 479 (7372): 232-236, 2011.
- BANDARU, A. *et al.* Phosphorylated STAT3 and PD-1 regulate IL-17 production and IL-23 receptor expression in Mycobacterium tuberculosis infection. **Eur J Immunol.**, 44: 2013-2024, 2014
- BARI, A. U.; RAHMAN, S. B. Many faces of cutaneous leishmaniasis. **Dermatol Venereol Leprol.**, 74(1): 23-27, 2008
- BARRAL, A. *et al.* Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, 9:487-497, 1987.
- BARRAL, A. *et al.* Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 53: 256-259, 1995.
- BARRAL-NETO, M. *et al.* Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, 17:21–8, 1995.
- BASU, M. K.; RAY M. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. **Crit Rev Microbiol.**, 31: 145-154, 2005.
- BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int J Parasitol.**, 37: 1097–1106, 2007
- BAVIK, C. *et al.* The gene expression program of prostate fibroblast senescence modulates neoplastic epithelial cell proliferation through paracrine mechanisms. **Cancer Res.**, 2006, 66: 794-802, 2006.
- BEATTIE, L.; KAYE, P. M. *Leishmania*-host interactions: what has imaging taught Us? **Cell Microbiol.**, 11:1659-1667, 2011.
- BELLON, M.; NICOT, C. Telomere Dynamics in Immune Senescence and exhaustion triggered by chronic viral infection. **Viruses**, 5: 9-10, 2017.
- BETTS, M. R. *et al.* HIV nonprogressors preferentially maintain highly functional HIV-specific CD8⁺ T cells. **Blood**, 107: 4781-4789, 2006.
- BHADRA, R. *et al.* Control of Toxoplasma reactivation by rescue of dysfunctional CD8⁺ T-cell response via PD-1-PDL-1 blockade. **Proceedings of the National Academy of Science**, 108: 9196-9201, 2011.
- BIN W. *et al.* Upregulated expression of Tim-3 involved in the process of toxoplasmic encephalitis in mouse model. **Parasitol Res.**, 12:2511–2521, 2003.
- BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. **FEBS Lett.**, 579: 859-862, 2005.

- BLACKBURN, S. D. *et al.* Coregulation of CD8⁺ T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. **Nat. Immunol.**, 10: 29-37, 2009.
- BLACKBURN, S. D.; WHERRY, E. J. IL-10, T cell exhaustion and viral persistence. **Trends Microbiol.**, 15: 143-146, 2007.
- BOAVENTURA, V. S. *et al.* Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg.**, 75: 267-269, 2006.
- BOURREAU, E. *et al.* IL-10 producing CD8⁺ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. **Microbes Infect.**, 9:1034-1041, 2007.
- BOURREAU, E. *et al.* In leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis* infection, distinct intralesional interleukin-10 and Foxp3 mRNA expression are associated with unresponsiveness to treatment. **J. Infect. Dis.**, 199: 576-579, 2009.
- BOUSOFFARA, T. *et al.* Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis.**, 189 (7): 1265-1273, 2004.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar.pdf. Acesso em: 23 jul. 2019.
- BRASIL. Casos de leishmaniose caem no País, mas doença ainda requer atenção. 2017. **Portal Governo do Brasil**, Saúde, 2017, 8. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/noticias/saude/2017/08/casos-de-leishmaniose-caem-no-pais-mas-doenca-ainda-requer-atencao>. Acesso em: 23 jul. 2019.
- BRENCHLEY, J. M. *et al.* Expression of CD57 defines replicative senescence and antigen-induced apoptotic death of CD8⁺ T cells. **Blood** 101(7): 2711–2720, 2003.
- BRODSKYN, C. I. *et al.* Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. **J Immunol.**, 159: 4467-4473, 1997.
- BROWN, D. C & GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. **Histopathology**, 17: 489-503, 1990.
- BRUNS, H. C. *et al.* Anti-TNF immunotherapy reduces CD8⁺ T cell-mediated antimicrobial activity against *Mycobacterium tuberculosis* in humans. **J Clin Invest.**, 119 (5): 1167-77, 2009.
- BURNS, E. A.; GOODWIN, J. S. Immunodeficiency of aging. **Drugs Aging**, 11(5): 374-397, 1997.
- CAMPANELLI, A. P. *et al.* CD4⁺CD25⁺ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. **J Infect Dis.**, 193: 1313-1322, 2006.
- CAMPISI, J. *et al.* Cellular senescence: a link between cancer and age-related degenerative disease? **Semin Cancer Biol.**, 21: 354-359, 2011.

- CAMPISI, J.; D'ADDA di FAGAGNA. Cellular senescence: when bad things happen to good cells. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 8: 729–740, 2007.
- CARDOSO, T. M. *et al.* Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Infect Immun.**, 83 (3): 898-906, 2015.
- CARVALHO, A. M. *et al.* Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. **BMC Infect Dis.**, 13: 529, 2013.
- CARVALHO, E. M. *et al.* Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Trop.**, 56 (4): 315–325, 1994.
- CARVALHO, L. P. O *et al.* Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. **Parasite Immunol.**, 9:251-258, 2007.
- CEBRIAN, M. *et al.* Three different antigen specificities within the leucocyte common antigen or T200 complex: A biochemical, cell distribution and functional comparative study. In McMICHAEL, A. J. *et al.* (Eds.) typing III, **Oxford University Press**, 1987. p. 823.
- CEYHAN, A. M. *et al.* A case of erysipeloid cutaneous leishmaniasis: atypical and unusual clinical variant. **Am J Trop Med Hyg.**, 78 (3): 406-408, 2008.
- CHIDRAWAR, S. *et al.* Cytomegalovirus-seropositivity has a profound influence on the magnitude of major lymphoid subsets within healthy individuals. **Clin. Exp. Immunol.**, 155: 423-432, 2009.
- CHONG, L. K. *et al.* Proliferation and interleukin 5 production by CD8^{hi} CD57⁺ T cells. **Eur J Immunol.**, 38(4): 995–1000, 2008.
- COFFMAN, R. L. *et al.* The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation; **Immunol Rev.**, 102: 5-28, 1988.
- COMBADIERE, B. *et al.* Distinct time effects of vaccination on long-term proliferative and IFN-gamma-producing T cell memory to smallpox in humans. **J Exp Med.**, 199 (11): 1585-1593, 2004.
- CONCEIÇÃO-SILVA, F. *et al.* Quantitative study of *Leishmania (braziliensis) braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.**, 79: 221-226, 1990.
- COOK, J. M. *et al.* Alterations in the human immune response to the hepatitis B vaccine among the elderly. **Cell Immunol.**, 109:89-96, 1987.
- COPPE, J. P. *et al.* Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell non autonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor. **PLoS Biol.**, 6: 2853-2868, 2008.
- COSSARIZZA, A. *et al.* CD45 isoforms expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. **Mech. Ageing Dev.**, 86: 173-195, 1996.
- COSTA, J. M. *et al.* Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. **J Trop Med Hyg.**, 89(6): 319-323, 1986.
- COSTA, R. P. *et al.* Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4⁺ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. **Immunol Lett.**, 90:155-159, 2003.

- CRESPO, J. *et al.* T cell anergy, exhaustion, senescence, and stemness in the tumor microenvironment. **Current Opinion in Immunology**, 25(2): 214–221, 2013.
- CURIEL, T. J. *et al.* Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. **Nature Medicine**, 9(5): 562-567, 2003.
- CYKTOR, J. C. *et al.* Killer Cell Lectin-Like Receptor G1 Deficiency Significantly Enhances Survival after Mycobacterium tuberculosis Infection. **Infect Immun.**, 81(4): 1090-1099, 2013.
- D'OLIVEIRA JR, A. *et al.* Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 35(1): 7-10, 2002.
- DA-CRUZ, A.M. *et al.* T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. **Clin Diagn Lab Immunol.**, 9(2):251-256, 2002.
- DA-CRUZ, A. M. *et al.* Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. **Br J Dermatol.**, 153:537-43, 2005.
- DAHSE, R., FIEDLER, W., ERNST, G. Telomeres and telomerase. **Pathologe.**, 18(6):425-9, 1997.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Therapy**, 22(6): 491-502, 2009.
- DAVIS, M. M. Not-so-negative selection. **Immunity**, 43 (5): 833-5, 2015.
- DI MITRI, R. I. *et al.* Reversible senescence in human CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ memory T cells. **J. Immunol.**, 187: 2093–2100, 2011.
- DIMIER-DAVID, L. *et al.* Epidemiological, clinical and biological features of mucocutaneous leishmaniasis in Bolivia after a 221 patient sample. **Bull Soc Pathol Exot.**, 6: 106-111, 1993.
- DINIZ, D. S., COSTA, A. S., ESCALDA, P. M. The effect of age on the frequency of adverse reactions caused by antimony in the treatment of American tegumentary leishmaniasis in Governador Valadares, State of Minas Gerais, Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 45: 597-600, 2012.
- DUNNE, P. J. *et al.* Epstein-Barr virus-specific CD8⁺ T cells that re-express CD45RA are apoptosis-resistant memory cells that retain replicative potential. **Blood**, 100(3): 933-940, 2002.
- EFFROS, R. B., CAI, Z., LINTON, P. J. CD8 T cells and aging. *Crit. Rev. Immunol.*, 23: 45-64, 2003.
- ESCH, K. J. *et al.* Programmed Death 1–Mediated T Cell Exhaustion during Visceral Leishmaniasis Impairs Phagocyte Function. **The Journal of Immunology**, 191: 5542-5550, 2013.
- FARIA, D. R. *et al.* Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol.**, 31(8): 432-439, 2009.

- FLETCHER, J. M. *et al.* Cytomegalovirus-specific CD4⁺ T cells in healthy carriers are continuously driven to replicative exhaustion; **J. Immunol.**, 175: 8218-822, 2005.
- FOCOSI, D. *et al.* CD57⁺ T lymphocytes and functional immune deficiency. **J Leukoc Biol.**, 87(1):107–116, 2010.
- FOLLADOR, I. *et al.* Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania* infection. **Clin Infect Dis.**, 34: 54-58, 2002.
- FRANCA-COSTA, J. *et al.* Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Infect. Dis.**, 211: 426–435, 2015.
- FREUND, A. *et al.* Inflammatory networks during cellular senescence: causes and consequences. **Trends Mol Med.**, 16: 238-246, 2010.
- FUMAGALLI, M. *et al.* Telomeric DNA damage is irreparable and causes persistent DNA-damage-response activation. **Nat Cell Biol.**, 14(4): 355-365, 2012.
- GAZE, S. T. *et al.* Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. **Scand J Immunol.**, 63(1): 70-78, 2006.
- EGINAT, J., LANZAVECCHIA, A., SALLUSTO, F. Proliferation and differentiation potential of human CD8⁺ memory T-cell subsets in response to antigen or homeostatic cytokines. **Blood**, 101:4260-4266, 2003.
- GERDES, J. *et al.* Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol.**, 238: 867-73, 1991.
- GIGLEY, J.P. *et al.* T cell exhaustion in protozoan disease. **Trends in Parasitology**, 28: (9) 110, 2012.
- GIUDICE, A. *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection. **BMC Infect. Dis.**, 12: 75, 2012.
- GLENNIE, N. D. *et al.* Skin-resident memory CD4⁺ T cells enhance protection against *Leishmania* major infection. **J Exp Med.**, 212 (9): 1405-1414, 2015.
- GLENNIE, N. D.; SCOTT, P. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. **Cell Immunol.** 309: 50-54, 2016.
- GLOBAL HEALTH. **Division of Parasitic Diseases**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em: 23 jul. 2019.
- GLOBAL LEISHMANIASIS UPDATE, 2006-2015: turning point in leishmaniasis surveillance. 38 (92): 557-572, 2017.
- GONÇALVES, R. *et al.* Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania* major infection. **J. Exp. Med.** 208: 1253–1265, 2011.
- GOODWIN, K., VIBOUD, C., SIMONSEN, L. Antibody response to influenza vaccination in the elderly: a quantitative review. **Vaccine**, 24(8):1159-1169, 2006.

- GORAK, P. M., ENGWERDA, C. R., KAYE, P. M. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection. **Eur J Immunol.**, 28(2): 687-95, 1998.
- GORONZY, J. J.; WEYAND, C. M. Rheumatoid arthritis. **Immunol. Rev.**, 204: 55-73, 2005
- GOURLEY, T. S. *et al.* Generation and maintenance of immunological memory. **Semin Immunol.**, 16(5): 323-33, 2004.
- GRAEFE, S.E. *et al.* CTLA-4 regulates the murine immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasite Immunol.**, 26: 19–28, 2004.
- GUERRERO, E. T. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000 Res.**, 6:750, 2017.
- GUIMARAES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proc. Natl Acad. Sci.**, USA 106, 6748–6753 (2009)
- GUTIERREZ, F. R. *et al.* Regulation of *Trypanosoma cruzi*-induced myocarditis by programmed death cell receptor 1. **Infect Immun.**, 79: 1873-1881, 2011.
- HAMANN, D. *et al.* Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8⁺ T cells. **J. Exp. Med.**, 186: 1407-1418, 1997.
- HAMMARLUND, E. *et al.* Duration of antiviral immunity after smallpox vaccination. **Nat. Med.**, 9: 1131-1137, 2003.
- HANDMAN, E., ELSO, C., FOOTE, S. Genes and susceptibility to leishmaniasis. **Adv Parasitol.**, 59: 1-75, 2005.
- HAQUE, A. *et al.* Granzyme B expression by CD8⁺ T cells is required for the development of experimental cerebral malaria. **J Immunol.**, 186: 6148-56, 2011.
- 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**, 10: e013764, 2015.
- HAYFLICK, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.** 37:614-36, 1965.
- HAYFLICK, L.; MOORHEAD, P. S. The serial cultivation of human diploid cell strains. **Exp. Cell Res.** 25: 585-621, 1961.
- HEJAZI, S. *et al.* Interleukin-10 and transforming growth factor- β in early and late lesions of patients with *Leishmania major* induced cutaneous leishmaniasis. Iran. **J.Parasitol.**, 7:16-23, 2012.
- HENAO-TAMAYO, *et al.* T lymphocyte surface expression of exhaustion markers as biomarkers of the efficacy of chemotherapy for tuberculosis. **Tuberculosis (Edinb)**, 91(4):308-313, 2011.
- HENSON, S. M. *et al.* KLRG1 signaling induces defective Akt (ser⁴⁷³) phosphorylation and proliferative dysfunction of highly differentiated CD8⁺ T cells. **Blood**, 113: 6619-6628, 2009.
- HENSON, S. M. *et al.* p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8⁺ T cells. **J. Clin. Invest.**, 124: 1-13, 2014.
- HENSON, S. M.; AKBAR, A. N. KLRG1- more than a marker for T cell senescence. **Age**, 31: 285-291, 2009.

- HERNÁNDEZ-RUIZ, J. *et al.* CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, *in vitro*, by TLR2 agonists. **PLoS Negl Trop Dis.**, 4(11):e871, 2010.
- HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, I. CD8⁺ cytotoxic lymphocytes in cutaneous leishmaniasis. **Salud Publica Mex.**, 48: 430-439, 2006.
- HIRVE, S. *et al.* Transmission Dynamics of Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent - A Systematic Literature Review. **PLoS Negl Trop Dis.**, 10(8): e0004896, 2016.
- HOCHEDÉZ, P.; CAUMES, E. Common skin infections in travelers. **J. Travel Med.**, 15, 252-262, 2008.
- HODES, R. J., HATHCOCK, K. S., WENG, N. Telomeres in T and B cells. **Nat. Rev. Immunol.**, 2: 699–706, 2002.
- HOME-DEBETS, J. M. *et al.* PD-1 dependent exhaustion of CD8⁺ T cells drives chronic malaria. **Cell**, 5:1204-1213, 2013.
- ILLINGWORTH, J. *et al.* Chronic exposure to *Plasmodium falciparum* is associated with phenotypic evidence of B and T cell exhaustion. **J Immunol.**, 190:1038-1047, 2013.
- INCHÁUSTEGUI, A. De la leishmaniosis americana y de la úlcera de los chicleros en México. Tesis, **Universidad Nacional de México**. 1918.
- INIESTA, V., GOMEZ-NIETO, L. C., CORRALIZA, I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. **J. Exp. Med.**, 193:777–784, 2001.
- ITO, M. *et al.* Killer cell lectin-like receptor G1 binds three members of the classical cadherin family to inhibit NK cell cytotoxicity. **J Exp. Med.**, 203:289-295, 2006.
- JIRMANUS, L. *et al.* Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. **Am J Trop Med Hyg.**, 86: 426- 433, 2012.
- JORDAN, K. A.; HUNTER, C. A. Regulation of CD8⁺ T cell responses to infection with parasitic protozoa. **Exp Parasitol.**, 126 (3): 318-25, 2010.
- JOSHI, T. S. *et al.* B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8⁺ T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **PLoS Pathog.**, 5: e1000431, 2009.
- JUN, J. I.; LAU, L.F. The matricellular protein Ccn1 induces fibroblast senescence and restricts fibrosis in cutaneous wound healing. **Nat. Cell Biol.**, 12: 676–685, 2010.
- JURADO, J. O. *et al.* Programmed death (PD)-1:PD-ligand 1/PD-ligand 2 pathway inhibits T cell effector functions during human tuberculosis. **J Immunol**, 181:116-25, 2008.
- KAHAN, S. M., WHERRY, E. J., ZAJAC, A. J. T cell exhaustion during persistent viral infections. **Virology**, 480: 180–193, 2015;
- KALIA, V. *et al.* Prolonged interleukin-2R alpha expression on virus-specific CD8⁺ T cells favors terminal-effector differentiation *in vivo*. **Immunity**, 32 (1): 91–103, 2010.

- KANE, M. M.; MOSSER, D.M. Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation. **Curr Opin Hematol.**, 7(1): 26 - 31, 2000.
- KANG, T. W, *et al.* Senescence surveillance of pre-malignant hepatocytes limits liver cancer development. **Nature**, 479: 547–551, 2011.
- KAYE, P.; SOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol.**, 9 (8): 604–15, 2011.
- KEE, S. J. *et al.* Dysfunction of natural killer T cells in patients with active Mycobacterium tuberculosis infection. **Infection Immun.**, 80: 2100-2108, 2012.
- KESHAVARZ VALIAN, H. *et al.* CCR7⁺ central and CCR7⁻ effector memory CD4⁺ T cells in human cutaneous leishmaniasis. **J Clin Immunol.**, 33(1):220-34, 2013.
- KIM, P. S.; AHMED, R. Features of responding T cells in cancer and chronic infection. **Current Opinion in Immunology**, 22 (2): 223–230, 2010.
- KLEIN, L. *et al.* Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). **Nat. Rev. Immunol.** 14: 377–391, 2014.
- KLING, J. C.; KORNER, H. Different regulatory mechanisms in protozoan parasitic infections. **Int J Parasitol.**, 44: 217–231, 2013.
- KORN, T. *et al.* IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol.* 2009; 27: 485-517.
- KOVAIOU, R. D.; GRUBECK-LOEBENSTEIN, B. Age-associated changes within CD4⁺ T cells. **Immunol. Lett.**, 107: 8-14, 2006.
- KROIDL, A. *et al.* Non-healing old world cutaneous leishmaniasis caused by *L. infantum* in a patient from Spain. **BMC Infect Dis.**, 14:206, 2014.
- KUCHROO, V. K. *et al.* New roles for TIM family members in immune regulation. **Nat. Rev. Immunol.**, 8: 577-580, 2008.
- LANNA, A. *et al.* IFN- α inhibits telomerase in human CD8⁺ T cells by both hTERT downregulation and induction of p38 MAPK signaling; **J Immunol.**, 191(7): 3744-3752, 2013.
- LEE, K. M. *et al.* Molecular basis of T cell inactivation by CTLA-4. **Science**, 282: 2263-2266, 1998.
- LEE, J. Y. *et al.* Differential expression of CD57 in antigen-reactive CD4⁺ T cells between active and latent tuberculosis infection. **Clin Immunol.**, 159(1): 37-46, 2015.
- LEON, B., LOPEZ-BRAVO, M., ARDAVIN, C. Monocyte derived dendritic cells formed at the infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. **Immunity**, 26: 519-531, 2007.
- LEVY, D. L.; BLACKBURN, E. H. Counting of Rif1p and Rif2p on *Saccharomyces cerevisiae* telomeres regulates telomere length. **Mol Cell Biol.**, 24(24):10857-10867, 2004.
- LIANG, S. C. *et al.* PD-L1 and PD-L2 have distinct roles in regulating host immunity to cutaneous leishmaniasis. **Eur. J. Immunol.**, 36: 58-64, 2006.
- LIBRI, V. *et al.* Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. **Immunology**, 132: 326-339, 2011.

- LIEBERMAN, J. Anatomy of a murder: how cytotoxic T cells and NK cells are activated, develop, and eliminate their targets. **Immunol Rev.**, 235:5-9, 2010.
- LORD, S. J. *et al.* Granzyme B: a natural born killer. **Immunol Rev.**, 193:31-38, 2003.
- LOUZIR, H. *et al.* Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. **J Infect Dis.**, 177: 1687-95, 1998.
- LUGLI, E. *et al.* Transient and persistent effects of IL-15 on lymphocyte homeostasis in non human primates. **Blood**, 116: 3238-3248, 116, 2010.
- LUKENS, J.R. *et al.* Blockade of PD-1/B7-H1 interaction restores effector CD8⁺ T cell responses in a hepatitis C virus core murine model. **J. Immunol.**, 180: 4875-4884, 2008.
- LUJAMBIO, A. *et al.* Non-cell-autonomous tumor suppression by p53. **Cell** **153**: 449-460, 2013.
- MACAULAY, R., AKBAR, A. N., HENSON, S. M. The role of the T cell in age-related inflammation. **Age (Omaha)**, 35: 563-572, 2013.
- MACHADO, P. R. *et al.* Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. **Eur J Dermatol.**, 12(5): 449-51, 2002.
- MAGALHÃES, A. V. *et al.* Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (braziliensis) braziliensis*. I. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, 28:253-62, 1986.
- MAHNKE, Y. D. *et al.* The who's who of T-cell differentiation: human memory T-cell subsets. **Eur J Immunol.**, 43(11):2797-809, 2013. PMID: 24258910.
- MARENGERE, L. E. *et al.* Regulation of T cell receptor signaling by tyrosine phosphatase SYP association with CTLA-4. **Science**, 272: 1170-1173, 1996.
- MARTINS, G. A. *et al.* CTLA-4 blockage increases resistance to infection with the intracellular protozoan *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, 172: 4893-4901, 2004.
- McKINNEY, E. F. *et al.* T-cell exhaustion, co-stimulation and clinical outcome in autoimmunity and infection. **Nature**, 523:612–616, 2015.
- MELBY, P.C. *et al.* Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infect. Immun.**, 62: 837–842, 1994.
- MENDES-AGUIAR, C de O. *et al.* The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is upregulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol**, 157:377–84, 2009.
- MILLWARD, T. A., ZOLNIEROWICZ, S., HEMMINGS, B. A. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A. **Trends Biochem. Sci.**, 24: 186-191, 1999.
- MINAMINO, T.; KOMURO, I. Vascular cell senescence: contribution to atherosclerosis; **Circ Res**, 100: 15–26, 2007.
- MODLIN, R. L. *et al.* In situ characterization of the cellular immune response in American cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Immunol.**, 60: 241-248, 1985.
- MOU, Z. *et al.* Parasite-derived arginase influences secondary anti-*Leishmania* immunity by regulating programmed cell death-1-mediated CD4⁺ T cell exhaustion. **J. Immunol.** 190: 3380–3389, 2013.

- MUELLER, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. **Nat Immunol.**, 11(1):21-27, 2010.
- MUÑOZ-ESPIN, D. *et al.* Programmed cell senescence during mammalian embryonic development. **Cell**, 155: 1104–1118, 2013.
- MUÑOZ-ESPIN, D.; SERRANO, M. Cellular senescence: From physiology to pathology. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, 15: 482–496, 2014.
- MURRAY, H. W *et al.* Advances in leishmaniasis. **Lancet**, 366 (9496): 1561–1577, 2005.
- MUSHER, D. M. *et al.* Natural and vaccine-related immunity to Streptococcus pneumonia. **J Infect Dis.**, 154: 245-256, 1986.
- NATHAN, C.; DING, A. Non resolving inflammation. **Cell**, 140: 871-882, 2010.
- NEBRADA, A. R.; PORRAS, A; p38 MAP kinases: beyond the stress response. **Trends Biochem Sci.**, 25 (6): 257-60, 2000.
- NEELAM, V.; SHANO, N.; Hematologic changes in visceral Leishmaniasis/Klar-azar; **Indian J Hematol Blood Transfus**, 26(3):78-82, 2010.
- NG, L. G. *et al.* Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS Pathog.**, 4, e1000222, 2008.
- NICODEMO, *et al.* Are the severe injuries of cutaneous leishmaniasis caused by an exacerbated Th1 response? **Parasite Immunol.**, 34:440–443, 2012.
- NOSSAL, G. J.; PIKE, B. L. Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 77:1602-6, 1980.
- NOVAIS, F. O. *et al.* Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. **PLoS Pathog.**, 9 (7): e1003504, 2013
- NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8⁺ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Semin Immunopathol.**, 37(3): 251-259, 2015.
- NOVOA, R. *et al.* IL-17 and regulatory cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* infection. **Parasite Immunol.**, 33: 132–136, 2011.
- O’GARRA, A. *et al.* IL-10-producing and naturally occurring CD4⁺ Tregs: limiting collateral damage. **J Clin Invest.**, 114 (10): 1372-8, 2004.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. E. The immunology of Leishmania/HIV co-infection. **Immunol Res.**, 56 (1): 163-71, 2013
- OLIVEIRA, F. *et al.* Lesion size correlates with leishmania antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 85: 70–73, 2011.
- OLEKHNOVITCH, R., *et al.* Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during Leishmania infection. **J. Clin. Invest.**, 124, 1711–1722, 2014.
- ONYEMA, O. O. *et al.* Shifts in subsets of CD8⁺ T-cells as evidence of immunosenescence in patients with cancers affecting the lungs: an observational case-control study. **BMC Cancer**, 15: 1016, 2015.

- OUYANG, Q. *et al.* Age-associated accumulation of CMV-specific CD8⁺ T cells expressing the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1); **Exp. Gerontol.**, 38: 911–920, 2003a.
- OUYANG, Q. *et al.* Large numbers of dysfunctional CD8⁺ T lymphocytes bearing receptors for a single dominant CMV epitope in the very old; **J. Clin. Immunol.**, 23: 247-257, 2003b.
- PARODI, C. *et al.* American tegumentary leishmaniasis: T- cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms co- infection with *Trypanosoma cruzi*. **Med Microbiol Immunol.**, 205 (4): 353-369, 2016.
- PARRY, H. M. *et al.* Cytomegalovirus viral load within blood increases markedly in healthy people over the age of 70 years. **Immun Ageing**, 13:1, 2016.
- PASSOS, J. F. *et al.* Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. **Mol. Syst. Biol.**, 6: 347, 2010.
- PAWELEC, G.; DERHOVANESSIAN, E. Role of CMV in immune senescence. **Virus Res.**, 157 (2): 175-179, 2011.
- PEARSON, R. D.; SOUSA, A. Q. Clinical spectrum of leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.**, 1: 1-13, 1996.
- PENNOCK, N. D. *et al.* T cell responses: Naive to memory and everything in between. **Adv. Physiol. Educ.**, 37:273–283, 2013.
- PEREIRA, L. O. *et al.* Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? **Int J Infect Dis.**, 57: 132-137, 2017.
- PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, 321 (5891): 970-974, 2008.
- PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Clinical aspects and control, vol 2. **Academic Press**, 1987.
- PICKER, L. *et al.* Control of lymphocyte recirculation in man; I. Differential regulation of the peripheral lymph node homing receptor Lselectin on T cells during the virgin to memory cell transition. **J. Immunol**, 150: 1105–1112, 1993.
- PICKER, L. J. *et al.* A unique phenotype of skin-associated lymphocytes in humans. Preferential expression of the HECA-452 epitope by benign and malignant T cells at cutaneous sites. **Am. J. Pathol**, 136 (5): 1053-1068, 1990a.
- PICKER, L. J. *et al.* Differential expression of homing-associated adhesion molecules by T cell subsets in man. **J. Immunol**, 145(10): 3247-3255, 1990b.
- PIPKIN, M. E. *et al.* Interleukin-2 and inflammation induce distinct transcriptional programs that promote the differentiation of effector cytolytic T cells. **Immunity**, 32 (1): 79–90, 2010.
- PIRMEZ, C. *et al.* Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **J Clin Invest**, 91(4): 1390-1395, 1993.
- PIRMEZ, C. *et al.* Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. **J Immunol**, 145: 3100-3104, 1990.
- PISCOPO, T. V.; MALLIA AZZOPARDI, C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, 83(976): 649-57, 2007.

- POMPEU, M. M. *et al.* Differences in γ interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. **Infect. Immun.** 69: 7453–7460, 2001.
- PORTAL DA SAÚDE. SUS – Leishmaniose tegumentar americana. 2017. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>. Acesso em: 23 jul. 2019.
- RAJAGOPALAN, S.; LONG, E. O. Cellular senescence induced by CD158d reprograms natural killer cells to promote vascular remodeling. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 109 (50): 20596-20601, 2012.
- REILEY, W. W. *et al.* Distinct functions of antigen-specific CD4 T cells during murine Mycobacterium tuberculosis infection. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, 107:19408 –19413, 2010.
- REITHINGER, R. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.**, 7(9): 581-596, 2007.
- RIBAS-SILVA, R.C. *et al.* Association between HLA genes and American cutaneous leishmaniasis in endemic regions of southern Brazil. **BMC Infect. Dis.**, 14 (4): 14929-35, 2013.
- RIBEIRO-DE-JESUS, *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Med Biol Res**, 31(1): 143-148, 1998.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti leishmania response. **PLoS Pathog**, 8: e1002536, 2012.
- RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Apoptotic cell clearance of Leishmania major-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8⁺ T -cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. **Cell Death Dis**, 6: e2018, 2015.
- RIDLEY, D. S. A histological classification of cutaneous leishmaniasis and its geographical expression. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, 74:515–21, 1980.
- RIDDEL, N. E. *et al.* Multifunctional cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺T cells are not restricted by telomere-related senescence in young or old adults. **Immunology**, 144: 549-560, 2015
- ROBERTS, T. *et al.* Immunosuppression during active tuberculosis is characterized by decreased interferon- gamma production and CD25 expression with elevated forkhead box P3, transforming growth factor- beta, and interleukin-4 mRNA levels; **J Infect Dis**, 195 (6): 870-878, 2007.
- ROCHA, P. N. *et al.* Down-regulation of Th1 type of response in early human American cutaneous leishmaniasis. **J Infect Dis**, 180: 1731–1734, 1999.
- ROCHAEL, N. C. *et al.* Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of neutrophil extracellular traps triggered by Leishmania parasites. **Sci. Rep.**, 5: 18302, 2015.
- RODRIGUES, V. *et al.* Impairment of T Cell Function in Parasitic Infections. **PLoS Negl Trop Dis**, 8(2): e2567, 2014.
- ROMERO, P. *et al.* Four functionally distinct populations of human effector-memory CD8⁺ T lymphocytes. **J. Immunol.**, 178 (7): 4112-4112-4119, 2007.
- ROSS, R. Atherosclerosis an inflammatory disease. **N Engl J Med**, 340: 115–126, 1999.

- ROSSAHART, S. *et al.* Interaction of KLRG1 with Ecadherin: new functional and structural insights. **Eur. J. Immunol**, 38: 3354-3364, 2008.
- RUFER, N. *et al.* Ex vivo characterization of human CD8⁺ T subsets with distinct replicative history and partial effector functions. **Blood**, 102: 1779-1787, 2003.
- SADA-OVALLE, I. *et al.* Tim-3 blocking rescue macrophage and T cell function against Mycobacterium tuberculosis infection in HIV⁺ patients. **J Int AIDS Soc**, 2015; 18: 20078, 2015.
- SAHA, S. *et al.* IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of Leishmania donovani infection in India; **J Immunol**, 179 (8):5592–603, 2007.
- SAID, E. A. *et al.*; Programmed death-1-induced interleukin-10 production by monocytes impairs CD4⁺ T cell activation during HIV infection. **Nat. Med**, 16: 452-459, 2010.
- SAKTHIANANDESWAREN, A.; FOOTE, S. J.; HANDMAN, E. The role of host genetics in leishmaniasis. **Trends Parasitol**, 25: 383–391, 2009.
- SALLUSTO, F. *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. **Nature**, 401: 708-712, 1999.
- SALLUSTO, F.; GEGINAT, J.; LANZAVECCHIA, A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. **Ann Rev Immunol**, 22:745–63, 2004.
- SALLUSTO, F.; LANZAVECCHIA, A.; MACKAY, C. R. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2- mediated responses. **Immunol. Today**, 19: 568– 74, 1998.
- SALLUSTO, F.; MACKAY, C. R. Chemoattractants and their receptors in homeostasis and inflammation. **Curr Opin Immunol**, 16: 724–31, 2004.
- SALMAN, S. M.; Rubeiz, N. G, Kibbi, A. G. Cutaneous leishmaniasis: clinical features and diagnosis. **Clin Dermatol**, 17(3): 291-296, 1999.
- SAMARANAYAKE, N. *et al.* Association of HLA class I and II genes with cutaneous leishmaniasis: A case control study from Sri Lanka and a systematic review. **BMC Infect. Dis**, 16: 292, 2016.
- SANTAMARIA-BABÍ, L. F. CLA⁺ T cells in cutaneous disease. **Eur J Dermatol**, 14:13–18, 2004.
- SANTOS, C da S. *et al.* CD8⁺ granzyme B⁺ mediated tissue injury vs. CD4⁺ IFN γ mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis; **J Invest Dermatol**, 133 (6): 1533-40, 2013.
- SATHALIYAWALA, T. *et al.* Distribution and compartmentalization of human circulating and tissue-resident memory T cell subsets. **Immunity**., 38:187-197, 2013.
- SAULE, P. *et al.* Accumulation of memory T cells from childhood to old age: central and effector memory cells in CD4⁺ versus effector memory and terminally differentiated memory cells in CD8⁺ compartment. **Mech. Ageing Dev**, 127, 274–281, 2006.
- SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon γ that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to Leishmania major in mice. **J. Exp. Med.** 178, 567–577, 1993.

- SCHLOTMANN, T. *et al.* CD4 alphabeta T lymphocytes express high levels of the T lymphocyte antigen CTLA-4 (CD152) in acute malaria. **J Infect Dis**, 182 (1): 367-370, 2000.
- SCHNORR, D. *et al.* IFN- γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. Braziliensis* infection. **PLoS Negl. Trop. Dis**, 6 (12): e1947, 2012.
- SCHON, M. P., ZOLLNER, T. M., BOEHNCKE, W. H. The molecular basis of lymphocyte recruitment to the skin: clues for pathogenesis and selective therapies of inflammatory disorders. **J Invest Dermatol**, 121:951–62, 2003.
- SCHUBACH, A. *et al.* Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: A site of *Leishmania (Viannia) braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. **Am. J. Trop. Med. Hyg**, 58: 824–827, 1998a.
- SCHUBACH, A. *et al.* Detection of leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. **J.Infect. Dis**. 178: 911-914, 1998b.
- SCHWARTZ, E.; HATZ, C.; BLUM, J. New world cutaneous leishmaniasis in travellers. **Lancet Infect. Dis**, 6: 342–349, 2006.
- SCHWARTZ, R. H. Acquisition of immunologic self-tolerance. **Cell.**, 57(7): 1073-1081, 1989.
- SCHWARTZ R. H. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. **Science**, 248: 1340-1356, 1990.
- SCHWARTZ R. H. T cell anergy. **Annu Rev immunol**, 21: 305-334, 2003.
- SCOTT, P. *et al.* Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens; **J Exp Med**, 168 (5): 1675-84, 1988.
- SCOTT, P. Immunologic memory in cutaneous leishmaniasis. **Cell Microbiol**, 7: 1707–13, 2005.
- SEIDELIN, H. Leishmaniasis and Babesiosis in Yucatan. **Ann Trop Med Parasit**, 6(2): 295–300, 2016.
- SHARQUIE, K. E.; NAJIM, R. A. Disseminated cutaneous leishmaniasis. **Saudi Med J**. 25(7): 951-954, 2004.
- SIDDIQUI, K. F. *et al*; Latency associated protein Acr1 impairs dendritic cell maturation and functionality: a possible mechanism of immune evasion by Mycobacterium tuberculosis; **J Infect Dis**, 209: 1436–45, 2014.
- SIELING, P. A. *et al.* Regulation of human T-cell homing receptor expression in cutaneous bacterial infection. **Immunology**, 120:518–25, 2007.
- SIGMUNDSÓTTIR, H. *et al.* The frequency of CLA⁺ CD8⁺ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. **Clin Exp Immunol**, 126: 365–9, 2001.
- SIMONSEN, L. *et al*; Mortality benefits of influenza vaccination in elderly people: an ongoing controversy. **Lancet Infect Dis**, 7 (10): 658–66, 2007.

- SINGH, A. *et al.* Inhibiting the programmed death 1 pathway rescues Mycobacterium tuberculosis-specific interferon gamma- producing T cells from apoptosis in patients with pulmonary tuberculosis; **J Infect Dis**, 208: 603–15, 2013.
- SINGH, A. *et al.* Programmed death-1 receptor suppresses gamma-IFN producing NKT cells in human tuberculosis. **Tuberculosis**, 94: 197–206, 2014.
- SNYDER, C. M. *et al.* Memory inflation during chronic viral infection is maintained by continuous production of short-lived, functional T cells. **Immunity**, 29: 650–659, 2008.
- SREEJIT, G. *et al.* The ESAT-6 protein of Mycobacterium tuberculosis interacts with beta-2-microglobulin (beta2M) affecting antigen presentation function of macrophage. **PLoS Pathogens** 10:e1004446, 2014
- STORER, M. *et al.* Senescence is a developmental mechanism that contributes to embryonic growth and patterning. **Cell**, 155: 1119–1130, 2013.
- STOWE, R. P. *et al.* Chronic herpesvirus reactivation occurs in aging. **Exp Gerontol**, 42 (6): 563–70, 2007.
- TAIT, E.D.; HUNTER, C. Advances in understanding immunity to Toxoplasma gondii. The **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 104: 201-210, 2009.
- TALAT, H., ATTARWALA, S., SALEEM, M. Cutaneous leishmaniasis with HIV. **J. Coll. Physicians Surg. Pak.** 24 (Suppl 2), S93–95, 2014.
- 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; **Mech Ageing Dev**, 121(1):77–88, 2000.
- TERRY L. A., BROWN M. H., BEVERLY P. C. The monoclonal antibody, UCHL1, recognizes a 180,000 MW component of the human leucocyte common antigen, CD45. **Immunology**, 64: 331–336, 1988.
- THIMME, R. *et al.* Increased expression of the NK cell receptor KLRG1 by virus-specific CD8⁺ T cells during persistent antigen stimulation. **J Virol**, 79: 12112-12116, 2005.
- THOMAZ-SOCCOL, V. *et al.* Phylogenetic taxonomy of New World Leishmania; **Annales de parasitologie humaine et compare**, 68 (2):104-6, 1993.
- TOKOYODA, K. *et al.* Professional memory CD4⁺ T lymphocytes preferentially reside and rest in the bone marrow. **Immunity**, 30: 721–730, 2009.
- UNGER, A. *et al.* Association of treatment of american cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. **Am. J. Trop. Med**, 80: 574-579, 2009.
- VERA-IZAGUIRRE, D. *et al.*: Leishmaniasis revisión. **DCMQ**, 4(4): 252-260, 2006.
- VIRGIN W., WHERRY, E. J., AHMED, R. Redefining chronic viral infection. **Cell**. 138 (1): 30-50, 2010.
- VITA, G. F. *et al.* Status of the american tegumentary leishmaniasis in the state of Rio De Janeiro, Brazil, from 2004 To 2013. **Rev. Inst. Med. Trop**, 58:712, 2016.

- VOEHRINGER, D., KOSCHELLA, M., PIRCHER, H. Lack of proliferative capacity of human effector and memory T cells expressing killer cell lectin like receptor G1 (KLRG1). **Blood**, 100: 3698-3702, 2002.
- VON PIRQUET, C E. Das Verhalten der kautanen Tuberculinreaktion wahrend der Masern. **D. Med. Wochenschr.**, 34, 1297 - 1298, 1908. (TURK, J.L. Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. **Journal of the Royal Society of Medicine**, 90: 31-33, 1987).
- VON STEBUT, E. *et al.* Uptake of Leishmania major amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti-Leishmania immunity. **J. Exp. Med**, 188: 1547–1552, 1998.
- WALLACE, D. L. *et al*; Human cytomegalovirus-specific CD8⁺ T-cell expansions contain long-lived cells that retain functional capacity in both young and elderly subjects. **Immunology**, 132: 27–38, 2011.
- WELLS, A. D. New insights into the molecular basis of T cell anergy: anergy factors, avoidance sensors, and epigenetic imprinting. **J Immunol**, 182: 7331-7341, 2009.
- WENG, N. P., AKBAR A.N., GORONZY J. CD28⁻ T cells: their role in the age-associated decline of immune function. **Trends Immunol**, 30: 306-312, 2009.
- WHERRY, E. J. *et al.* Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets. **Nat Immunol**, 4; 225, 2003.
- WHERRY, E. J. *et al.* Molecular signature of CD8⁺ T cell exhaustion during chronic viral infection. **Immunity**, 27 (4): 670-684, 2007.
- WHERRY, E. J. T cell exhaustion. **Nature Immunology**, 12 (6): 492-499, 2011.
- WHERRY, E. J.; KURACHI, M. Molecular and cellular insights into T cell exhaustion, **Nature Reviews Immunology**, 15 (8): 486-499, 2015.
- WHO. Control of Leishmaniasis. Technical report series 949. Geneva, 22-26, March 2010.
- WHO. **Status of endemicity of Cutaneous Leishmaniasis Worldwide**. 2016. Disponível em: https://www.who.int/leishmaniasis/burden/Status_of_endemicity_of_CL_worldwide_2016_with_imported_cases.pdf?ua=1. Acesso em 23 jul. 2019
- WYKES, M. N. *et al.* Malaria drives T cells to exhaustion. **Front Microbiol**, 5:249, 2014.
- YANIK, M. *et al.* The psychological impact of cutaneous leishmaniasis. **Clin Exp Dermatol**. 29: 464–67, 2004.
- YADON, Z. E. *et al.* Indoor and peridomestic transmission of American cutaneous leishmaniasis in northwestern Argentina: a retrospective case-control study. **Am J Trop Med Hyg.**, 68(5): 519-526, 2003.
- YOSHIMURA, A. WAKABAYASHI Y., MORI T. Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta; **J Biochem**, 147(6):781-92, 2010.
- ZECHNER, D. *et al.* MKK6 activates myocardial cell NF-kappaB and inhibits apoptosis in a p38 mitogen-activated protein kinase-dependent manner. **J Biol Chem.**, 273(14):8232-9, 1998.
- ZHANG, N.; BEVAN, M. J. CD8⁺ T cells: foot soldiers of the immune system. **Immunity.**, 35: 161-168, 2011.

ZAPH, C. *et al.* Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nat Med**, 10 (10): 1104-10, 2010.

ZOU, W.; CHEN, L. “Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment;” **Nature Reviews Immunology**, 8 (6): 467-477, 2008.

ANEXOS

Anexo A – Termo de consentimento livre esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO

Programa de Pós-Graduação em Doenças Infecciosas Núcleo de Doenças Infecciosas Laboratório de
Imunobiologia

Projeto de Pesquisa: Caracterização do desenvolvimento da senescência em células T de pacientes com
Leishmaniose cutânea localizada causada por *Leishmania braziliensis*

Pesquisadores e suas funções:

Dr. Daniel Cláudio de O. Gomes – Coordenador – UFES

Dr. Aloísio Falqueto – Pesquisador colaborador – UFES

Nome do (a) voluntário ou responsável _____

O(a) Sr.(a) está sendo solicitado(a) a participar, como voluntário(a), de uma investigação científica conduzida pelo Laboratório de Imunobiologia – UFES, com o objetivo de compreender os mecanismos imunológicos associados ao desenvolvimento das respostas imunes locais e sistêmicas de células T em pacientes com leishmaniose cutânea. Este documento procura fornecer ao (a) Sr. (a) as informações necessárias sobre todos os procedimentos a serem adotados, bem como os exames e benefícios. O(a) Sr(a) poderá recusar-se a participar da pesquisa, ou dela afastar-se em qualquer tempo, sem que este fato lhe venha causar constrangimento ou penalidade por parte desta instituição. Em nenhum momento será revelada a sua identidade, garantindo o total anonimato e confidencialidade dos mesmos. Antes de assinar este termo, o(a) Sr(a). deve informar-se plenamente, perguntando sobre quaisquer aspectos que achar importante.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES

- 1- Procedimentos que serão realizados: coleta de amostra de sangue e biópsia de pele, solicitados pelo seu médico acompanhante. As amostras serão processadas no Laboratório e sua utilização será feita somente por este.

- 2- Benefícios: os resultados encontrados pelo laboratório serão encaminhados ao seu médico na forma de um relato, auxiliando-o juntamente com os demais resultados obtidos e achados laboratoriais, na melhor alternativa de tratamento.
- 3- Riscos potenciais: Os riscos envolvidos na Coleta de sangue e amostras de pele são mínimos, uma vez que estes fazem parte do procedimento padrão de diagnóstico da doença. No entanto, manchas arroxeadas no braço (decorrentes da retirada de sangue) podem ocorrer. Sintomas com dor local decorrente da biópsia também podem estar presentes.

Declaro estar ciente do inteiro teor deste Termo de Consentimento Livre Esclarecido, decidindo-me a participar da investigação proposta. Declaro ainda que formulei e recebi todo esclarecimento que julguei pertinente, consentindo em participar desta investigação.

Assinatura do responsável

RG: _____

Assinatura do investigador responsável:

Data: _____

Anexo B – Artigo: “Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis”



Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis

Luciana P. Covre^{1†}, Régia F. Martins^{1†}, Oliver P. Devine², Emma S. Chambers², Milica Vukmanovic-Stejic², Juliana A. Silva¹, Reynaldo Dietze^{1,3}, Rodrigo R. Rodrigues¹, Herbert L. de Matos Guedes⁴, Aloisio Falqueto⁵, Arne N. Akbar^{2*} and Daniel C. O. Gomes^{1,6*}

¹ Núcleo de Doenças Infecciosas, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, ² Division of Infection and Immunity, University College London, London, United Kingdom, ³ Saúde Global e Medicina Tropical, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisbon, Portugal, ⁴ Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, ⁵ Departamento de Medicina Social, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil, ⁶ Núcleo de Biotecnologia, Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Debora Decote-Ricardo,
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Salvador Iborra,
Universidad Complutense de Madrid, Spain
Tatiana Rodrigues de Moura,
Federal University of Sergipe, Brazil

*Correspondence:

Arne N. Akbar
a.akbar@ucl.ac.uk
Daniel C. O. Gomes
dkgomes@ndi.ufes.br

[†] These authors have contributed equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to Microbial Immunology, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 26 June 2018

Accepted: 04 December 2018

Published: 04 January 2019

Citation:

Covre LP, Martins RF, Devine OP, Chambers ES, Vukmanovic-Stejic M, Silva JA, Dietze R, Rodrigues RR, de Matos Guedes HL, Falqueto A, Akbar AN and Gomes DCO (2019) Circulating Senescent T Cells Are Linked to Systemic Inflammation and Lesion Size During Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 9:3001. doi: 10.3389/fimmu.2018.03001

Leishmania (Viannia) braziliensis induces American tegumentary leishmaniasis that ranges in severity from the milder form, cutaneous (CL) to severe disseminated cutaneous leishmaniasis. Patients with CL develop a cell-mediated Th1 immune response accompanied by production of inflammatory cytokines, which contribute to parasite control and pathogenesis of disease. Here, we describe the accumulation of circulating T cells with multiple features of telomere dependent-senescence including elevated expression of CD57, KLRG-1, and γ H2AX that have short telomeres and low hTERT expression during cutaneous *L. braziliensis* infection. This expanded population of T cells was found within the CD45RA⁺CD27⁻ (EMRA) subset and produced high levels of inflammatory cytokines, analogous to the senescence-associated secretory profile (SASP) that has been described in senescent non-lymphoid cells. There was a significant correlation between the accumulation of these cells and the extent of systemic inflammation, suggesting that they are involved in the inflammatory response in this disease. Furthermore, these cells expressed high level of the skin homing receptor CLA and there was a highly significant correlation between the number of these cells in the circulation and the size of the *Leishmania*-induced lesions in the skin. Collectively our results suggest that extensive activation during the early stages of leishmaniasis drives the senescence of T cells with the propensity to home to the skin. The senescence-related inflammatory cytokine secretion by these cells may control the infection but also contribute to the immunopathology in the disease.

Keywords: cutaneous leishmaniasis, immunosenescence, inflammation, SASP-analogous, *L. braziliensis*, T cells

INTRODUCTION

Parasites belonging to the *Leishmania* genus are among of the most diverse human pathogens in terms of both geographical distribution and clinical manifestations. Worldwide, 350 million people are at risk of acquiring the disease, 1.5–2 million new cases of *Leishmania* occur each year, and leishmaniasis causes 70,000 deaths per year in 88 tropical and subtropical countries. The disease

ranges from a localized cutaneous to a fatal visceral form, depending on parasite species and host immunity (1).

Parasites from the *Viannia* subgenus that include *Leishmania (Viannia) braziliensis* are the most widespread species in the Americas, causing cutaneous leishmaniasis (CL) (1). The development of cutaneous lesions during CL is prevalent in more than 90% of cases and is characterized by an intense local cell-mediated Th1 immune response and production of inflammatory cytokines, which contribute to parasite control and tissue damage (2, 3). In addition, increased production of pro-inflammatory mediators, such as TNF- α , C-reactive protein (CRP), and adenosine deaminase (ADA) are observed in patients infected with *Leishmania* and may play an important role in the pathogenesis of disease (4, 5).

Immunosenescence is a term used to define the physiological decline in immune functions associated with the impaired ability of the host to mount an effective immune responses (6). In humans, immunosenescence naturally occurs with aging or is driven by chronic inflammatory conditions, inducing multiple phenotypic and dysfunctional characteristics in the T-cell pool (7).

Senescent T cells have been described in human CD4⁺ and CD8⁺ populations (8–10). These cells exhibit low proliferative potential after activation, short telomeres and low telomerase activity, elevated reactive oxygen species (ROS) production, constitutive p38 MAP kinase activation, expression of DNA damage response machinery and increased cyclin-dependent kinase inhibitor p16^{INK4a} expression (11). The senescent T cells express the CD45RA⁺CD27⁻ EMRA phenotype and have preferential homing capacity for peripheral tissues (12). Furthermore, these senescent T cells, secrete high levels of pro-inflammatory cytokines that has been suggested to be a manifestation of the senescence associated secretory phenotype (SASP), as described previously in non-lymphoid cells (10, 13).

Although T cell dysfunctions are linked to increased replication and survival in parasite diseases (14, 15) there is no data associating T cell senescence and *Leishmania* infection so far. Here, we demonstrate that the intense inflammatory cytokine secretion that has previously been shown to occur in this disease is linked to the accumulation of senescent T cells with a SASP-like functional profile. Furthermore, these circulating cells have skin homing potential and correlate numerically with leishmanial-related skin lesion size.

Collectively our data offer a re-interpretation of the immune events that occur during leishmaniasis by demonstrating that the intensive proliferative drive to T cells induces T senescence and associated pro-inflammatory cytokine secretion that contributes to parasite control and also immunopathology during cutaneous leishmaniasis.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

Peripheral blood from 17 untreated cutaneous leishmaniasis (CL) patients attendant at Hospital Universitário Cassiano Antônio de Moraes, Universidade Federal do Espírito Santo—Brazil were used in this study. The diagnosis of CL was determined by clinical and

laboratory criteria. All patients in this study tested positive for the PCR/restriction fragment length polymorphism for *L. braziliensis* and reported no prior *Leishmania* infections or treatment (**Supplementary Figure 1**). The control group consisted of 15 healthy age matched individuals (HC) from non-endemic areas, without treatment history. All study participants consented to take part and were serologically negative for HIV, HBV, and HCV infection. They also had no history of chemotherapy, radiotherapy or treatment with immunosuppressive medications within the last 6 months. All volunteers and patients provided written informed consent, and study procedures were performed in accordance with the principles of the Declaration of Helsinki. The study was registered at HUCAM ethical committee under referential number 735.274.

PBMC and T Cells Isolation

PBMCs from CL and HC were isolated by centrifugation of heparinized whole blood through a Ficoll-Hypaque gradient (GE Healthcare, Uppsala, Sweden). Cryopreserved cells from both controls and patients were thawed in RPMI complete medium supplemented with 10% of fetal calf serum. Viability and recovery were measured using trypan blue dye exclusion in haemocytometer. The CD4⁺ and CD8⁺ T cell isolations were performed by negative selection using MACS cell separation (Milteny Biotec) according to the manufacturer's protocol.

Flow Cytometric Analysis

Flow cytometric analysis was carried out using the following reagents: Live/dead UV Zombie, KLRG1 APC (2F1), CD4 Brilliant Violet 711 (OKT-4), CD28 Brilliant Violet 510 (CD28.2) and CD45RA PECy7 (HI100) all from Biolegend. CD28 Brilliant Violet 786 (U28), CD3 PECE594 (UCHT1), CD8 APC-H7 (SK1), CD57 Alexa Fluor 421 (NK-1), and human cutaneous lymphocyte antigen (CLA) FITC (HECA-452) from BD Biosciences. Cell suspensions were incubated with antibody solutions for 30 min at 4°C for extracellular staining. Intracellular staining for Ki67 (clone B56, BD Bioscience) was performed with Foxp3 Staining Buffer Set (Milteny Biotec, Bisley, UK). Cytokine and anti-hTERT (rabbit IgG—Abcam) staining were performed using Fix and Perm Cell Permeabilization Kit (Invitrogen, Paisley, UK) according to the manufacturer's protocol. Samples were processed at Fortessa X-20 cytometer (BD Biosciences) and analyzed using FlowJo software (Treestar). Isotype control staining and fluorescence-minus-one controls were used to set the quadrants.

Phospho-Flowcytometry

The levels of p38 (pT180/pY182) Alexa Fluor 488 and γ H2AX (pSer139) Alexa Fluor 647 (B56), all from BD Biosciences were analyzed *ex vivo* in PBMCs fixed with warm Cytofix Buffer (BD Biosciences) at 37°C for 10 min. Cells were permeabilized with ice-cold Perm Buffer III (BD Biosciences) at 4°C for 30 min and incubated with the respective antibodies for 30 min at room temperature.

Cytokine Determination

Cytokine production was determined in the supernatant of PBMC unstimulated or stimulated samples with 10 $\mu\text{g/ml}$ of *L. braziliensis* promastigote antigens (LbAg) or 0.5 $\mu\text{g/ml}$ plate-coated anti-CD3 (OKT3) (Biolegend) in the presence of 5 ng/mL of rIL-2 for 72 h. IFN- γ , TNF- α , Granzyme B, IL-10, and IL-4 levels were assayed by Cytokine Bead Array (CBA) (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Serum evaluation of IL-10, IFN- γ , TNF- α , and CRP levels were performed by ELISA assay according to the manufacturer's protocol (R&D systems).

Proliferation Assay

Proliferation was performed by using PBMC unstimulated or stimulated with 0.5 $\mu\text{g/ml}$ plate-coated anti-CD3 (OKT3) (Biolegend) in the presence of 5 ng/mL of rIL-2 for 72 h followed of evaluation by intracellular staining for the cell cycle related nuclear antigen Ki67 by flow cytometry.

Telomere Fluorescence *in situ* Hybridisation

CD4⁺ and CD8⁺ T cells were isolated (as above) from HC and CL samples and prepared on poly-L-lysine coated glass slides by cytocentrifugation (Cytospin, Thermo Scientific, USA). Cytological specimens were then dried and fixed in ethanol/acetone prior to freezing. Specimens were thawed prior to staining. Specimens were PFA fixed, dehydrated in cold ethanol prior to permeabilization and blocking with BSA. Slides were washed prior to further dehydration across an ethanol gradient and air dried prior to hybridization with the PNA probe (Panagene, TelC Cy3, #14 1224PL-01) for 2 h in the dark as described in (16). Slides were subsequently washed in formamide/SSC prior to mounting with Vectorshield/DAPI (Vector Laboratories, USA). Imaging was performed using a Leica SPE2 confocal microscope using LAS X version 3.3.0 software (Leica Microsystem, Wetzlar, Germany). The images corresponded to a full z stack of CD4 or CD8 T cells were analyzed using ImageJ software.

t-SNE Analysis

Unbiased representations of multi-parameter flow cytometry data were generated using the *t*-distributed stochastic neighbor embedding (*t*-SNE) algorithm. The R package "Rtsne" available on CRAN (github.com/jkrijthe/Rtsne) was used to perform the Barnes Hut implementation of *t*-SNE on flow cytometry data. FlowJo software was used to export events of interest (in fcs format) for each sample. After using the Bioconductor "flowCore" R package to import.fcs file data and the Logicle transform to scale the data similarly to that displayed in FlowJo, 10,000 events from each samples analyzed in parallel were merged and the relevant fluorescent parameters were used. *t*-SNE is a non-linear dimensionality reduction method that optimally places cells with similar expression levels near to each other and cells with dissimilar expression levels further apart.

Statistics

GraphPad Prism was used to perform statistical analysis. KS normality test was prior performed and the statistical significance was evaluated using Student *t*-test for paired samples or repeated-measures ANOVA with Tukey correction used for *post-hoc* testing. A Mann-Whitney test was performed for all continuous, non-parametric variables. Differences were considered significant when *P* was <0.05.

RESULTS

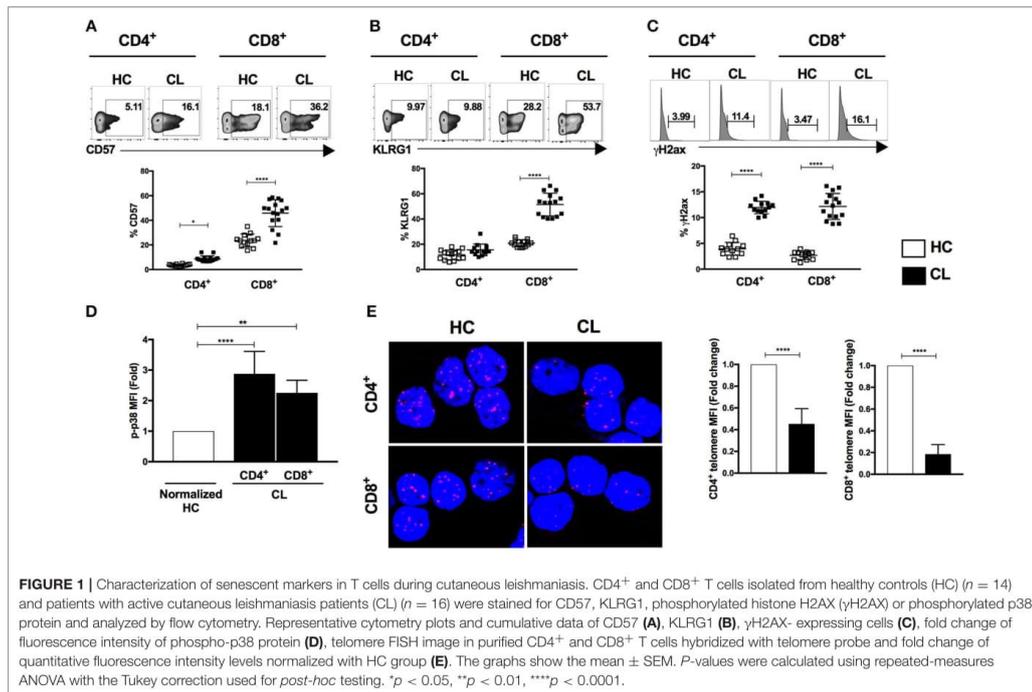
T Cells From Cutaneous Leishmaniasis Patients Exhibit Characteristics of Senescence

Senescent T cells demonstrate both intra- and extra- cellular phenotypic changes as well as functional defects often implicated in the susceptibility of host immunity. We observed increased frequencies of the cells surface senescence associated markers CD57 in CD4⁺ and CD8⁺ T cells (Figure 1A) and the inhibitory killer cell lectin-like receptor G1 (KLRG1) in CD8⁺ T cells in CL patients compared to controls (Figure 1B). T cells from patients also expressed more of the DNA damage-related protein γ H2AX (Figure 1C) and exhibited elevated phosphorylation of p38 protein that was significantly higher in CD4⁺ and CD8⁺ T cells than controls (Figure 1D). In addition, confocal microscopy analysis demonstrated shorter telomeres in both CD4⁺ and CD8⁺ T cells that were significantly shorter than observed in the HC control group (Figure 1E). Therefore, T cells that exhibit multiple characteristics of senescence accumulate in patients with CL.

Senescent T Cells From Cutaneous Leishmaniasis Patients Are Found Within the EMRA Population

Both CD8⁺ and CD4⁺ T cells can be subdivided into four populations on the basis of their relative surface expression of CD27 and CD45RA molecules. This can define naive (CD45RA⁺CD27⁺), central memory (CM; CD45RA⁻CD27⁺), effector memory (EM; CD45RA⁻CD27⁻), and effector memory T cells that re-express CD45RA (EMRA; CD45RA⁺CD27⁻) that contain the majority of senescent T cells (8). CL patients possess increased frequencies of effector memory (EM) and EMRA and decreased central memory (CM) populations in both CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets (Figures 2A,B). No difference in total circulating white cell count was observed between healthy controls and CL patients (Supplementary Figure 1) indicating a proportional increase of these cells in the circulating CD4⁺ and CD8⁺ subsets.

Chronic infection and continuous antigen-specific stimulation of T cells induces loss of co-stimulatory receptors, such as CD28 and CD27 and replicative capacity resulting from telomere shortening and decreased activity of the enzyme telomerase. The CL-EMRA T cell subset within both CD4⁺ and CD8⁺ compartments have lost CD27 and CD28 coexpression (Figure 2C) and demonstrated diminished proliferative capacity (Figure 2D) that was also observed in both CM and EF memory



subsets (Supplementary Figure 2) and identified by Ki67 staining, after polyclonal stimulation *in vitro*. We analyzed the expression of catalytic telomerase component (hTERT) within CD4⁺ and CD8⁺ EMRA from both groups and found that CL patients exhibit decreased expression of hTERT compared to controls (Figures 2E,F). This observation was extended to CM and EM memory subsets of both compartments (CD4⁺ and CD8⁺) in response to activation (data not shown). Therefore, the EMRA subset that accumulates during CL exhibits phenotypic as well as functional characteristics of senescence.

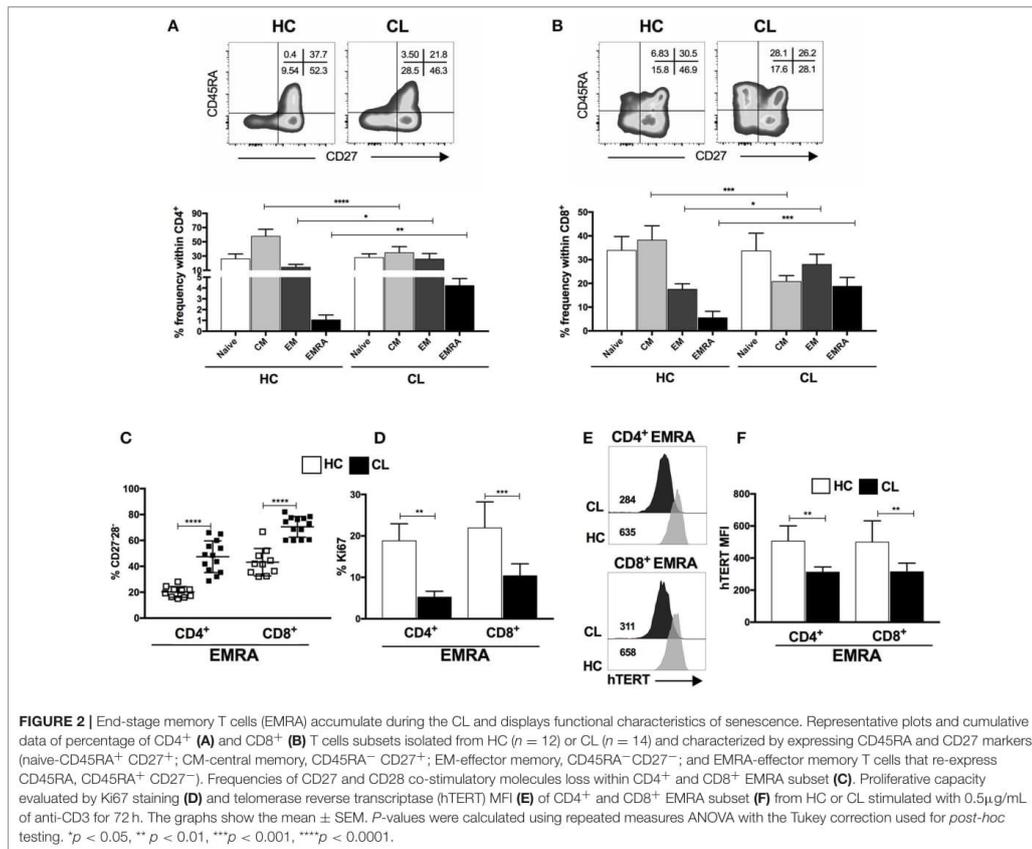
T Cells From Cutaneous Leishmaniasis Patients Exhibit a Pro-Inflammatory Functional Phenotype

The abundant capacity to secrete pro-inflammatory mediators including cytokines has been associated with aging and chronic infections. Compared to controls, the PBMC from CL patients secreted significantly higher levels of IFN- γ , TNF- α , and Granzyme B after anti-CD3 stimulation (Figure 3). In addition, *L. braziliensis* antigen (LbAg) stimulation induced high levels of these mediators in CL patients but not in the healthy controls, suggesting that there is an accumulation of parasite specific T cells with a secretory profile in these individuals. While IL-10 was induced after anti-CD3 stimulation of patients and controls, LbAg stimulation did not induce this inhibitory cytokine in

CL patients indicating an imbalance of pro-inflammatory vs. anti-inflammatory cytokines in response to specific antigen stimulation.

To investigate the pro-inflammatory cytokine secretion in more detail we used the *t*-Distribution Stochastic Neighbor Embedding (*t*-SNE) algorithm, which projects high dimensional data into two dimensional space (*t*-SNE1 and *t*-SNE2) through performing repeated pairwise comparison of randomly selected cellular phenotypes based on their marker expression—ultimately clustering closely related cells. This allowed us to characterize the phenotypic diversity identified by specific clusters associated with granular contents (Granzyme B, Perforin, and CD107a) and cytokines (IFN- γ , TNF- α) on CD4⁺ (Figures 4A,B) and CD8⁺ T cells (Figures 4D,E) obtained from healthy controls and CL patients. The relative low expression of pro-inflammatory mediators in HC were combined with a strong expression of them in both T cell compartments of CL patients. This indicates the differential composition of functional markers with the predominance of TNF- α , CD107a, and perforin associated to CL-CD4⁺ (2, 4, 14, and 19) and CD8⁺ (7, 8, 10, 16, 13, and 15) clusters, but not in controls, as presented in the heat map (Figures 4C,F).

To investigate this further we examined the secretory phenotype of cytokine-producing T cells within CL patient and HC by flow cytometric analysis using the expression of senescence surface markers CD45RA and CD27. *Ex vivo*



and polyclonal stimulation analyses demonstrated increased frequencies of senescent T cells subset (EMRA) within both CD8⁺ (Figure 5) and CD4⁺ T cells (data not shown) from CL patients that produce IFN- γ , TNF- α , Granzyme B, Perforin, and CD107a, supporting the pro-inflammatory secretory profile of these populations.

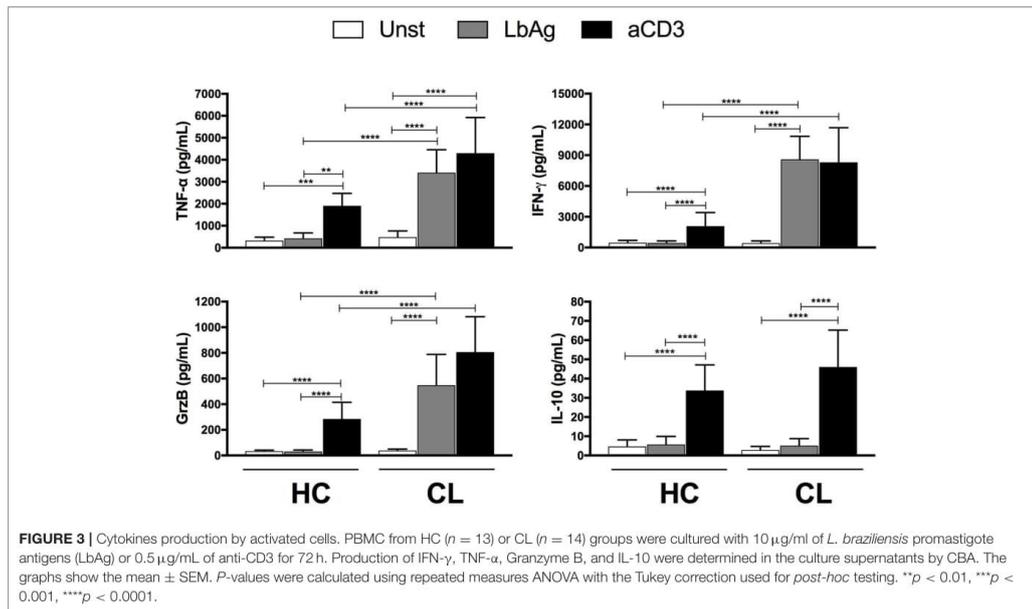
CL Patients Have Increased Systemic Inflammation That Correlates With the Accumulation of Senescent (EMRA) and Effector Memory T Cells

Systemic production of pro-inflammatory mediators is linked to the development of phenotypic and dysfunctional senescence features of T cells. Thus, we performed a serological analysis for some common immune mediators in both HC and CL groups. CL patients had increased systemic levels of C-reactive protein (CRP), IFN- γ , and TNF- α (Figure 6A), which correlated significantly with the accumulation of senescent CD8⁺

(Figure 6B) and CD4⁺ (Supplementary Figure 3) T cell subsets. Moreover, CRP levels correlated positively with the accumulation of EMRA memory T cell within both CD4⁺ and CD8⁺, but not naïve or central memory subsets (Supplementary Figure 4). There was no correlation between the level of IL-10 and EMRA T cells further suggesting an imbalance between pro and anti-inflammatory cytokines in CL patients. There was also no correlation between the levels of these cytokines and the CM or EM memory T cell subsets (data not shown).

Circulating Senescent (EMRA) T Cells Correlate With Lesion Size and Propensity for Skin Homing After *L. braziliensis* Antigen Stimulation

As senescent T cells that accumulated in CL patients were pro-inflammatory, especially after stimulation with *L. braziliensis* antigens, we investigated if they were associated with the skin immunopathology that occurs during the infection. To do this



we correlated the EMRA CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets with the size of the skin lesions in patients with cutaneous leishmaniasis (Figure 7A). We found a strong correlation between the EMRA CD4⁺ and moderate correlation between CD8⁺ T cell subsets cells with lesion size suggesting that these circulating cells contributed to skin immunosurveillance and immunopathology during the course of the disease. The same correlation was observed with EM subset from both compartments, supporting previous observations (17–19).

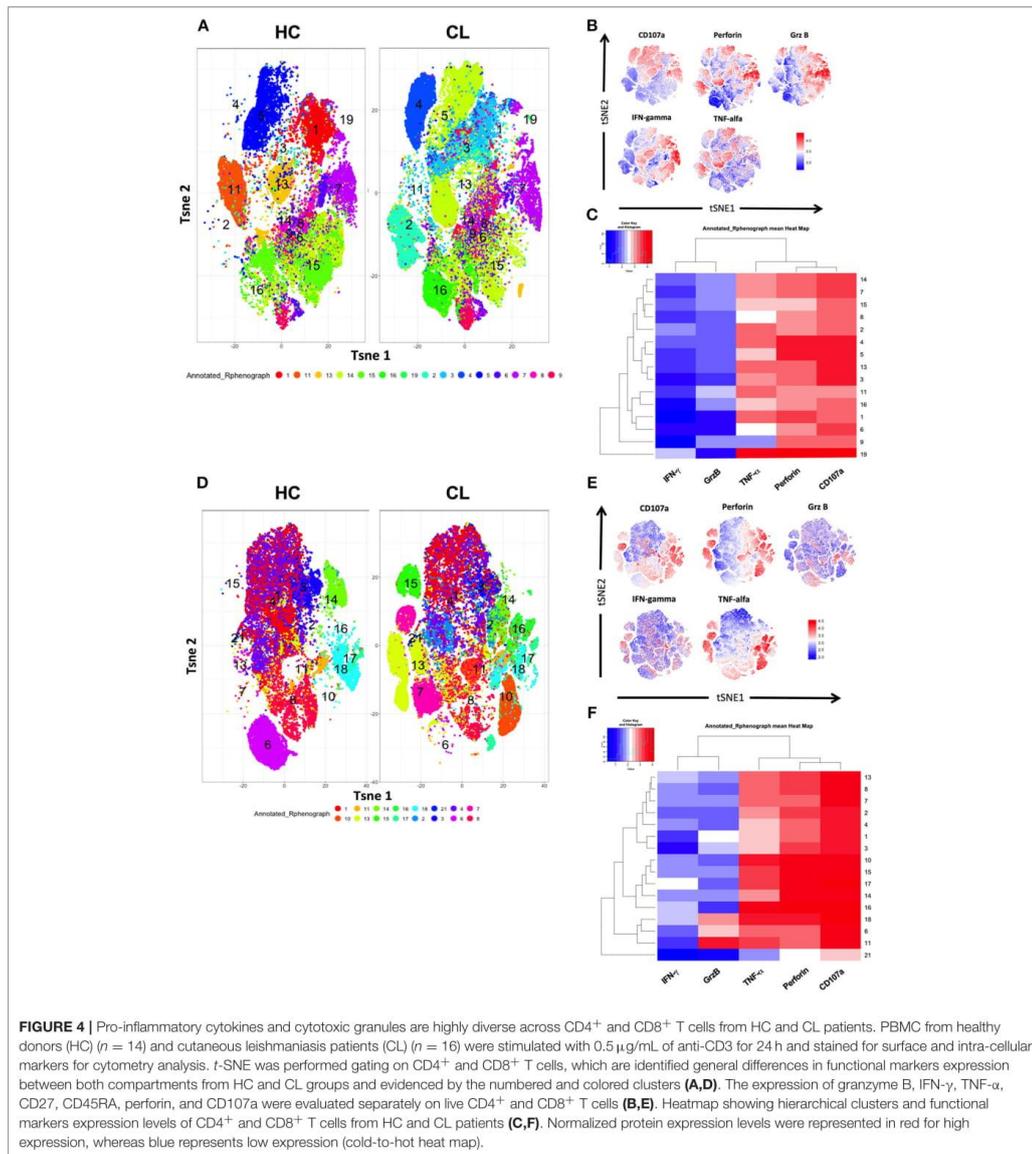
We therefore evaluated the ability of EMRA subsets to regulate the skin homing receptors cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) and chemokine receptor CCR4 before and after activation with LbAg. Polyclonal activation with anti-CD3 induced increased expression of CLA in both CL and HC groups (not shown), however EMRAs and EM from CL upregulated the CLA expression in response to *L. braziliensis* antigen recall (Figures 7B,C). Circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells showed higher frequencies of CLA compared to HC group (Supplementary Figure 5) confirming previous reports (18, 19). However, we extended previous observations by showing that LbAg induced high levels of CLA predominantly in EF and EMRA memory T cell subsets within both CD4⁺ and CD8⁺ compartments. These findings suggest that there is preferential induction of CLA on T cells from CL conferring increased ability to target skin lesion sites. No differences in CCR4 expression were observed between HC and CL groups in none of the conditions evaluated (data not shown).

DISCUSSION

Persistent antigenic stimulation can result in phenotypic characteristics and functional changes associated with senescence in human T cells. These include decreased responsiveness to TCR stimulation, diminished proliferative capacity, increased susceptibility to apoptosis and expression of immune inhibitory receptors (11, 20) that directly impede the host effort to mount an effective immunity against pathogens (21, 22).

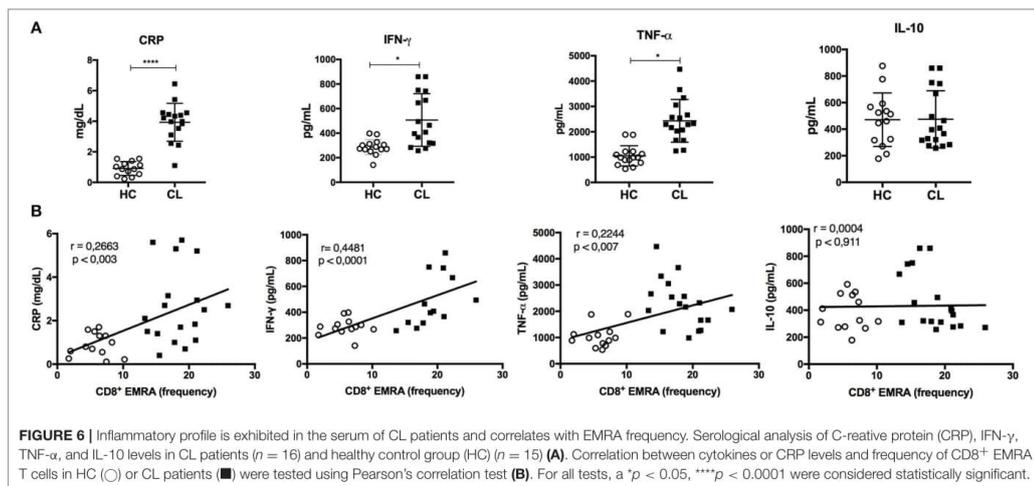
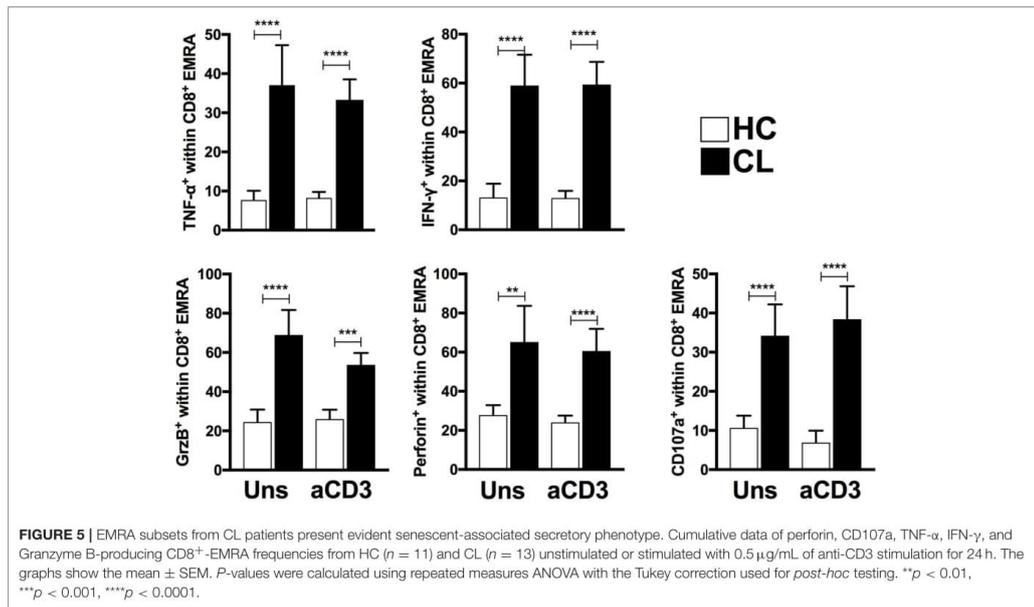
In our experiments, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CL patients exhibit increased expression of many senescence-related markers including CD57, KLRG1, p38 MAPK, and phosphorylation of histone protein H2AX. Although the increased expression of these markers has been described previously in aging and infection (23, 24) it was not clear if these cells also accumulated during parasitic infections. As previously reported and supported by our findings, circulating CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CL patients demonstrated higher expression of CD57 as compared to healthy controls (25, 26), and this was also observed in T cells from the lesions of CL patients or during visceral leishmaniasis (27).

KLRG1 expression has been shown to impair microbicidal function of NK cells and CD8⁺ T cells (28, 29) and this may have an impact on host immunity during *Leishmania* infections. In addition, murine CD8⁺ T cells expressing KLRG1 downregulate its receptor under pro-inflammatory conditions, which is essential for developing peripheral and tissue-resident memory cells with increased proliferative



capacity (30); this supports the limitation of the isolated use of KLRG1 as a senescent marker. However, in the present and previous studies (31), we have used KLRG1 expression in conjunction with other markers to define senescent T cells.

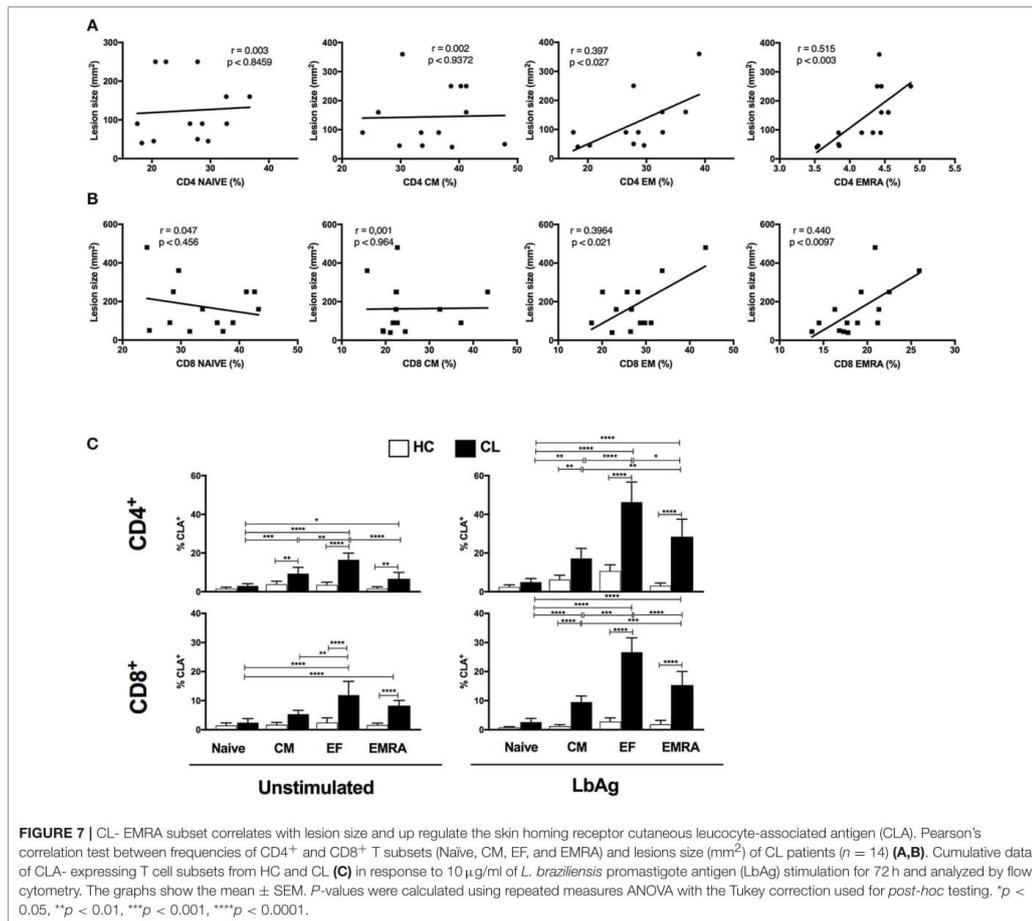
The phosphorylation of both p38MAPK and H2AX is induced in response to telomere shortening, which have been associated with proliferative defect in human T cells (32). This is related to minimal telomerase activity that in other situations can be restored with the transduction of hTERT resulting in



telomere elongation and an increase in replicative life span after stimulation (8, 33). Consistent with these, both CD4⁺ and CD8⁺ T cells from CL patients show short telomeres and low expression of the catalytic telomerase component in memory subsets.

Similar to our findings, continued antigenic exposure drives the expansion and differentiation of both CD4⁺ and CD8⁺ T cells to an end-stage/senescent population that re-express

CD45RA associated with the loss of CD27/CD28 co-stimulatory receptors (EMRA). As extensively demonstrated in HIV and CMV infections these populations exhibit decreased proliferative capacity, as demonstrated here and increased propensity to apoptosis and decreased TCR stimulation (20). Although we did not perform analyzes regarding propensity to apoptosis and decreased TCR stimulation that could be a limitation to the study,



our previous observations we have demonstrated that T cells with the phenotype of senescent cells as described here do exhibit these characteristics (9, 34).

Cutaneous leishmaniasis caused by *L. braziliensis* is also associated with potent Th1-type responses and chronic production of pro-inflammatory cytokines (2, 3). Although these responses are beneficial for the activation of leishmanicidal mechanisms and parasite control, the exaggerated inflammation contributes to the development of skin lesions and tissue destruction observed in human ML and CL patients (35, 36). Here we show that the inflammatory T cells that accumulate in the circulation of infected individuals have characteristics of senescent cells and since they are highly secretory, they may have the equivalent of a senescence-associated secretory phenotype (SASP) (13). In addition, we consider that the extent of senescence may depend on the clinical type of leishmaniasis

as well as during other parasitic infections (27, 37, 38). A key observation was that the stimulation with *Leishmania* antigens induced an imbalance in the pro vs. anti-inflammatory cytokine ratio compared with anti-CD3 activation of T cells from infected patients. In patients and murine models, the exacerbated production of IFN- γ and TNF- α , and the decreased production of IL-10 positively correlate with lesions size in CL and tissue damage in severe mucosal leishmaniasis (ML) (35, 36). Intralesional analysis of cytokine gene expression has shown high frequencies of granzyme, IL-2, IFN- γ , and TNF- α and enrichment of *Leishmania*-specific CD8⁺ T (19, 39). Moreover, patients treated with anti-inflammatory drugs show increased healing of lesions, supporting the deleterious role of inflammation (40, 41). High frequencies of cytotoxic cells were observed in lesions of patients with CL caused by *L. braziliensis* and correlated with inflammatory potential and cutaneous tissue

damage. Moreover, the exaggerated inflammation correlates with increased tissue hyperplasia, granuloma development, T cells apoptosis and susceptibility to visceral leishmaniasis (19, 39, 42).

Increased inflammatory markers have been linked to a wide variety of adverse outcomes and chronic conditions, even as reciprocally impaired antigen-specific immune responses compromise protective capacities (43). According to our experiments, increased levels of pro-inflammatory mediators are observed systemically in patients with both CL and ML or induced *in vitro* after specific-antigen recall (5, 44, 45). Inflammatory products, such as TNF- α , IL-1 β , CRP are potent inducer of phenotypic and dysfunctional senescence features of T cells accelerating the impairment of the immune effector function (7).

We now show that circulating senescent cells in infected individuals have increased potential to home to the skin as indicated by high CLA expression, extending previous reports that demonstrate the up regulation of this receptor in circulating and local effector memory T cells (17–19). CLA is a unique skin-homing receptor expressed by circulating memory T cells that infiltrate the skin which facilitates targeting of T cells to inflamed skin, which also has been associated with the pathogenesis or severity of many inflammatory skin diseases, such as leprosy, atopic dermatitis and psoriasis (46, 47). Furthermore, the activation of T cells from patients with *L. braziliensis* antigens *in vitro* further induced the expression of CLA but not CCR4 on the senescent T cells. During *Leishmania* infection skin homing receptors can be induced by proinflammatory mediators, such as IL-1 and TNF- α as consequence of tissue injury and systemic inflammation (40). CLA-positive cells can use both VLA-4/VCAM-1 and LFA-1/ICAM-1 for extravasation on skin surfaces (48), which could account the enrichment of T cells expressing this receptor in the lesion of cutaneous leishmaniasis patients (18, 49).

The observation of a positive correlation between the accumulation of circulating senescent T cells and lesion size provides a link between events in the blood and in the skin suggesting that the recruitment of these proinflammatory cells, resulting from increased CLA expression, may contribute to the skin pathology in CL.

The findings presented here demonstrate that senescent T cells with a unique functional profile are extensively induced by telomere dependent-senescence during cutaneous leishmaniasis. This study identifies the role of cellular senescence in regulating the function of parasite-specific T cells and demonstrates that these cells can also be associated with the immunopathology that occurs during acute infection.

REFERENCES

1. WHO. *Leishmaniasis*. WHO (2016). Available online at: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf
2. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol*. (2016) 16:581–92. doi: 10.1038/nri.2016.72
3. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J Clin Invest*. (1993) 91:1390–5. doi: 10.1172/JCI116341
4. Junior ADO, Machado P, Bacellar O, Cheng LH. Evaluation of IFN- γ and TNF- α as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis IFN- γ e TNF- α como marcadores da resposta clinica

AUTHOR CONTRIBUTIONS

LC, RM, OD, HdM, JS, and DG performed experiments. LC, DG, OD, and EC analyzed data. AF selected the patients. DG, AA, RD, and MV-S designed the project and discussed data. DG, AA, MV-S, RR, and EC wrote the manuscript the support of all other co-authors.

FUNDING

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Espírito Santo-FAPES/Newton Fund and Medical Research Council-UK (Grant 72939273/16) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel—CAPES-Brazil - Code 001.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Bruna Mendonça Portela (HUCAM-UFES) and Dr. Lorenzo Lyrio Stringari for CRP and serological cytokine evaluations and Dr. Alessio Lanna (Kennedy Institute of Rheumatology—UK) for the scientific discussion.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2018.03001/full#supplementary-material>

Supplementary Figure 1 | Clinical features of cutaneous leishmaniasis patients and healthy controls participating in the study. NA, Not applicable.

Supplementary Figure 2 | Proliferative capacity evaluated by Ki67 staining of CD4⁺ and CD8⁺ subsets [Naive; Central memory (CM) and Effector memory (EM)] from HC or CL stimulated with 0.5 μ g/mL of anti-CD3 for 72 h. The graphs show the mean \pm SEM. *P*-values were calculated using repeated measures ANOVA with the Tukey correction used for *post-hoc* testing. ***p* < 0.01, *****p* < 0.0001.

Supplementary Figure 3 | Correlation between cytokines levels and frequency of CD4⁺ EMRA subset in HC (○) or CL patients (■) were tested using Pearson's correlation test. For all tests, a *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Supplementary Figure 4 | Inflammatory profile correlates with differentiation state. Correlation between cytokines levels and frequency of CD4 (A) and CD8 (B) subsets in HC or CL patients were tested using Pearson's 1124 correlation test. For all tests, a *p* < 0.05 was considered statistically significant.

Supplementary Figure 5 | Characterization of CLA expression in T cells during cutaneous leishmaniasis. CD4⁺ and CD8⁺ T cells isolated from healthy controls (HC) (*n* = 12) and patients with active cutaneous leishmaniasis patients (CL) (*n* = 14) were stained for cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) and analyzed by flow cytometry. Representative cytometry plots and cumulative data of CLA-expressing cells. The graphs show the mean \pm SEM. *P*-values were calculated using repeated-measures ANOVA with the Tukey correction used for *post-hoc* testing. *****p* < 0.0001.

- na leishmaniose cutânea. *Rev Soc Bras Med Trop.* (2002) 35:7–10. doi: 10.1590/s0037-86822002000100002
5. Kip AE, Balasegaram M, Beijnen JH, Schellens JHM, De Vries PJ, Dorloa TPC. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:1–14. doi: 10.1128/AAC.04298-14
 6. Akbar AN, Fletcher JM. Memory T cell homeostasis and senescence during aging. *Curr Opin Immunol.* (2005) 17:480–5. doi: 10.1016/j.coi.2005.07.019
 7. Macaulay R, Akbar AN, Henson SM. The role of the T cell in age-related inflammation. *Age* (2013) 6:563–72. doi: 10.1007/s11357-012-9381-2
 8. Di Mitri D, Azevedo RI, Henson SM, Libri V, Riddell NE, Macaulay R, et al. Reversible senescence in human CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ memory T cells. *J Immunol.* (2011) 187:2093–100. doi: 10.4049/jimmunol.1100978
 9. Lanna A, Henson SM, Escors D, Akbar AN. The kinase p38 activated by the metabolic regulator AMPK and scaffold TAB1 drives the senescence of human T cells. *Nat Immunol.* (2014) 15:965–72. doi: 10.1038/ni.2981
 10. Callender LA, Carroll EC, Beal RWJ, Chambers ES, Nourshargh S, Akbar AN, et al. Human CD8⁺EMRA T cells display a senescence-associated secretory phenotype regulated by p38 MAPK. *Aging Cell* (2018) 17:1–9. doi: 10.1111/acel.12675
 11. Akbar AN, Henson SM, Lanna A. Senescence of T lymphocytes: implications for enhancing human immunity. *Trends Immunol.* (2016) 37:866–76. doi: 10.1016/j.it.2016.09.002
 12. Henson SM, Riddell NE, Akbar AN. Properties of end-stage human T cells defined by CD45RA. *Curr Opin Immunol.* (2012) 24:476–81. doi: 10.1016/j.coi.2012.04.001
 13. Tchonia T, Zhu Y, van Deursen J, Campisi J, Kirkland JL. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. *J Clin Invest.* (2013) 123:966–72. doi: 10.1172/JCI64098
 14. Giggley JP, Bhadra R, Moretto MM, Khan IA. T cell exhaustion in protozoan disease. *Trends Parasitol.* (2012) 28:377–84. doi: 10.1016/j.pt.2012.07.001
 15. Rodrigues V, Cordeiro-da-Silva A, Laforge M, Ouassii A, Akharid K, Silvestre R, et al. Impairment of T cell function in parasitic infections. *PLoS Negl Trop Dis.* (2014) 8:e2567. doi: 10.1371/journal.pntd.0002567
 16. Riddell NE, Griffiths SJ, Rivino L, King DCB, Teo GH, Henson SM, et al. Multifunctional cytomegalovirus (CMV)-specific CD8⁺T cells are not restricted by telomere-related senescence in young or old adults. *Immunology* (2015) 144:549–60. doi: 10.1111/imm.12409
 17. Santamaria-Babi LF. CLA⁺ T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol.* (2004) 14:13–8.
 18. Mendes-Aguiar CDO, Gomes-Silva A, Nunes E, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto MDP, et al. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by Leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* (2009) 157:377–84. doi: 10.1111/j.1365-2249.2009.03970.x
 19. Santos CDS, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8⁺granzyme B⁺-mediated tissue injury vs. CD4⁺IFN γ ⁺-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* (2013) 133:1533–40. doi: 10.1038/jid.2013.4
 20. Akbar AN, Beverley PCL, Salmon M. Will telomere erosion lead to a loss of T-cell memory? *Nat Rev Immunol.* (2004) 4:737–43. doi: 10.1038/nri1440
 21. Nikolich-Zugich J. Ageing and life-long maintenance of T-cell subsets in the face of latent persistent infections. *Nat Rev Immunol.* (2008) 8:512–22. doi: 10.1038/nri2318
 22. Goronzy JJ, Weyand CM. Understanding immunosenescence to improve responses to vaccines. *Nat Immunol.* (2013) 14:428–36. doi: 10.1038/ni.2588
 23. Griffiths SJ, Riddell NE, Masters J, Libri V, Henson SM, Wertheimer A, et al. Age-associated increase of low-avidity cytomegalovirus-specific CD8⁺ T cells that re-express CD45RA. *J Immunol.* (2013) 190:5363–72. doi: 10.4049/jimmunol.1203267
 24. Henson SM, Akbar AN. KLRG1—more than a marker for T cell senescence. *Age* (2009) 31:285–91. doi: 10.1007/s11357-009-9100-9
 25. Parodi C, García Bustos MF, Barrio A, Ramos F, González Prieto AG, Mora MC, et al. American tegumentary leishmaniasis: T-cell differentiation profile of cutaneous and mucosal forms—co-infection with *Trypanosoma cruzi*. *Med Microbiol Immunol.* (2016) 205:353–69. doi: 10.1007/s00430-016-0455-0
 26. Gomes AHS, Martines RB, Kanamura CT, Barbo MLR, Iglezias SD, Lauletta Lindoso JA, et al. American cutaneous leishmaniasis: *in situ* immune response of patients with recent and late lesions. *Parasite Immunol.* (2017) 39:e12423. doi: 10.1111/pim.12423
 27. Casado JL, Abad-Fernández M, Moreno S, Pérez-Eliás MJ, Moreno A, Bernardino JI, et al. Visceral leishmaniasis as an independent cause of high immune activation, T-cell senescence, and lack of immune recovery in virologically suppressed HIV-1-coinfected patients. *HIV Med.* (2015) 16:240–8. doi: 10.1111/hiv.12206
 28. Wang JM, Cheng YQ, Shi L, Ying RS, Wu XY, Li GY, et al. KLRG1 Negatively regulates natural killer cell functions through the akt pathway in individuals with chronic hepatitis C virus infection. *J Virol.* (2013) 87:11626–36. doi: 10.1128/JVI.01515-13
 29. Müller-Durovic B, Lanna A, Polaco Covre L, Mills RS, Henson SM, Akbar AN. Killer cell lectin-like receptor G1 inhibits NK cell function through activation of adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase. *J Immunol.* (2016) 197:2891–9. doi: 10.4049/jimmunol.1600590
 30. Herndler-Brandstetter D, Ishigame H, Shinnakasu R, Plajer V, Stecher C, Zhao J, et al. KLRG1⁺effector CD8⁺T cells lose KLRG1, differentiate into all memory T cell lineages, and convey enhanced protective immunity. *Immunity* (2018) 48: 716–29.e8. doi: 10.1016/j.immuni.2018.03.015
 31. Henson SM, Macaulay R, Riddell NE, Nunn CJ, Akbar AN. Blockade of PD-1 or p38 MAP kinase signaling enhances senescent human CD8⁺ T-cell proliferation by distinct pathways. *Eur J Immunol.* (2015) 45:1441–51. doi: 10.1002/eji.201445312
 32. von Zglinicki T, Saretzki G, Ladhoff J, d'Adda di Fagnana F, Jackson SP. Human cell senescence as a DNA damage response. *Mech Ageing Dev.* (2005) 126:111–7. doi: 10.1016/j.mad.2004.09.034
 33. Henson SM. Reversal of functional defects in highly differentiated young and old CD 8 T cells by PDL blockade. *Immunology* (2011) 135:355–63. doi: 10.1111/j.1365-2567.2011.03550.x
 34. Lanna A, Gomes DCO, Muller-Durovic B, McDonnell T, Escors D, Gilroy DW, et al. A sestrin-dependent Erk-Jnk-p38 MAPK activation complex inhibits immunity during aging. *Nat Immunol.* (2017) 18:354–63. doi: 10.1038/ni.3665
 35. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, De Jesus AR, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun.* (2002) 70:6734–40. doi: 10.1128/IAI.70.12.6734-6740.2002
 36. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* (2005) 101:226–30. doi: 10.1016/j.imlet.2005.06.004
 37. Albareda MC, Olivera GC, Laucella SA, Alvarez MG, Fernandez ER, Lococo B, et al. Chronic human infection with *Trypanosoma cruzi* drives CD4⁺ T cells to immune senescence. *J Immunol.* (2009) 183:4103–8. doi: 10.4049/jimmunol.0900852
 38. Guimarães-Pinto K, Nascimento DO, Corrêa-Ferreira A, Morrot A, Freire-de-Lima CG, Lopes MF, et al. *Trypanosoma cruzi* infection induces cellular stress response and senescence-like phenotype in murine fibroblasts. *Front Immunol.* (2018) 9:1–11. doi: 10.3389/fimmu.2018.01569
 39. Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM, Scott P, et al. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol.* (2015) 135:94–101. doi: 10.1038/jid.2014.305
 40. Báfica A, Oliveira F, Freitas LAR, Nascimento EG, Barral A. American Cutaneous Leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline. *Int J Dermatol.* (2003) 42:203–7. doi: 10.1046/j.1365-4362.2003.01868.x
 41. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg.* (2001) 65:87–9. doi: 10.4269/ajtmh.2001.65.87
 42. Novais FO, Carvalho AM, Clark ML, Carvalho LP, Beiting DP, Brodsky IE, et al. CD8⁺T cell cytotoxicity mediates pathology in the skin by inflammasome activation and IL-1 β production. *PLoS Pathog.* (2017) 13:1–21. doi: 10.1371/journal.ppat.1006196

43. Nasi M, De Biasi S, Gibellini L, Bianchini E, Pecorini S, Bacca V, et al. Ageing and inflammation in patients with HIV infection. *Clin Exp Immunol.* (2017) 187:44–52. doi: 10.1111/cei.12814
44. Da-Cruz AM, De Oliveira MP, De Luca PM, Mendonça SCF, Coutinho SG. Tumor necrosis factor- α in human American tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* (1996) 91:225–9. doi: 10.1590/S0074-02761996000200019
45. Nateghi Rostami M, Seyyedani Jasbi E, Khamesipour A, Miramin Mohammadi A. Plasma levels of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α), TNF- α soluble receptor type 1 (sTNFR I) and IL-22 in human leishmaniasis. *Trop Biomed.* (2015) 32:478–84.
46. Sigmundsdóttir H, Guðjónsson JE, Jónsdóttir I, Lúðvíksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA⁺CD8⁺ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol.* (2001) 126:365–9. doi: 10.1046/j.1365-2249.2001.01688.x
47. Antúnez C, Torres MJ, Mayorga C, Cornejo-García JA, Santamaría-Babi LF, Blanca M. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen⁺ T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* (2004) 34:559–66. doi: 10.1111/j.1365-2222.2004.1933.x
48. Woodland DL, Kohlmeier JE. Migration, maintenance and recall of memory T cells in peripheral tissues. *Nat Rev Immunol.* (2009) 9:153–61. doi: 10.1038/nri2496
49. Costa RP, Gollob KJ, MacHado PRL, Bacellar OAR, Almeida RP, Barral A, et al. Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4⁺ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients. *Immunol Lett.* (2003) 90:155–9. doi: 10.1016/j.imlet.2003.09.001

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Covre, Martins, Devine, Chambers, Vukmanovic-Stejc, Silva, Dietze, Rodrigues, de Matos Guedes, Falqueto, Akbar and Gomes. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.