



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO**

MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ (DUPLO-POSITIVOS) E
CD4⁺CD8⁻ (DUPLO-NEGATIVOS) EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA**

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO ACADÊMICO DE VITÓRIA DE SANTO ANTÃO
CURSO DE BACHARELADO EM ENFERMAGEM
NOME DE ENFERMAGEM

MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ (DUPLO-POSITIVOS) E
CD4⁺CD8⁻ (DUPLO-NEGATIVOS) EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Orientador: Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

VITÓRIA DE SANTO ANTÃO

2018

MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ (DUPLO-POSITIVOS) E
CD4⁻CD8⁻ (DUPLO-NEGATIVOS) EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE
TEGUMENTAR AMERICANA**

TCC apresentado ao Curso de Bacharelado em Enfermagem da Universidade Federal de Pernambuco, Centro Acadêmico de Vitória, como requisito para a obtenção do título de Bacharel em Enfermagem.

Aprovado em: 07/05/2018.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dra. Vitorina Nerivânia Covello Rehn
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dra. Isabella Macário Ferro Cavalcanti
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dra. Andresa Pereira de Oliveira Mendes
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães

RESUMO

O presente estudo avaliou os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, duplos-positivos (DP) e duplos-negativo (DN) e sua ativação em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), divididos em três grupos: antes do tratamento (AT), pós-tratamento (PT) e subclínicos (SC). Observamos que os linfócitos T CD4⁺ apresentaram-se em maior percentual nos grupos PT e SC quando comparado com o grupo controle (CT), entretanto, apresentaram uma maior ativação nos grupos AT e PT quando comparados com o grupo SC e uma menor ativação neste mesmo grupo, quando comparado com o grupo CT. Já os linfócitos T CD8⁺ apresentaram um maior percentual no grupo AT quando comprado com o grupo CT e uma maior ativação neste mesmo grupo quando comparado com os grupos PT, SC e CT. Não observamos nenhuma significância estatística no percentual dos linfócitos DP e DN, no entanto, percebemos que os linfócitos DP apresentaram uma menor ativação no grupo SC quando comparado com o grupo CT, enquanto que, os linfócitos DN apresentaram uma maior ativação no grupo AT quando comparado com os outros grupos. Os linfócitos T CD4⁺ parecem estar ligados a proteção nestes pacientes e os linfócitos T CD8⁺ a patogênese, enquanto que, os linfócitos DP e DN, quando ativados, parecem desempenhar um papel dual.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, Leishmaniose Tegumentar Americana, Linfócitos T CD4⁺, Linfócitos T CD8⁺, Linfócitos DP, Linfócitos DN, Sistema imune.

SUMÁRIO

ARTIGO	6
INTRODUÇÃO	7
MATERIAIS E MÉTODOS	9
RESULTADOS	11
DISCUSSÃO	15
REFERÊNCIAS	18
ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA	22
ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	25

ARTIGO

O PRESENTE TRABALHO ESTÁ APRESENTADO NO FORMATO DE ARTIGO REQUERIDO PELA REVISTA **PARASITE IMMUNOLOGY**, CUJAS NORMAS PARA SUBMISSÃO DE ARTIGOS SE ENCONTRAM EM ANEXO.

AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS CD4⁺, CD8⁺, CD4⁺CD8⁺ (DUPLO-POSITIVOS) E CD4⁻CD8⁻ (DUPLO-NEGATIVOS) DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

Título curto: AVALIAÇÃO DE LINFÓCITOS T NA LTA

Marton Kaique de Andrade Cavalcante^{1,2}, Gleycielle Alexandre Cavalcante², Rafael de Freitas e Silva², Maria Edileuza Felinto de Brito², Valéria Rêgo Alves Pereira²,
Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro^{1,2}

1- Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV-UFPE), Vitoria de Santo Antão, PE, Brasil.

2- Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, PE, Brasil.

Endereço de correspondência: Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória – Universidade Federal de Pernambuco (CAV-UFPE). Rua do Alto do Reservatório s/n, Bela Vista. CEP: 55608-680. Vitória de Santo Antão/PE Brasil. E-mail: m.kaiquecavalcante@hotmail.com

RESUMO: O presente estudo avaliou os linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, duplos-positivos (DP) e duplos-negativo (DN) e sua ativação em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), divididos em três grupos: antes do tratamento (AT), pós-tratamento (PT) e subclínicos (SC). Observamos que os linfócitos T CD4⁺ apresentaram-se em maior percentual nos grupos PT e SC quando comparado com o grupo controle (CT), entretanto, apresentaram uma maior ativação nos grupos AT e PT quando comparados com o grupo SC e uma menor ativação neste mesmo grupo, quando comparado com o grupo CT. Já os linfócitos T CD8⁺ apresentaram um maior percentual no grupo AT quando comprado com o grupo CT e uma maior

ativação neste mesmo grupo quando comparado com os grupos PT, SC e CT. Não observamos nenhuma significância estatística no percentual dos linfócitos DP e DN, no entanto, percebemos que os linfócitos DP apresentaram uma menor ativação no grupo SC quando comparado com o grupo CT, enquanto que, os linfócitos DN apresentaram uma maior ativação no grupo AT quando comparado com os outros grupos. Os linfócitos T CD4+ parecem estar ligados a proteção nestes pacientes e os linfócitos T CD8+ a patogênese, enquanto que, os linfócitos DP e DN, quando ativados, parecem desempenhar um papel dual.

Palavras-chave: Citometria de fluxo, Leishmaniose Tegumentar Americana, Linfócitos T CD4+, Linfócitos T CD8+, Linfócitos DP, Linfócitos DN, Sistema imune.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infectocontagiosa, considerada um problema de saúde pública [1]. Essa parasitose é encontrada principalmente nos países pobres como a África Oriental, Sudeste da Ásia e na América Latina, acometendo principalmente os menos favorecidos socioeconomicamente. No entanto, já se tem evidências de casos pelo continente europeu. Por esse fato, se concentra principalmente nos países subdesenvolvidos [2]. A leishmaniose é a terceira doença que mais causa morbidade, perdendo apenas para a esquistossomose e para a malária, principalmente em adolescentes [3].

No Brasil, no período entre 1995 e 2014, observa-se uma média anual de 25.763 novos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) [4]. Segundo a WHO, no período entre 2005 e 2016, foram registrados 250.988 casos de LTA no Brasil [5]. Na região nordeste, no ano de 2017, foram registrados 4.705 casos de LTA [6]. Em Pernambuco, estado considerado endêmico para a LTA, já foram relatados casos em todas as regiões do estado. Entretanto, a área de maior concentração do número de casos está localizada na Zona da Mata, onde ocorre mais de 60% dos doentes [7].

Essa é uma parasitose causada por protozoário pertencente à família *Trypanosomatidae* do gênero *Leishmania* spp, [3,4]. Atualmente, sabe-se que existe mais de 20 espécies de *Leishmania*, sendo as principais espécies causadoras da LTA a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, a *Leishmania (Viannia) guyanensis* e a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [8]. Quanto à parasitose, esta pode

apresentar-se em duas formas clínicas: a forma cutânea e a forma visceral, conhecida também como Calazar. A forma cutânea ou tegumentar, pode ainda ser classificada em: localizada, difusa, disseminadas ou mucocutânea [4,9,10].

O sistema imunológico pode expressar sua resposta à infecção por *Leishmania* através de mecanismos da imunidade inata e imunidade adaptativa. Após a inoculação do parasita na pele do hospedeiro, o mesmo irá interagir com os macrófagos teciduais, os quais irão fagocitá-los, além de desencadear a ativação do sistema complemento. No entanto, apenas a resposta imune inata não é suficiente para combater o parasito, dessa forma, se faz necessário à ação da resposta imune adaptativa. Dentro da imunidade adaptativa, destacam-se as células T CD4⁺ e CD8⁺ [2,11,12].

Os linfócitos T CD4⁺ são cruciais para a cura e/ou progressão da LTA [13]. Esses são fontes produtoras de citocinas, atuando nos mecanismos de cura e patogênese da doença [14]. Esses linfócitos podem seguir dois perfis distintos, dependendo das citocinas que estão no meio: o perfil Th1, que produz uma grande quantidade de IFN- γ , que é primordial para a produção de Óxido Nítrico (NO), culminando na morte da *Leishmania* [15,16] e o perfil Th2, característico pela produção de Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral-Beta (TGF- β), os quais atuam na inibição da produção de NO, favorecendo a multiplicação do parasita [2,12,17,18].

Os linfócitos T CD8⁺ possui um duplo papel no combate a infecção, pode atuar com a função lítica, os quais irão matar as células infectadas através da liberação de grânulos os quais contêm granzimas e perforinas, provocando assim lise celular. Também podem atuar na produção de citocinas e quimiocinas, fazendo com que, mais células cheguem e se ativem no local da infecção [14,19]. No entanto, ainda é controverso o papel destas células. Quando o linfócito T CD8⁺ é produtor de citocina, como o interferon- γ (IFN- γ), este atua de forma protetora, contribuindo para o controle da infecção. Porém, quando esta mesma célula, possui função citolíticas, contribui para o surgimento/exacerbação das lesões provocadas pela doença [20,21,22].

Os linfócitos duplo-positivos (DP) expressam em sua superfície tanto moléculas CD4⁺, quanto moléculas CD8⁺. Ainda não se sabe ao certo sua principal função, porém acredita-se que estas células desenvolvem funções auxiliares e citolíticas [23]. Estudos mostraram um aumento destas células em algumas doenças

autoimunes como a dermatite atópica, tireoidite autoimune, além de infecções virais e câncer [24,25,26,27,28].

Já os linfócitos duplo-negativos (DN) parecem exercer função regulatória, assim como função pró-inflamatória [29]. Estudos realizados por Ferraz e colaboradores (2017) com pacientes com LTA, observaram que os linfócitos DN foram os mais encontrados *in situ*, se comparados com as outras células avaliadas pelo grupo. Estas células, juntamente com os linfócitos T CD4⁺ e as NKT, correspondem a 80% das células citotóxicas na lesão [19].

Tendo em vista a necessidade de se desenvolver novos recursos terapêuticos efetivos para o combate a LTA, como vacinas e imunoterápicos, o presente estudo buscou caracterizar essas populações linfocitárias e seu perfil de ativação em pacientes com LTA do estado de Pernambuco/Brasil. Dessa forma, espera-se contribuir com as investigações já realizadas neste complexo entendimento sobre a atuação do sistema imune frente à LTA.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

Os pacientes deste estudo eram residentes de áreas endêmicas para a LTA no estado de Pernambuco. Um total de 50 pacientes fizeram parte desta pesquisa, os quais foram distribuídos em 3 grupos: um grupo denominado antes do tratamento (AT), composto por pacientes que ainda não haviam iniciado o esquema terapêutico (n= 33); um grupo denominado pós-tratamento (PT), composto por pacientes que já haviam finalizado o esquema terapêutico e obtido cura clínica (n= 7) e um terceiro grupo denominado subclínico (SC) composto por indivíduos que apresentaram diagnóstico positivo para a LTA, no entanto, não apresentavam manifestações clínicas da doença (n= 10). Os dados desses grupos foram comparados com um grupo denominado controle (CT) composto por indivíduos sadios, residentes em áreas não endêmicas para a doença (n= 19). Foram incluídos no estudo todos os pacientes com idade superior a 10 anos, que apresentaram diagnóstico clínico, epidemiológico e ao menos dois diagnósticos laboratoriais positivos para a LTA, realizados pelo Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães. Dentre os exames realizados tivemos: Reação de Cadeia em Polimerase (PCR), Imunofluorescência indireta (IFI), Intradermoreação de

Montenegro (IDRM), Pesquisa direta (PD) ou Punção aspirativa (PA). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fiocruz (CAAE: 11083812.7.0000.5190).

Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Foi coletado de cada paciente um total de 18 ml de sangue venoso em tubos contendo heparina. Após a coleta, o sangue foi colocado em um tubo Falcon, contendo Ficoll-Hypaque, em seguida o tubo foi submetido a uma centrifugação a temperatura ambiente em 400xg durante 30 minutos. Após isso, as PBMC foram coletadas e transferidas para outro tubo, as quais passaram por duas lavagens e centrifugações com a solução salina tamponada com fosfato (PBS) em temperatura ambiente, a 300xg durante 10 minutos. Posteriormente, em uma alíquota, adicionado 10µl de células + 90 µl de azul de trypan, para que assim fosse realizada a contagem das células, análise de sua viabilidade e ajuste de sua concentração para o experimento [13].

Citometria de fluxo

Para a análise das populações linfocitárias CD4⁺, CD8⁺, DP e DN e seu perfil de ativação, as PBMCs ($0,5 \times 10^6$ células) foram suspensas em PBS e marcadas com anticorpos de superfície anti CD3, CD4, CD8 e CD45R0, por um período de 20 minutos (todos previamente titulados). Após esse tempo, as células foram lavadas com a solução de PBS, e então resuspendidas em 200 µl de PBS. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSCalibur- BD Bioscience (> 20 mil eventos/tubo) usando o software "Cell Quest Pro" (BD Bioscience) para aquisição dos dados e o software FlowJo 7.6.5 (©Tree Star Inc.) para sua análise [13].

Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism 5.1. Primeiramente, foi realizado o teste Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, foram realizados os testes test T-student e Anova quando observados os pressupostos de normalidade. Quando não, foram utilizados os testes não paramétricos Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características clínicas dos pacientes

Todos os pacientes deste estudo foram provenientes de áreas endêmicas para a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Todos receberam diagnóstico epidemiológico, clínico e laboratorial para a LTA. A média da idade dos pacientes foi de 29,36 anos no grupo AT, 20,57 anos no grupo PT, 33,8 anos no grupo SC e 27,89 anos no grupo CT. No grupo antes tratamento, destaca-se o maior número de homens infectados, se comparado com o número de mulheres (razão de 4.5:1). Todos os pacientes AT apresentaram, no momento da avaliação clínica antes do tratamento, lesões ulcerosas em áreas descobertas do corpo, com tempo de evolução variando de 18 dias a 24 meses. O número médio de lesões/cicatrices variou entre 1 a 5 nos grupos AT e PT (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais características do grupo de estudo.

<i>Características</i>	<i>Grupo de Estudo</i>			
	<i>AT</i>	<i>PT</i>	<i>SC</i>	<i>CT</i>
Número	33	7	10	19
Idade	29,36 (13-71)	20,57 (12-37)	33,8 (11-63)	27,89 (26-32)
Razão H/M*	27/6	3/4	4/6	9/10
Duração média da doença/cicatrices	2,97 meses (18 dias–24 meses)	8 meses (3-24 meses)	-	-
No. médio de lesões/cicatrices	1,54 (1-5)	3 (1-5)	-	-

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; SC: Subclínico; CT: Controle.

Avaliação imunológica

Observamos um aumento estatisticamente significativo dos linfócitos T CD4⁺ nos grupos PT (p= 0.0431) e SC (p= 0.0311) quando comparado com o grupo controle (Gráfico 1-A). Com relação à ativação dos linfócitos T CD4⁺, observamos que estas células apresentaram-se mais ativadas (CD45RO⁺) nos grupos AT (p= 0.003) e PT (p= 0.0418), se comparado com o grupo SC e uma diminuição da ativação no grupo SC (p= 0.0057) se comparado com o grupo CT (Gráfico 1-B).

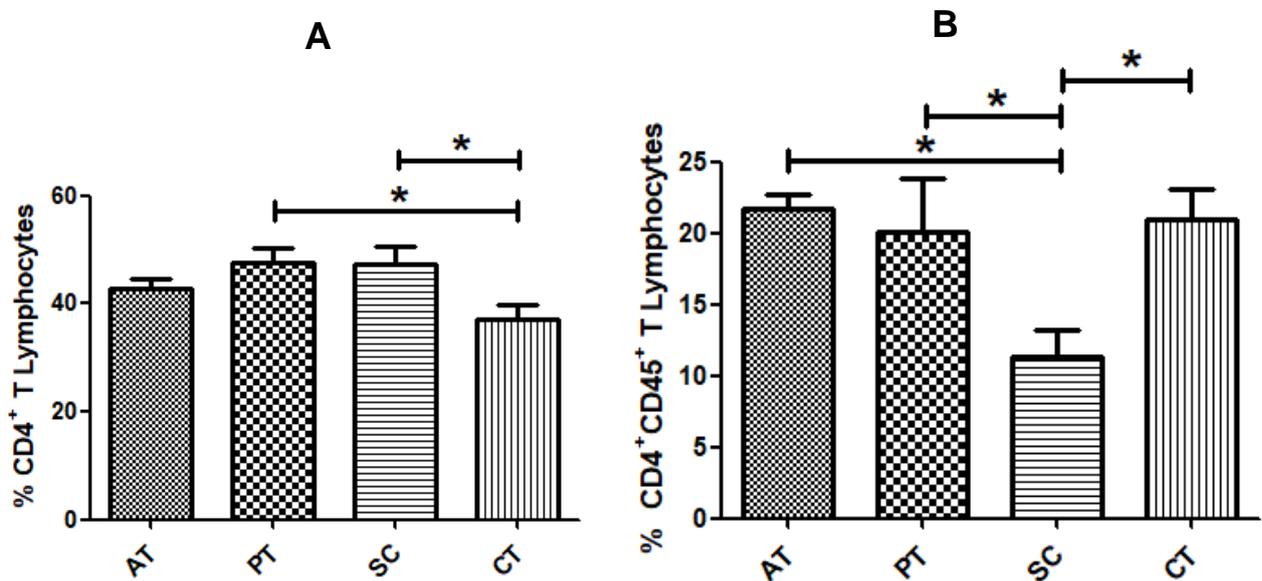


Gráfico 1 – A: Percentual de linfócitos T CD4⁺ e B: Percentual de ativação dos linfócitos T CD4⁺ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT), de pacientes subclínicos (SC) e de controles saudáveis, não portadores da doença, (CT). Os resultados estão expressos como médias ± SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Ao avaliarmos o percentual de linfócitos T CD8⁺ (Gráfico 2-A), observamos um aumento estatisticamente significativo destas células no grupo AT (p= 0.0231) comparado ao grupo CT. Quanto a sua ativação (Gráfico 2-B), percebemos uma maior ativação entre os grupos AT em relação ao PT (p= 0.0007), SC (p= 0.0027) e CT (p= 0.0008).

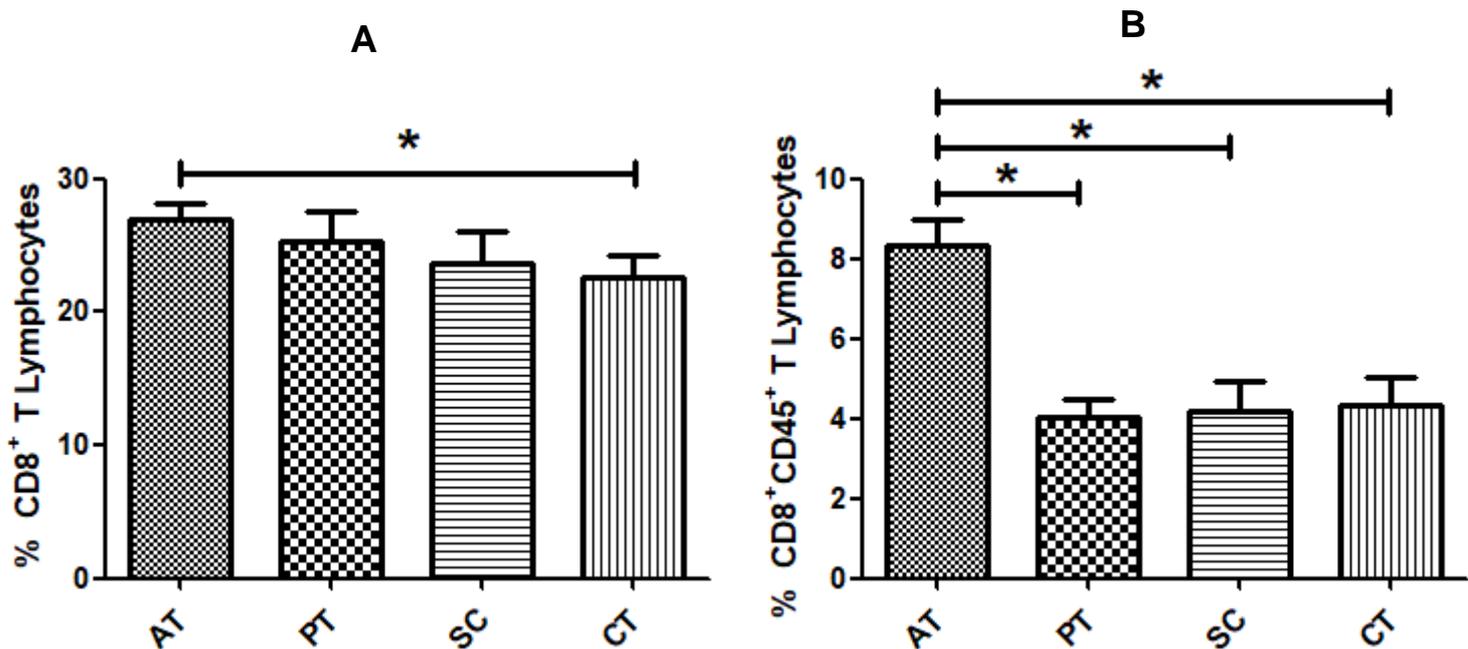


Gráfico 2 – A: Percentual de linfócitos T CD8⁺ e B: Percentual de ativação dos linfócitos T CD8⁺ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT), de pacientes subclínicos (SC) e de controles saudáveis, não portadores da doença, (CT). Os resultados estão expressos como médias \pm SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*”.

Não observamos nenhuma significância estatística ao avaliarmos o percentual de linfócitos DP (Gráfico 3-A). Ao avaliarmos sua ativação (Gráfico 3-B), podemos observar uma maior ativação no grupo AT em relação ao SC ($p < 0.0001$), PT quando comparado ao SC ($p = 0.0097$) e uma diminuição da sua ativação no grupo SC quando confrontado com o grupo CT ($p < 0.0001$).

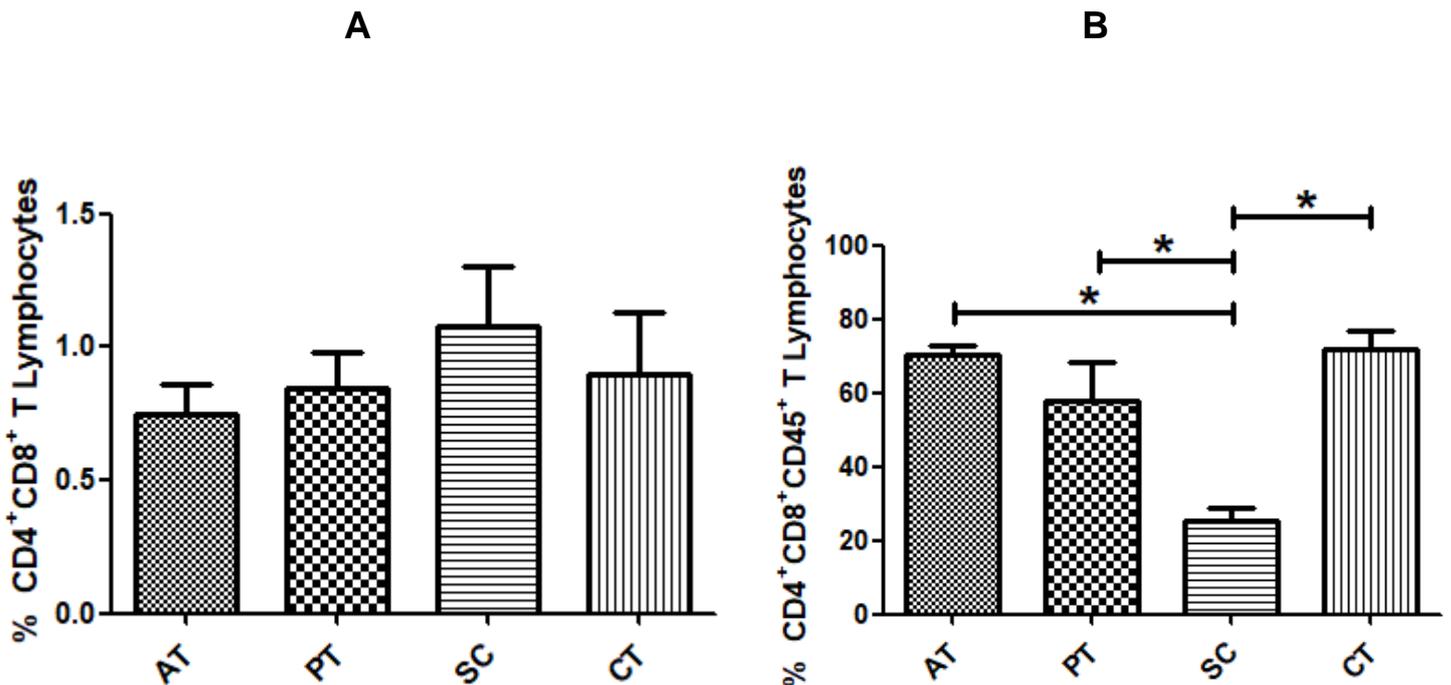


Gráfico 3 – A: Percentual de linfócitos T DP e B: Percentual de ativação dos linfócitos T DP em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT), de pacientes resistentes (RE) e de controles saudáveis, não portadores da doença, (CT). Os resultados estão expressos como médias \pm SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*”.

Por fim, ao avaliarmos os linfócitos DN (Gráfico 4-A), não observamos nenhuma significância estatística. No entanto, ao avaliarmos o percentual de ativação destas células (Gráfico 4-B), notamos uma maior ativação entre os grupos AT quando comparados ao PT ($p= 0.0044$), SC ($p= 0.0001$) e CT ($p= 0.0473$), e uma diminuição no grupo SC quando comparado com o grupo CT ($p= 0.0089$).

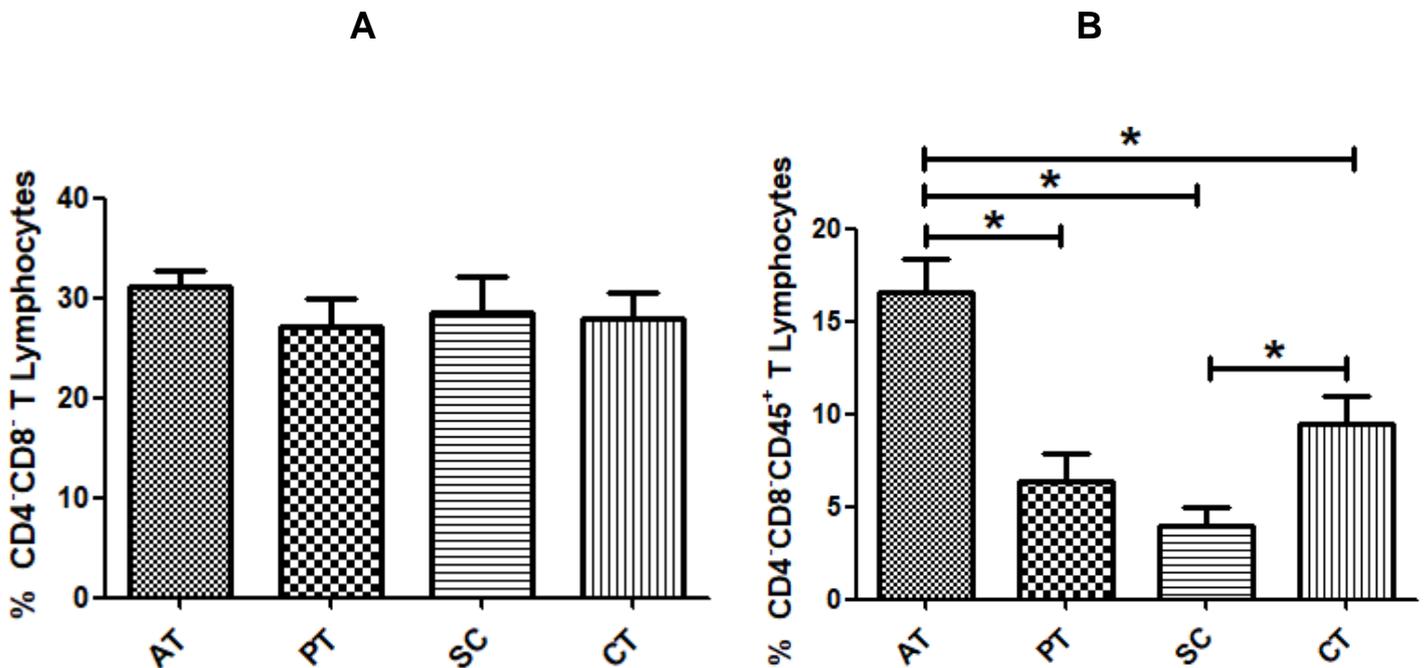


Gráfico 4 – A: Percentual de linfócitos T DN e B: Percentual de ativação dos linfócitos T DN em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT), de pacientes subclínicos (SC) e de controles saudáveis, não portadores da doença, (CT). Os resultados estão expressos como médias ± SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*“.

DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, ligada principalmente a baixa condições socioeconômica [2,3]. O registro do número de indivíduos infectados pelo parasito vem aumentando com o passar dos anos, o que pode ser atribuído não apenas aos avanços no diagnóstico e notificação, mas também ao desmatamento, urbanização, migração e guerras, que provocam modificações ecológicas e conseqüentemente, mudanças no habitat do vetor [17].

Do total de pacientes, 68% eram do sexo masculino. Em uma pesquisa realizada por Torres e colaboradores (2013), cerca de 63% dos participantes da pesquisa também eram do sexo masculino [30]. No Brasil, a LTA acomete ambos os sexos e em todas as faixas etárias, predominando em pacientes acima dos 10 anos de idade e no sexo masculino [4]. Provavelmente, essa grande quantidade de pacientes do sexo masculino, está relacionado com suas atividades ao ar livre (militares/ agricultores) [17]. No nosso estudo, mais da metade dos pacientes eram agricultores/militares, corroborando assim com essa hipótese.

Os resultados exibiram um aumento dos linfócitos T CD4⁺ nos grupos PT e SC quando comparados com o grupo controle. Esses dados corroboram com os achados anteriores do nosso grupo, que ao avaliar PBMCs de pacientes com LTA, observou um aumento destes linfócitos em pacientes após o tratamento com quimioterápico [13]. Nossos dados contribuem com o pressuposto de que estas células são cruciais para o combate da infecção, e conseqüentemente, com o impedimento de que a infecção tenha progressão.

Além disso, as células T CD4⁺ apresentaram-se mais ativadas nos pacientes que estavam com a infecção ativa da doença (grupo AT) e nos pacientes que haviam finalizado o esquema terapêutico e obtido cura clínica (PT) em relação aos subclínicos, sugerindo que estas células contribuem com a proteção da infecção, tendo em vista que, nessa fase se faz necessário uma maior atuação destas células para o combate da infecção. Também nota-se uma regressão de sua ativação em pacientes subclínicos em relação aos controles, sugerindo assim que, uma maior ativação destas células, pode gerar uma resposta desregulada, dando origem às lesões da doença. Clarêncio e colaboradores (2008) avaliaram o percentual de ativação de linfócitos T CD4⁺ em pacientes com leishmaniose visceral, antes e após tratamento, e observaram uma maior ativação no grupo pós-tratamento quando comparado com o grupo antes do tratamento [31]. Tal diferença não foi vista em nossos estudos, mas o mesmo foi feito com uma forma clínica diferente. Mais estudos são necessários para esclarecer o papel da ativação celular na LTA.

Os linfócitos T CD8⁺ vêm sendo associados com imunoproteção [13,32], bem como responsável pelo surgimento de lesões [19,21,33]. Este último está relacionado pela sua atividade produtora de citocinas. Alguns estudos indicam que os linfócitos T CD8⁺ atuam destruindo os macrófagos que estão infectados pela *Leishmania*, evoluindo assim para o controle da infecção [34,35]. Neste estudo, estas células apresentaram-se em maior porcentagem no grupo AT, tendo também, uma maior ativação neste mesmo grupo, quando comparado com os demais grupos estudados. Esses achados nos sugere que estas células estejam atuando de forma citotóxica e estão envolvidas com o surgimento das lesões. Em um estudo realizado por Clarêncio e colaboradores (2008), observou-se uma maior ativação de linfócitos T CD8⁺ em indivíduos sadios quando comparado com o grupo pré-tratamento na LV. Além disso, observaram uma maior ativação destas células no grupo pós-tratamento em relação ao grupo antes-tratamento [31].

Linfócitos duplo-positivos, que carregam em sua superfície marcadores CD4⁺ e CD8⁺, vêm sendo associados com papéis supressores e citotóxicos [36]. Estas células já foram observadas em lesões de esclerose múltipla, onde mostrando ter uma função regulatória e na infecção pelo HIV, o qual apresentava uma alta capacidade proliferativa e efetora [37,38]. No presente estudo, não foi obtida nenhuma significância estatística com relação ao percentual destas células entre os grupos estudados. Entretanto, quanto sua ativação, é notória um aumento destas células no grupo com a infecção ativa (AT) e no grupo que obteve cura clínica (PT) e diminuição da ativação destas células no grupo SC, sugerindo que estas células possam estar relacionadas com o combate da infecção. Entretanto, maiores estudos são necessários para definição precisa do seu papel na LTA.

Os linfócitos duplo-negativos (DN) também têm sido associados com um papel citotóxico. Ferraz e colaboradores (2017) os associaram como umas das principais fontes de atividade citotóxica nas lesões *in situ* na LTA, contribuindo assim para o surgimento de lesões [19]. Postula-se, que essas células são recrutadas para o local da infecção, fazendo com que a quantidade destas células no sangue periférico seja pequena [39]. Gollob e colaboradores (2008) sugere que estas células através da produção de citocinas, desempenham um papel associado com a patogênese, bem como um papel regulador na leishmaniose cutânea [40].

Neste estudo, não houve nenhuma significância estatística quanto ao percentual destas células nos três grupos de pacientes se comparado com o grupo de indivíduos sadios (CT). No entanto, quanto a sua ativação, observamos uma maior ativação destas células no grupo AT, sugerindo que estas células são ativadas quando ainda estão no sangue periférico e são recrutadas para o sítio de infecção, contribuindo com a patogênese da doença. Além disso, observa-se uma diminuição de sua ativação no grupo SC, levantando a hipótese de que estas células possam atuar também no combate a infecção.

Em nosso estudo, observamos que os linfócitos T CD4⁺ parecem estar ligados à proteção nestes pacientes e que os linfócitos T CD8⁺, aparenta ter desempenhado o papel citotóxico nos mesmos, dando origem assim, as lesões da LTA. Também observamos que os linfócitos DP e DN quando ativados, parecem desempenhar um papel dual (patogênese e proteção). Enfatizamos que mais estudos com um número maior de pacientes devem ser realizados, a fim de fazer

uma maior caracterização dessas populações linfocitárias e assim contribuir para novas estratégias terapêuticas e de vacinação.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas da Fiocruz-PE pelo acesso ao citômetro de fluxo. M.K.A.C agradece a bolsa de PIBIC concedida pela UFPE, G.A.C. agradece a bolsa de mestrado concedida pela FACEPE.

REFERÊNCIAS

- 1- Negrão GN, Ferreira MEMC. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. Revista Percurso – NEMO 2014; 6:147-168.
- 2- Kedzierski L, Evans KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. Parasitology 2014; 141:1544-1562.
- 3- Savoia D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. J Infect Dev Ctries 2015; 9:588-596.
- 4- SVS, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. 2017. Acesso em 22 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://vigilancia.saude.mg.gov.br/index.php/download/manual-de-vigilancia-da-leishmaniose-tegumentar/>.
- 5- WHO|Leishmaniasis [Internet]. WHO. Acesso em 15 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- 6- DATASUS, Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Acesso em 15 de maio de 2018. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>.
- 7- Brito MEF, Andrade MS, Mendonça MG, et al. Species diversity of Leishmania (Viannia) parasites circulating in an endemic area for cutaneous leishmaniasis located in the Atlantic rainforest region of northeastern Brazil. Tropical Medicine and International Health 2009; 14: 1278-1286.

- 8- Brito FF, Pinto ACVD, Lamenha ML, et al. Estudo clínico, epidemiológico e imunológico para leishmaniose tegumentar americana em centro de referência em dermatologia. *Hansen Int.* 2015; 40:17-24.
- 9- Al-qadhi BN, Musa IS, Hummadi YMK. A. Comparative immune study on cutaneous leishmaniasis patients with single and multiple sores. *J Parasit Dis* 2015; 39:361-370.
- 10- Tiunan Ts, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases* 2011; 15:525-532.
- 11- Santos-Mateus D, Passero F, Rodrigues A, et al. The Battle between *Leishmania* and the Host Immune System at a Glance. *International Trends in Immunity* 2016; 4:28-34.
- 12- Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015; 74:5-17.
- 13- Brelaz-de-Castro MCA, Almeida AF, Oliveira AP, Assis-Souza M, Rocha LF, Pereira VRA. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology* 2012; 279:180-186.
- 14- Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 2016; 16:581-592.
- 15- Kima PE, Soong L. Interferon gamma in Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* 2013; 4:1-5.
- 16- Soong L, Henard CA, Melby, PC. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. *Semin Immunopathol* 2012; 34:735-751.
- 17- Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections A Practical Review. *Dermatol Clin* 2015; 33:579-593.
- 18- Gumy A, Louis JA, Launois P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. *International Journal for Parasitology* 2004; 34:433-444.
- 19- Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, et al. CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of

cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites & Vectors* 2017; 10:1-12.

20- Santos CS, Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Frontiers in Public Health* 2014; 2:1-6.

21- Campos TM, Costa R, Passos S, Carvalho LP. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; 112:733-740.

22- Novais FO, Scott P. CD8⁺ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol* 2015; 37:251-259.

23- Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 1996; 87:500-512.

24- Iwatani Y, Hidaka Y, Matsuzuka F, Kuma K, Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺ CD8⁺ cells and CD3^{lo}TCR alpha beta lo/-CD4-CD8- cells, in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 93:430-436.

25- Bang K, Lund M, Wu K, Mogensen SC, Thestrup-Pedersen K. CD4⁺ CD8⁺ (thymocyte-like) T lymphocytes present in blood and skin from patients with atopic dermatitis suggest immune dysregulation. *Br J Dermatol* 2001; 144:1140-1147.

26- Suni MA, Ghanekar SA, Houck DW, et al. CD4(+)CD8(dim) T lymphocytes exhibit enhanced cytokine expression, proliferation and cytotoxic activity in response to HCMV and HIV-1 antigens. *Eur J Immunol* 2001; 31:2512-2520.

27- Nascimbeni M, Shin E, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehermann B. Peripheral CD4⁺CD8⁺ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Immunobiology* 2004; 104:478-486.

28- Desfrancois J, Derré L, Corvaisier M, et al. Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alphabeta T cells in human breast pleural effusions. *Int J Cancer* 2009; 125:374-380.

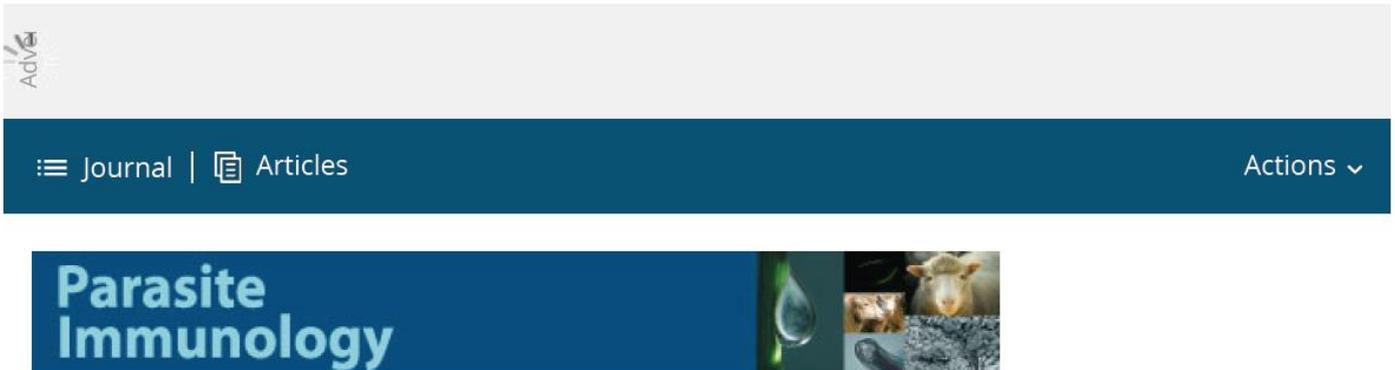
29- Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta⁺ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005; 105:2828-2835.

30- Torres AJT, Angelo ALD, Silva MO, et al. Establishing the reference range for T lymphocytes subpopulations in adults and children from Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 2013; 55:323-328.

31- Clarêncio J, Oliveira CI, Favali C, et al. Could the lower frequency of CD81CD181CD45RO1 lymphocytes be biomarkers of human VL? *International Immunology* 2008; 21:137-144.

- 32- Cunha CF, Ferraz R, Pimentel MIF, et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. *Parasite Immunology* 2016; 38:244-254.
- 33- Santos CS, Boaventura V, Cardoso CR, et al. CD8(+) Granzyme B(+)-mediated tissue injury versus CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2013; 33:1533–40.
- 34- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-Reactive CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Cure of Human Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 1994; 62:2614-2618.
- 35- Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T cell responses. *European Journal of Immunology* 1994; 24:2813-2917.
- 36- Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Weels JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?. *Journal of Leucocyte Biology* 2015; 97:31-38.
- 37- Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, et al. Isolation of Human CD4/CD8 Double-Positive, Graft-Versus-Host Disease-Protective, Minor Histocompatibility Antigen-Specific Regulatory T Cells and of a Novel HLA-DR7-Restricted HY-Specific CD4 Clone. *The Journal of Immunology* 2012 190:184-194.
- 38- Frahm MA, Picking RA, Kurucs JA, et al. CD4+CD8+ T-cells Represent a Significant Portion of the Anti-HIV T-cell Response to Acute HIV Infection. *J Immunol* 2012; 188:4289-4296.
- 39- Antonelli LRV, Dutra WO, Oliveira RR, et al. Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4-CD8-) $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 2006; 74:6317-6323.
- 40- Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, Keesen TSL, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:1338-1343.

ANEXO A – NORMAS DE PUBLICAÇÃO DA REVISTA



Author Guidelines

Contents

- [1. Submission](#)
- [2. Aims and Scope](#)
- [3. Manuscript Categories and Requirements](#)
- [4. Preparing Your Submission](#)
- [5. Editorial Policies and Ethical Considerations](#)
- [6. Author Licensing](#)
- [7. Publication Process After Acceptance](#)
- [8. Post Publication](#)
- [9. Editorial Office Contact Details](#)

1. SUBMISSION

Thank you for your interest in *Parasite Immunology*. Note that submission implies that the content has not been published or submitted for publication elsewhere except as a brief abstract in the proceedings of a scientific meeting or symposium.

Once you have prepared your submission in accordance with the Guidelines, manuscripts should be submitted online at <https://mc.manuscriptcentral.com/pim>

The submission system will prompt you to use an ORCID iD (a unique author identifier) to help distinguish your work from that of other researchers. [Click here](#) to find out more.

Click here for more details on how to use [ScholarOne](#)

For help with submissions, please contact: pimedoffice@wiley.com

We look forward to your submission.

2. AIMS AND SCOPE

Parasite Immunology is an international journal devoted to research on all aspects of parasite immunology in human and animal hosts. Emphasis has been placed on how hosts control parasites, and the immunopathological reactions which take place in the course of parasitic infections. The Journal welcomes original work on all parasites, particularly human parasitology, helminths, protozoa and ectoparasites. The global readership includes research workers, university and college lecturers and clinicians.

Each issue will contain original papers, brief definitive reports and review articles.

Keywords: parasite immunology, bacteriology, cellular immunology, fungal infection, helminthic disease, immunology, immunopathology, parasites, parasitology, protozoan disease.

3. MANUSCRIPT CATEGORIES AND REQUIREMENTS

- **Original Papers** –reports of new research findings or conceptual analyses that make a significant contribution to knowledge (3500 word limit).
- **Reviews** – critical reviews of the literature, including systematic reviews and meta-analyses (5000 word limit).
- **Commissioned Review or Article** – by invitation only
- **Brief Definitive Reports**- preliminary findings of research in progress or a case report of particular interest (1500 word limit).
- **Letters to the Editor**–are welcomed (400 word limit).
- **Meeting Reports**– reports on meetings or parts of meetings concerned with parasite immunology. These reports will be commissioned, but the editors will be pleased to receive reports that might be used

4. PREPARING YOUR SUBMISSION

Parts of the Manuscript

The manuscript should be submitted in separate files: main text file; figures and tables.

Main Text File

The text file should be presented in the following order:

- i. Title
- ii. A short running title of less than 40 characters
- iii. The full names of the authors
- iv. The author's institutional affiliations where the work was carried out, with a footnote for the author's present address if different from where the work was carried out
- v. Acknowledgments
- vi. Abstract and keywords
- vii. Main text
- viii. References
- ix. Tables (each table complete with title and footnotes)
- x. Figure legends
- xi. Appendices (if relevant). Figures and supporting information should be supplied as separate files.

Title

The title should be short and informative, containing major keywords related to the content. The title should not contain abbreviations (see [Wiley's best practice SEO tips](#)).

Authorship

For details on eligibility for author listing, please refer to the journal's Authorship policy outlined in the Editorial Policies and Ethical Considerations section.

Acknowledgments

Contributions from individuals who do not meet the criteria for authorship should be listed, with permission from the contributor, in an Acknowledgments section. Financial and material support should also be mentioned. Thanks to anonymous reviewers are not appropriate.

Conflict of Interest Statement

Authors will be asked to provide a conflict of interest statement during the submission process. See 'Conflict of Interest' section in Editorial Policies and Ethical Considerations for details on what to include in this section. Authors should ensure they liaise with all co-authors to confirm agreement with the final statement.

Abstract

The Abstract should be divided into the following sections 'Aims', 'Methods and results' and 'Conclusion'; it should not exceed 200 words.

Keywords

Please provide seven keywords. Keywords should be taken from those recommended by the US National Library of Medicine's Medical Subject Headings (MeSH) browser list at <https://www.nlm.nih.gov/mesh/>.

Main text Following the abstract, the main section should consist of these sections: Introduction, Materials and Methods, Results, Discussion. Pages should be numbered consecutively in arabic numerals. Please also ensure that the lines in your manuscript are numbered.

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL

Título: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

Pesquisador responsável: Valéria Pereira Hernandes

Instituição de realização do Projeto: CPqAM

Instituições Envolvidas: CPqAM/ FIOCRUZ

Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM: 04/04/2013

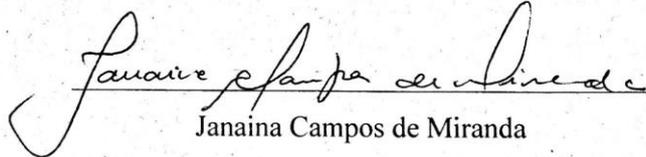
Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM: 30/03/2016

Registro no CAAE: 11083812.7.0000.5190

Prezada Dra., Valéria Pereira Hernandes

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 14 de Junho de 2016, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Res. 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 03 de julho de 2019

Recife, 26 de julho de 2016.



Janaina Campos de Miranda

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Campus da UFPE - Av. Moraes Rego, s/n
50.870-420 Fone: (81) 2101.2639
(81) 3453.1911 | 2101.2639
Recife, PE, Brasil
Site: etn.cepqaam.fiocruz.br


AGGEU
MAGALHÃES


FIOCRUZ
Ministério da Saúde