



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

AILTON ALVARO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO
SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR
AMERICANA NA PRESENÇA DE EPÍTOPOS VACINAIS DERIVADOS DO
PROTEOMA DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*.**

Recife
2020

AILTON ALVARO DA SILVA

AVALIAÇÃO DO PERFIL FENOTÍPICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA NA PRESENÇA DE EPÍTOPOS VACINAIS DERIVADOS DO PROTEOMA DE *LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora: Dr^a. Valéria Pereira Hernandes (IAM/FIOCRUZ)

Coorientadores: Prof. Dr^a. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro (CAV/UFPE) e Prof. Dr. Rafael de Freitas e Silva (UPE)

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Silva, Ailton Alvaro da

Avaliação do perfil fenotípico de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana na presença de epítomos vacinais derivados do proteoma de *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Ailton Alvaro da Silva – 2020.

119 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Valeria Pereira Hernandes

Coorientadores: Maria Carolina Aciolly Brelaz de Castro e Rafael de Freitas e Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biotecnologia. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Vacina 2. Leishmaniose 3. Fenótipos I. Hernandes, Valéria Pereira (orient.) II. Castro, Maria Carolina Aciolly Brelaz de III. Silva, Rafael Freitas e (coorient.) IV. Título

615.372

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020- 271

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ailton Alvaro da Silva

Título: Avaliação do perfil fenotípico de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana na presença de epítomos vacinais derivados do proteoma de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

Dissertação de Mestrado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica. Área de concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Aprovada em: ___ / ___ / ___.

Banca Examinadora

Profa. Dra. Valéria Pereira Hernandes
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta
Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

Dra. Aline Caroline da Silva Santos
Instituto Aggeu Magalhães/FIOCRUZ-PE

Prof. Dr. Eduardo Henrique Gomes Rodrigues
Centro Universtitário da Vitória de Santo Antão - UNIVISA

**DEDICO ESSE TRABALHO A MINHA FAMÍLIA:
MEUS QUERIDOS PAIS E MINHA AMADA
COMPANHEIRA ESTER ALVES.**

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço a Deus pelas bênçãos que não me faltaram ao longo do meu caminho. Agradeço pela saúde que ele proporcionou a mim e a meus queridos e amados familiares e amigos, principalmente nos últimos meses em meio a uma pandemia global. Agradeço pela força e discernimento que ele tem me dado para ir além das adversidades. Sem sua bondade e misericórdia eu não estaria aqui.

Agradeço aos meus pais por tudo que fizeram desde meu nascimento, pois com todas as dificuldades que tiveram, foram capazes de me criar e me apoiaram em minhas decisões, as quais me trouxeram aqui. Aqui na terra foram eles que nunca deixaram me faltar nada do que precisava, e seus esforços me transformaram na pessoa que eu sou. Por isso, serei eternamente grato a eles.

À minha amada e querida companheira Ester Alves da Silva Amorim, agradeço imensamente e de forma especial por tudo que ela contribui em minha vida durante esse período. Entre todos, foi ela quem esteve mais intimamente próxima de todo o processo de mestrado, com a qual dividi alegrias e frustrações. O homem é extremamente sortudo por ter em sua companheira também uma amiga. Por festejar comigo em minhas conquistas, por me acolher e me fortalecer em minhas tristezas, pelos puxões de orelha nos meus vacilos, pelos momentos de discussões sobre ciência que sempre manteve minha mente alerta e me frutificava ideias. Agradeço de todo coração e com todo amor por tudo isso. Que Deus continue abençoando nossa relação e que nos dê muitos anos juntos.

Agradeço à minha orientadora Prof. Dra Valéria Pereira pelo acolhimento, confiança e incentivo. Agradeço aos meus co-orientadores Prof. Dr. Rafael de Freitas e Prof. Dr^a. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro por toda paciência e todos os ensinamentos. Os três foram imprescindíveis para meu desenvolvimento profissional ao longo desses anos e em muito contribuíram em minha jornada como mestrando.

Agradeço a todos meus companheiros, amigos e colegas da imunogenética, pelo bom convívio, por seus ensinamentos, pelas boas conversas e paciência. Em especial agradeço a Dra Beatriz Coutinho de Oliveira e ao Msc. Marton Kaique Cavalcante, companheiros também de experimentos, com os quais dividi várias horas e momentos.

Agradeço a todos meus amigos e colegas de curso, como também aos meus queridos amigos da minha cidade natal e de Recife, por toda a amizade e conforto nas horas difíceis e alegres.

Agradeço à banca examinadora por ter aceitado o convite para avaliação deste trabalho de conclusão de curso.

Ao Instituto de Pesquisas Aggeu Magalhães por toda a infraestrutura oferecida, bem como seus funcionários e demais alunos que contribuíram para a conclusão deste estudo. À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE), pelo apoio financeiro ao projeto para realização desse trabalho.

E a todos que não foram citados aqui, mas que de forma direta ou indireta sempre torceram por mim, e contribuíram para que este momento pudesse se concretizar.

A todos, meu muito obrigado!

RESUMO

As leishmanioses são um conjunto de doenças cujo agente etiológico é um protozoário do gênero *Leishmania*. São amplamente distribuídas nas zonas tropicais do globo, totalizando cerca de 102 países. As manifestações clínicas são divididas em: visceral (LV) e tegumentar (LT), com a LT responsável pela maioria dos casos em todo mundo. No Brasil, é a *Leishmania (Viannia) braziliensis* a principal espécie responsável pela LT. O tratamento da doença possui diversos fatores limitantes e a vacinação é uma promissora alternativa para o combate à doença. Um dos grandes fatores que limitam o desenvolvimento de vacinas é a escassez de antígenos capazes de ativar células e moléculas que estejam relacionados com a proteção da doença. Além disso, grande parte dos estudos se concentra em investigar modelos animais, que nem sempre refletem o que acontece em seres humanos. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi Avaliação do perfil fenotípico de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) na presença de epítomos vacinais derivados do proteoma de *L. (V.) braziliensis*. Para isso, as PBMCs de 7 pacientes e 7 controles foram isoladas e estimuladas com um “pool” dos epítomos peptídicos e, por fim, marcadas com os principais marcadores fenotípicos de células T de memória (T_m) (CD45RA⁺), T Citotóxicas (T CD8⁺) e T auxiliares (T CD4⁺) e analisadas por citometria de fluxo. Os sobrenadantes foram coletados para dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ . A análise estatística foi realizada empregando-se testes não paramétricos. Foi observado um perfil de subpopulações de células CD8⁺ com maior expressão de marcadores T-bet e ROR γ T em pacientes com LTA, quando comparado aos indivíduos saudáveis. A expressão significativa dos marcadores T-bet e ROR γ T também foi observada na população CD4⁺ em pacientes quando comparado a indivíduos saudáveis. Com relação ao perfil de células T de memória, foi observado que na população T CD8⁺ o perfil tende ao de células T de memória central (TCM), enquanto na população T CD4⁺ a tendência direciona para o perfil de T de memória efetora (TEM). Esses últimos resultados demonstram que células T CD4⁺ e T CD8⁺ desempenham diferentes papéis no momento de uma resposta imunológica voltada à memória, de modo que a população T CD4⁺ parece estar voltada a uma resposta mais efetora enquanto que a T CD8⁺ parece ter maior contribuição em uma resposta de memória em longo prazo. Além disso, a expressão de marcadores T-bet e ROR γ T pelas células T CD8⁺, ainda não visto na LTA, sinaliza a necessidade de aprofundamento no estudo do papel dessas subpopulações no desenvolvimento dessa doença. Não foi observada diferença significativa entre amostras sem estímulo para as estimuladas com o “pool” de peptídeos para nenhuma população estudada. Quanto aos resultados de produção de citocinas investigadas, não foi observada produção significativa. Sendo assim, os resultados indicam que, em pacientes com LTA, os perfis TCM e TEM se apresentam em proporções diferentes em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Esses perfis são importantes na investigação de um candidato vacinal para LTA. Esses dados fornecem uma importante contribuição para o conhecimento e combate contra a LTA.

Palavras-chave: Leishmaniose Tegumentar; *L. (V.) braziliensis*; Células T de memória.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a group of diseases whose etiologic agent is a protozoan of the genus *Leishmania*. They are widely distributed in tropical areas of the globe, totaling about 102 countries. The clinical manifestations are divided into: visceral and tegumentary (LT), with LT responsible for most cases worldwide. In Brazil, *Leishmania (Viannia) braziliensis* is the main species responsible for LT. The treatment of the disease has several limiting factors and vaccination is a promising alternative to fight the disease. One of the major factors that limit the development of vaccines is the scarcity of antigens capable of activating cells and molecules that are related to protection against disease. In addition, most of the studies focus on investigating animal models, which do not always reflect what happens in humans. In this context, the objective of this work was to evaluate the phenotypic profile of peripheral blood mononuclear cells of patients with American Cutaneous Leishmaniasis (LTA) in the presence of vaccine epitopes derived from the *Leishmania (Viannia) braziliensis* proteome. For this, the PBMCs of 7 patients and 7 controls were isolated and stimulated with a pool of peptide epitopes and, finally, marked with the main phenotypic markers of memory T cells (T_m) (CD45RA⁻), T Cytotoxic (T CD8⁺) and auxiliary T (CD4⁺ T) and analyzed by flow cytometry. Supernatants were collected to measure cytokines IL-2, IL-4, IL-10 and IFN- γ . Were used and statistical analysis was performed using non-parametric tests. A profile of subpopulations of CD8⁺ cells with greater expression of T-bet and ROR γ T markers was observed in patients with ATL, when compared to healthy individuals. The significant expression of the T-bet and ROR γ T markers was also observed in the CD4⁺ population in patients when compared to healthy individuals. Regarding the profile of memory T cells, it was observed that in the CD8⁺ T population the profile tends to that of central memory T cells (TCM), while in the CD4⁺ T population the trend is towards the effector memory T profile (TEM). These latest results demonstrate that CD4⁺ T and CD8⁺ T cells play different roles at the time of a memory-driven immune response, so that the CD4⁺ T population appears to be focused on a more effective response whereas T CD8⁺ appears to have a greater contribution to a long-term memory response. In addition, the expression of T-bet and ROR γ T markers by CD8⁺ T cells, not yet seen in LTA, signals the need for further study of the role of these subpopulations in the development of this disease. There was no significant difference between samples without stimulus for those stimulated with the peptide pool for any population studied. As for the results of cytokine production investigated, no significant production was observed. Thus, the results indicate that, in patients with LTA, the TCM and TEM profiles are present in different proportions in T CD4⁺ and T CD8⁺ lymphocytes. These profiles are important in the investigation of a vaccine candidate for LTA. These data provide an important contribution to the knowledge and fight against LTA.

Keywords: Cutaneous Leishmaniasis; *L. (V.) braziliensis*; Memory T Cells.

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
APCs	Antigen-presenting cells (células apresentadoras de antígeno)
AT	Antes do tratamento
DCs	Dendritic cells (células dendríticas)
CD	Cluster de diferenciação
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CT	Grupo controle
DAMPs	Damage-associated molecular pattern (padrões moleculares associados a danos)
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
FSC	Forward Scatter (dispersão frontal)
IFN- γ	Interferon-gama
IL-	Interleucina-
LCD	Leishmaniose Cutâneo Difusa
LIBM	Laboratório de Imunoparasitologia e Biologia Molecular
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LT	Leishmaniose Tegumentar
LV	Leishmaniose Visceral
moDCs	Monocyte-derived Dendritic cells (células dendríticas derivadas de monócitos)
NK	Natural Killer (Células exterminadoras naturais)
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> (Tampão fosfato salino)

PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em Cadeia da Polimerase)
PPGIT	Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica
RPMI	Roswell Park Memorial Institute (Instituto Roswell Park Memorial)
SFB	Soro fetal bovino
SSC	Side Scatter (dispersão lateral)
TALE	Termo de Assentimento Livre e Esclarecido
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCM	Central Memory T Cells (célula T de memória central)
TEM	Central Effector memory T Cell (célula T de memória efetora)
Th	Helper T Cell (células T auxiliares)
TNF	Tumor necrosis fator (fator de necrose tumoral)
Treg	Regulatory T Cell (célula Treguladora)
TRM	Tissue-resident memory T cell (célula T de memória residente de tecido)
TR	Termo de Referência
UFPB	Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	Leishmaniose Tegumentar Americana	16
2.2	Aspectos biológicos do parasita.....	18
2.2.1	Ciclo vetor e hospedeiro	18
2.2.2	Manifestações clínicas da LTA	21
2.2.3	Diagnóstico da LTA	25
2.2.4	Tratamento na LTA	26
2.3	Imunologia na Leishmaniose	27
2.3.1	Papel dos linfócitos T auxiliares (CD4+)	33
2.3.2	Papel dos linfócitos T CD8+	35
2.3.4	Papel dos linfócitos T de memória	38
2.5	Vacinação	40
2.5.1	Vacinas de primeira geração	42
2.5.2	Vacinas de segunda geração	44
2.5.3	Vacinas de terceira geração	46
2.5.4	Potenciais antígenos vacinais	48
3	JUSTIFICATIVA	50
4	OBJETIVOS	51
4.1	Geral	51
4.2	Específicos.....	51
5	METODOLOGIA	52
5.1	Aspectos éticos:.....	52

5.2. População de estudo.....	52
5.3 Seleção e preparação de peptídicos de <i>L. (V.) Braziliensis</i> utilizados:.....	52
5.4 Obtenção de células mononucleadas de sangue periférico:.....	53
5.5 Cultivo Celular:.....	53
5.6 Ensaio de citometria de fluxo.....	54
5.6.1 Anticorpos monoclonais utilizados na marcação de citometria:	54
5.6.2 Marcação in vitro de linfócitos T com anticorpos monoclonais:	55
5.6.3 Estratégia de análise na citometria de fluxo:	56
5.7 Análise estatística:.....	57
6 RESULTADOS	59
6.1 Fenotipagem por citometria de fluxo.....	59
6.2 Dosagem de citocinas do sobrenadante de cultura.....	65
7 DISCUSSÃO.....	70
8 CONCLUSÃO	75
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
APÊNDICE A – PARTICIPAÇÃO EM ARTIGO PUBLICADO: IMMUNOGENICITY OF POTENTIAL CD4+ AND CD8+ T CELL EPITOPES DERIVED FROM THE PROTEOME OF <i>LEISHMANIA BRAZILIENSIS</i>.....	93
APÊNDICE B – PUBLICAÇÃO DE CAPITULO DE LIVRO DE EBOOK: AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS COM PEPTÍDEOS RECOMBINANTES <i>DE LEISHMANIA VIANNIA BRAZILIENSIS</i>	94
ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS	111
ANEXO II – TERMO ADITIVO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA COM SERES HUMANOS	112
ANEXO III - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE.....	114

**ANEXO IV - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –
GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS..... 116**

**ANEXO V - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO –
GRUPO CONTROLE..... 118**

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças presentes em cerca de 102 países, e estima-se que há 1,3 mil novos casos de pessoas infectadas por ano (HOTEZ, 2013; WHO, 2016; WHO; AMERICAS/LEISHMANIASIS, 2019). Os protozoários do gênero *Leishmania* são responsáveis por essas doenças, os quais são transmitidos no momento em que fêmeas de flebotomos infectadas realizam repasto sanguíneo (MENDES et al., 2019; MURRAY et al., 2005; SANGIORGI et al., 2012a). Cerca de 20 espécies desse protozoário são responsáveis por causar doenças em humanos, podendo apresentar as manifestações clínicas: visceral (LV) e tegumentar (LT) (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA SAÚDE, 2018). A LT é a forma clínica mais comum de leishmaniose e na América é comumente chamada de Leishmaniose tegumentar americana (LTA). No Brasil, a principal espécie envolvida é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que provoca úlceras de pele em sua maioria em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes ao longo da vida. Vale salientar que a *L. (V.) braziliensis* tem potencial de provocar uma variação da doença chamada de leishmaniose mucocutânea (LMC), que tem como característica uma lesão nasofaríngea extremamente desfigurante (BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017; WHO; AMERICAS/LEISHMANIASIS, 2019).

Em geral, o tratamento para as leishmanioses é realizado através do uso de antimonialis pentavalentes. Essas drogas atuam em vias bioenergéticas da forma intracelular infectiva do parasita (GONTIJO, 2003). Esse tratamento, no entanto, apresenta alta toxicidade e requer diversas doses para atingir a concentração terapêutica efetiva (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Isso pode acarretar desistência do tratamento por parte do paciente e surgimento de cepas resistentes (MEHEUS et al., 2010a; OLIVEIRA et al., 2011). De fato, o controle de vetores e dos reservatórios parecem ser medidas promissoras em áreas endêmicas para a doença. Entretanto, não é uma alternativa aplicável em todos os cenários epidemiológicos, pois necessitam de infraestrutura e vigilância que muitas vezes vão além da realidade de muitos países endêmicos. Essas particularidades do combate à doença sinalizam uma necessidade de empregar outras medidas de controle que

atendam a realidade dos cenários epidemiológicos da LT (COSTA et al., 2011; KEDZIERSKI, 2010).

Dentre as medidas de controles que podem atender todos os cenários nos quais as leishmanioses se inserem, está a vacinação. A vacina tem como papel prevenir a infecção ou o estabelecimento da doença, como também participar de uma estratégia terapêutica (MOAFI et al., 2019). Até o momento, das três vacinas anti-*Leishmania* aprovadas duas são direcionada a humanos, entretanto nenhuma tem um potencial profilático eficaz para prevenir a leishmaniose, sendo apenas empregadas como auxílio para medidas terapêuticas (BORJA-CABRERA et al., 2008; MAYRINK et al., 2006; PARRA et al., 2007). Diante dessa carência, ainda é necessário uma maior investigação de potenciais candidatos a vacinas (SACKS, 2014)

Nas doenças parasitárias, o sistema imune apresenta um grande contribuição para o desenvolvimento ou não do processo patológico, e nas leishmanioses essa relação já vem sendo bem estudada. A depender da resposta imunológica desenvolvida, podem ocorrer desde a prevenção e cura, quanto à evolução do processo patológico (ROSSI; FASEL, 2017). Estudos sugerem que a predominância de linfócitos T CD4⁺ ou T helper (Th)1 (produtor de IL-12 e IFN- γ) está associada com a proteção contra a doença, eliminando o parasita (LOEUILLET et al., 2016; SOLBACH; LASKAY, 2000). Enquanto que a predominância de linfócitos Th2 (produtor de IL-4 e IL-10) está ligada com a progressão da doença e susceptibilidade (BARATTA-MASINI et al., 2007; GOMES-SILVA et al., 2007). O fato anterior se deve a produção de anticorpos, que por sua vez podem não ser tão eficazes no combate ao parasita (COSTA et al., 2011; DE ASSIS SOUZA et al., 2013a).

Da mesma forma, as células T de memória desempenham um papel importante para prevenir não somente a primeira infecção, mas também reinfecção contra o patógeno. Um dos principais papéis das células T de memória durante a reinfecção é produzir as citocinas-chave necessárias para combater o patógeno (SHIN; IWASAKI, 2013). A indução de células T de memória, e uma resposta anti-*Leishmania* mediada por um imunobalanço Th1 / Th2 são esperadas de um imunoterápico ou de uma vacina ideal contra LTA (BERTHOLET et al., 2009; NAGILL; KAUR, 2011).

Reconhecendo que há uma complexidade no desenvolvimento de um antígeno ideal para vacinas e imunoterapias, pesquisa realizada por nosso grupo (Laboratório de imunologia de doenças infecciosas e parasitárias – IMUNODIP/FIOCRUZ-PE) identificou potenciais epítomos vacinais dentro do proteoma predito de *L. (V.) braziliensis* (FREITAS-SILVA et al., 2016). Dando continuidade aos estudos, sobretudo na avaliação do perfil de resposta imunológica de memória, o objetivo descrito avalia o aspecto fenotípico de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com LTA na presença de epítomos vacinais derivados do proteoma de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana

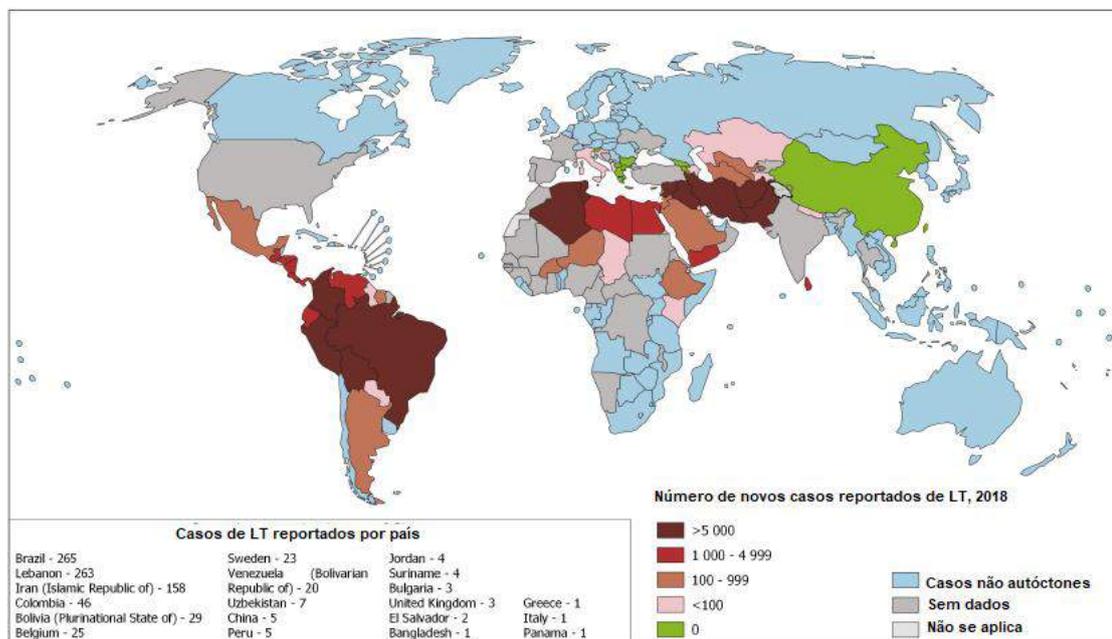
A leishmaniose tegumentar compõe um grupo dentro das doenças tropicais negligenciadas (DTN), representando um complexo de doenças que acometem em torno de 2 milhões de pessoas ao ano em todo o mundo. Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) as leishmanioses são endêmicas em cerca de 102 países (**Figura 1**) (HOTEZ, 2013; WHO, 2016; WHO; AMERICAS/LEISHMANIASIS, 2019). Esse mesmo levantamento apontou que a estimativa de novos casos no mundo é de 22 mil de pessoas infectadas por ano pela forma tegumentar da doença (HOTEZ, 2013; WHO, 2016). Além disso, o número de pessoas residindo em áreas endêmicas, consideradas de risco iminente de transmissão, é de cerca de 1,7 bilhões de indivíduos, o que torna a doença ainda mais preocupante (PIGOTT et al., 2014). Esses dados alertam que pode haver um grande número de casos subnotificados de pessoas acometidas de leishmaniose.

Dentre os países com índice de endemicidade para LT 18 estão localizados nas Américas (WHO/PAHO, 2019), sendo então empregado o termo Leishmaniose tegumentar americana (LTA) para essa doença no continente americano. Em 2017, dentre mais de 22 mil casos novos notificados à OMS, 94% ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (WHO, 2019). Nas Américas, em média, ocorrem 56.000 casos novos de leishmaniose tegumentar e 3.800 casos de LMC por ano (PAHO/WHO, 2017). Em 2017, dos 49.959 casos que foram reportados à Organização Pan-Americana da Saúde, o Brasil deteve 72,6% desses casos de LTA (OPAS/OMS, 2019). No estado de Pernambuco desde 2002 houve um crescente número de notificações, chegando ao total de 4.298 casos registrados oficialmente (DATASUS, 2017).

No Brasil pelo menos 8 espécies são conhecidas como circulantes e com casos notificados da doença em todas as regiões do país, com destaque para a *L. (V.) braziliensis* que é a mais frequente (ANVERSA et al., 2018) (**Tabela 1**). Ainda sim, acredita-se que há um número ainda maior de casos subnotificados da doença,

principalmente por carência de captação e ferramentas no diagnóstico nas décadas passadas.

Figura 1 - Status de endemidade da leishmaniose tegumentar ou cutânea no mundo em 2018.



Fonte: WHO, 2018

Nota: O gradiente de cor ilustra o número de novos casos reportados para LT no ano de 2015. Os tons mais escuros representam números superiores a 5.000 novos casos, vermelho entre 1.000 – 4.999 novos casos, salmão 100 – 999 novos casos, rosa claro número de casos inferiores a 100 e cor branca número de casos igual a zero.

Tabela 1 - Espécies de *Leishmania* que causam LTA e LV no Brasil.

Leishmaniose Tegumentar ou cutânea				Leishmaniose Visceral
Tegumentar Localizada	Tegumentar disseminada	Mucocutânea	Tegumentar Difusa	
<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) infantum</i> (syn. chagasi)
<i>L. (V.) guyanensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (L.) amazonensis</i> *		
<i>L. (L.) amazonensis</i>		<i>L. (L.) guyanensis</i> *		
<i>L. (V.) lainsoni</i> *				
<i>L. (V.) naiffi</i> *				
<i>L. (V.) shawi</i> *				
<i>L. (V.) lindenbergi</i> *				

Fonte: Adaptado de Brito MEF et al. 2012.

Nota: asterisco (*) indicando espécies menos frequentes.

2.2 Aspectos biológicos do parasita

2.2.1 *Ciclo vetor e hospedeiro*

O agente etiológico associado a esse complexo de doenças denominadas “leishmanioses” é um grupo de protozoários que abrange o gênero *Leishmania* (MURRAY et al., 2005; SANGIORGI et al., 2012b; WHO, 2015). De ciclo de vida heteroxênico, esses protozoários são transmitidos de seu vetor, dípteros da subfamília dos flebotomíneos, para seu hospedeiro através da picada de espécimes fêmeas no momento do repasto sanguíneo (MURRAY et al., 2005; SANGIORGI et al., 2012b). Os vetores atuam como hospedeiros intermediários para esses parasitas e não desenvolvem aspectos da doença. Já os demais hospedeiros vertebrados podem atuar como reservatórios (esses podem não desenvolver a doença) ou hospedeiros definitivos que tem alta chance de desenvolver as manifestações clínicas características dessa doença (READY, 2013). Entre esses hospedeiros vertebrados está o grupo que abrange os mamíferos, conseqüentemente o homem. Atualmente cerca de 20 espécies de *Leishmania* potencialmente provocam a doença no homem (CARVALHO et al., 2012).

Os principais vetores de transmissão do parasita no Velho e Novo Mundo, são flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* spp. e *Lutzomyia* spp., respectivamente (KILLICK-KENDRICK, 1999). A *Leishmania* sp. é um parasita que majoritariamente infecta espécies de mamíferos, com algumas poucas espécies infectando lagartos (COUGHLAN et al., 2017; ZHANG et al., 2019). Várias espécies dentro de 7 ordens de mamíferos funcionam como reservatórios naturais para *Leishmania* sp., mantendo seu ciclo de vida nas áreas de mata densa (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; ROQUE; JANSEN, 2014). O homem se torna um hospedeiro acidental devido principalmente as atividades exploratórias em áreas silvestres (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; GONZÁLEZ et al., 2010). As espécies que são reservatórios naturais são importantes, uma vez que provocam um efeito de distribuição da carga parasitária em áreas silvestres. O avanço da urbanização e destruição dessas áreas reduzem as populações dessas espécies que atuam como reservatórios, gerando uma maior concentração do parasita e aumentando o risco para saúde humana (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). O ciclo de vida, que antes era selvático,

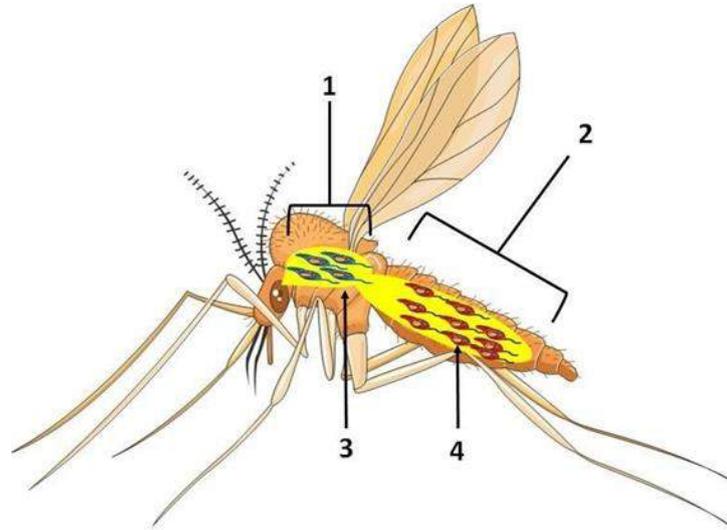
passou a abranger animais domésticos e o próprio homem (BRILHANTE et al., 2016; LARA-SILVA et al., 2015; MORENO et al., 2020).

O ciclo de vida do parasita basicamente consiste em duas fases evolutivas: promastigota e amastigota. As formas promastigotas, são caracterizadas por serem a fase móvel e presente no inseto vetor (**Figura 2**). Esta fase é flagelada, e se inicia dentro do intestino do vetor, ocorrendo proliferação da fase chamada de promastigota procíclica. Posteriormente sofrem alterações morfológicas, se transformando nas promastigotas metacíclicas, que são incapazes de divisão e tem potencial infectivo. Essa segunda fase se aloja nas paredes da válvula estomodeal, e são transmitidas na regurgitação durante a picada do flebotomíneo (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). Durante essa transmissão, os flebotomíneos também eliminam uma gama de moléculas presentes na saliva que possuem efeitos imunomodulatórios, como os proteofosfoglicanos (KAYE; SCOTT, 2011).

Dentro do corpo do hospedeiro, as promastigotas metacíclicas podem ser fagocitadas por uma gama de tipos celulares presentes no microambiente tecidual. Após serem fagocitadas, dentro de vesículas fagocíticas, as promastigotas passam por mais modificações morfológicas e químicas e se transformam em amastigotas aflageladas (**Figura 3**). As formas amastigotas têm a capacidade de proliferação no interior do vacúolo fagocítico e, por consequência, provocam rompimento da célula por conter grande número de parasitas. Essas amastigotas livres têm potencial de infectar novas células circunvizinhas, propagando rapidamente a infecção.

O ciclo se completa a partir da captação de células infectadas por amastigotas, por um flebotomíneo realizando o repasto sanguíneo. Os parasitas então se diferenciam no intestino do inseto, reiniciando o ciclo (**Figura 4**) (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011)

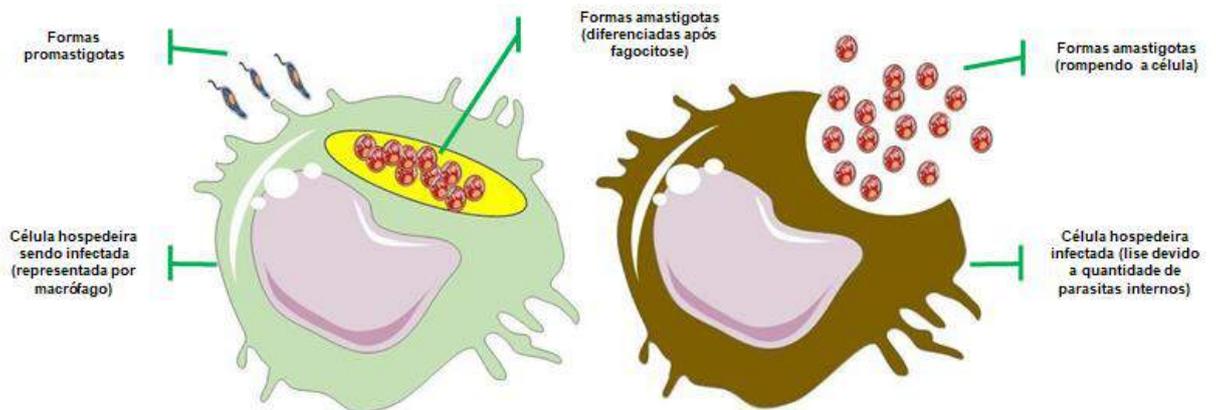
Figura 2 - Formas promastigotas e seus dois sub-estágios no intestino do inseto vetor.



Fonte: o autor, 2019

Nota: As formas promastigotas são encontradas ao longo do trato intestinal do flebotomo, entre elas se subdividem em dois estágios: formas promastigotas metacíclicas (N° 3, em azul) na porção anterior do intestino torácico do vetor (N°1), mais especificamente na válvula estomodeal e as formas promastigotas procíclicas (n° 4, em vermelho) na porção do intestino abdominal do vetor (n°2). Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

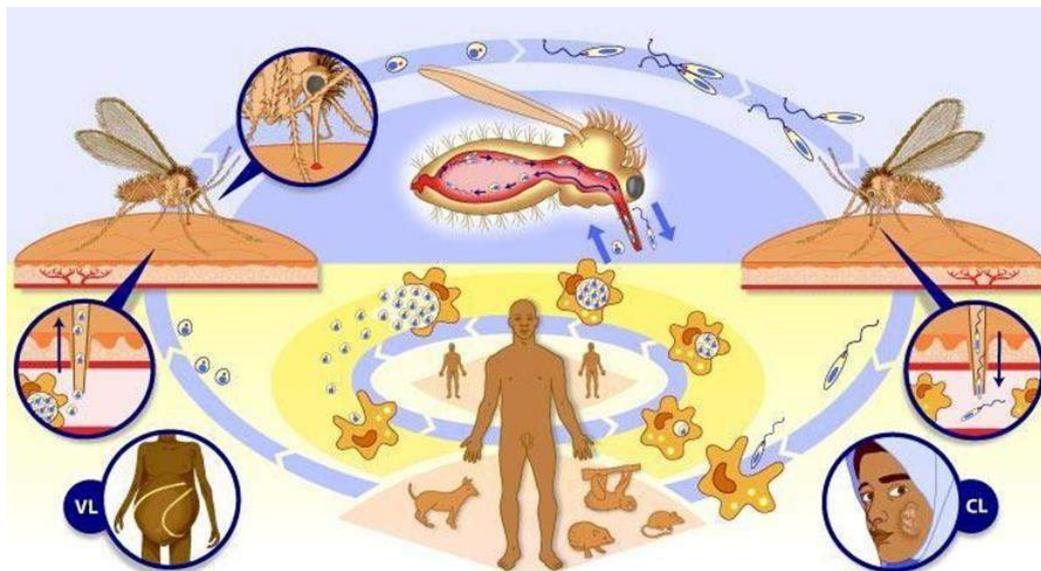
Figura 3 - Infecção de células do hospedeiro por formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* spp.



Fonte: o autor, 2017

Nota: Representação do processo de infecção de células do hospedeiro por parasitas. A esquerda o início da infecção se dá quando as formas promastigotas (em azul) entram em contato com uma célula fagocítica, e após fagocitose se transformam nas formas amastigotas (em vermelho). Após sucessivas divisões do parasita, a célula rompe e extravasa as formas amastigotas que vão infectar novas células. Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

Figura 4 - Ciclo de vida de *Leishmania* spp.



Fonte: WHO / Wellcome Trust, 2007

Nota: Representação do processo global do ciclo de vida das espécies de *Leishmania*, representando o processo de diferenciação das fases evolutivas do parasita (dentro do quadro azul na porção superior da imagem), transmissão e relação com os hospedeiros e reservatórios (dentro do quadro amarelo na porção inferior da imagem). Externamente ao hospedeiro vertebrado, o ciclo se dá quando o vetor aspira as formas amastigotas presentes no sangue. Uma vez dentro do vetor, esse protozoário se modifica para uma forma promastigota. No próximo repasto sanguíneo que esse vetor infectado realizar, ele injeta essas formas promastigotas no hospedeiro vertebrado. Dentro do hospedeiro vertebrado, as formas promastigotas injetadas são captadas por células do sistema imunológico. No interior dessas células imunológicas o parasita retoma a forma amastigota e realiza sucessivas divisões, levando ao rompimento da célula hospedeira. As amastigotas livres no meio infectam outras células vizinhas podendo estabelecer ou não a doença, de modo que a espécie do parasita determina se será uma manifestação cutânea (CL) ou visceral (VL). O ciclo se forma quando um novo vetor passa a aspirar amastigotas do hospedeiro vertebrado infectado, que pode ser desde o homem a outros placentários domésticos ou silvestres.

2.2.2 Manifestações clínicas da LTA

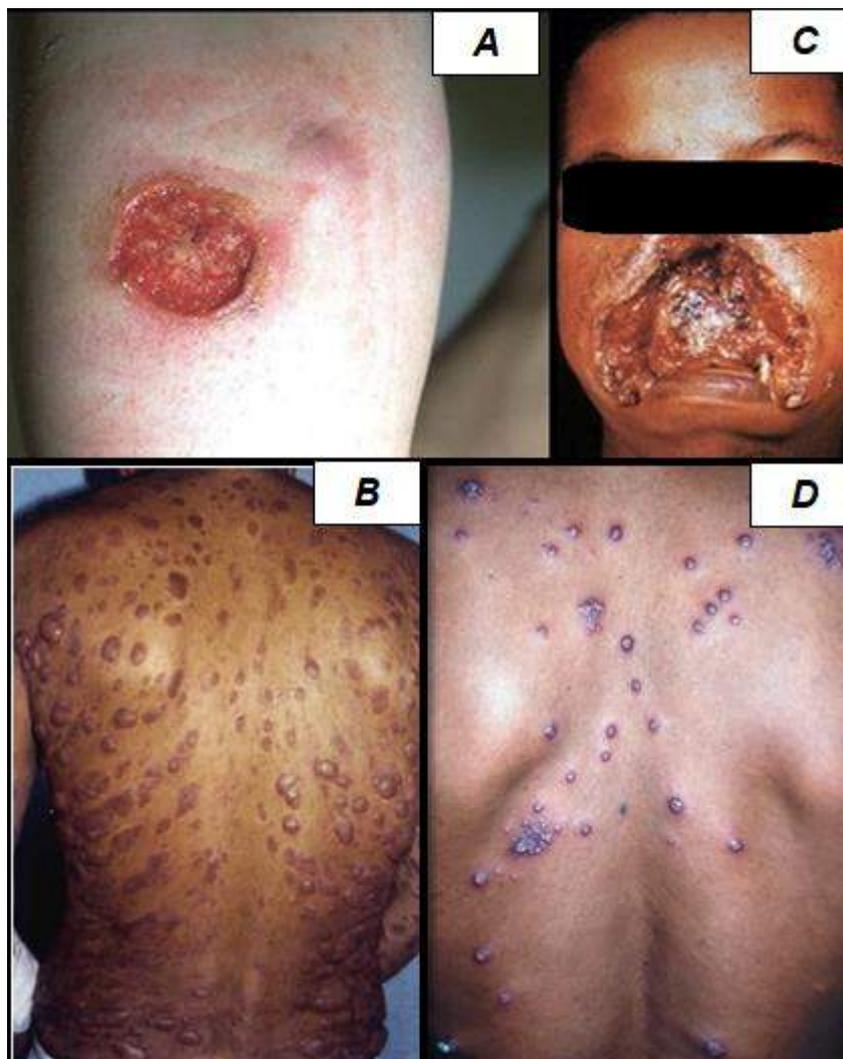
Na LTA geralmente rosto, antebraço e pernas são as áreas acometidas, uma vez que são as áreas do corpo expostas ao vetor transmissor. As lesões podem ser extremamente desfigurantes e induzirem grave quadro de morbidade nas populações afetadas (CARVALHO et al., 2012). Devido à debilidade provocada pela LTA, organismos oportunistas podem se instalar nas lesões existentes, agravando

assim o estado do paciente. Geralmente a letalidade na LTA é associada ao risco de infecções secundárias. O não tratamento da doença pode levar a sua persistência por semanas a meses ou evoluir para cura espontânea em alguns casos (GOLLOB et al., 2008). Além disso, mesmo tratando a doença não significa que houve cura parasitológica, apenas cura clínica (MENDONÇA et al., 2004).

As manifestações clínicas da LTA são diversas, sendo esta uma doença com risco letal baixo (DAVID; CRAFT, 2009). A doença pode acometer pele e mucosas das regiões dos membros e rosto, se manifestando como uma úlcera ou nódulo único próximo (**Figura 5A**) ou na região de picada do flebotomíneo ou infecção subclínica, podendo até se disseminar para áreas diferentes do corpo (GOLLOB et al., 2008). A LTA pode ser dividida em 4 principais apresentações clínicas: Leishmaniose cutânea localizada (LCL); leishmaniose cutânea difusa (LCD); leishmaniose mucocutânea (LMC); e leishmaniose cutânea disseminada (LD).

A LCD ocorre devido a fatores genéticos individuais, *status* imunológico do indivíduo e da espécie do parasita (ROGERS et al., 2002; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004). Na maior parte destes casos a espécie dominante é a *Leishmania amazonensis*, nos quais o indivíduo apresenta lesões nodulares de variados tamanhos em diferentes locais do corpo (**Figura 5B**). Além disso, os casos de LT causados por *L. panamensis* e *L. (V.) braziliensis* podem progredir para uma forma mais agressiva e mutilante da doença, acometendo as mucosas, a leishmaniose mucocutânea (LMC) (DAVID; CRAFT, 2009).

Figura 5 – Diferentes formas clínicas observadas na LTA



Fonte: <http://www.enetmd.com/content/leishmaniasis> (A); ARENAS et al., 2017 (B); <https://fellowshipoftheminds.com/tag/cutaneous-leishmaniasis/> (C); GUSTAVO UZÊDA MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019 (D).

Nota: Principais espectros clínicos da LTA. A = Leishmaniose cutânea localizada (LCL); B = Leishmaniose cutânea difusa (LCD); C = Leishmaniose mucocutânea (LMC); D = Leishmaniose disseminada (LD).

A LMC é uma manifestação clínica que causa grandes desfigurações e impactos psicossociais importantes, além dos danos à saúde (**Figura 5C**). Acomete por meses ou anos após a lesão cutânea persistente, principalmente quando há aumento ou expansão da área acometida pela lesão cutânea inicial, atingindo as mucosas (AMATO et al., 2008). A LMC é resultado da destruição crônica e progressiva de tecidos do nariz, boca, oro e naso-faringe além de pálpebras. A doença pode progredir afetando a função respiratória e dificultar a nutrição do

indivíduo acometido (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A *L. (V.) braziliensis* é a principal causadora da LMC no novo mundo, e os fatores que resultam na patogênese dessa forma clínica ainda não são bem compreendidos, acreditando-se que envolvem fatores do próprio parasita e fatores individuais (DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012).

Majoritariamente, os casos de LMC acontecem em países da América do Sul, com destaque para o Brasil, mas também ocorrendo casos importantes no Peru e Bolívia. Notificações ocorrem também na Colômbia, Equador, Paraguai e Venezuela (CALVOPINA; ARMIJOS; HASHIGUCHI, 2004). Geralmente a doença tem um péssimo prognóstico, e muitos casos são refratários ao tratamento medicamentoso. Desta maneira, infecções secundárias e comorbidades decorrentes e/ou má nutrição levam muitos dos indivíduos acometidos pela doença ao óbito. No Brasil, a incidência desta forma clínica em regiões endêmicas não tem ultrapassado os 5% (BRASIL, 2007; SAVOIA, 2015).

A LD é outro espectro de manifestação clínica da LTA. A espécie mais associada a essa manifestação também é a *L. (V) braziliensis* (GUSTAVO UZÊDA MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019; MEMBRIVE et al., 2017). A apresentação das lesões demonstram vários tipos de lesões cutâneas: erupções acneiformes, pápulas inflamatórias (que podem ser erodidas e crostosas), pequenos nódulos ou/e úlceras (GUSTAVO UZÊDA MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019) (**Figura 5D**). As lesões partem de uma lesão inicial que por sua vez acompanha uma reação sistêmica, que influem febre e mal estar, levando a disseminação das lesões em cerca de 3-6 semanas. As lesões não se restringem a área da lesão inicial, podendo aparecer em membros, tronco e rosto simultaneamente (GUSTAVO UZÊDA MACHADO; PRATES; MACHADO, 2019).

Dada à complexidade envolvendo as manifestações clínicas da doença, o controle das leishmanioses é um esforço conjunto de medidas preventivas. Dentre essas medidas se destacam o diagnóstico precoce, o controle de vetores e a vacinação (COSTA et al., 2011; KEDZIERSKI, 2010). Entretanto, o controle de vetores não é uma realidade possível para grande parte dos países afetados pela

doença, uma vez que requer grande esforço quanto à infraestrutura (COSTA et al., 2011; KEDZIERSKI, 2010). Além disso, no cenário atual não está disponível nenhuma vacina segura e eficaz para humanos contra todas as manifestações da doença, embora muitos grupos de pesquisa ao redor do mundo estejam empenhados no desenvolvimento das mesmas (SACKS, 2014).

2.2.3 Diagnóstico da LTA

Devido à manifestação da doença se assemelhar com outras doenças como hanseníase, câncer de pele, tuberculose, esporotricose, entre outras. A estratégia do diagnóstico é realizada por meio de uma associação de técnicas epidemiológicas, clínicas e principalmente laboratoriais, dessa forma, chegando a um diagnóstico seguro da doença. (BRASIL, 2007; GUREL; TEKIN; UZUN, 2019; VEASEY et al., 2020).

Em grande parte, a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, a cultura celular de amostras clínicas do indivíduo ou a detecção de material genético do parasita, são as técnicas mais utilizadas (GUREL; TEKIN; UZUN, 2019; KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012; VEASEY et al., 2020). Da mesma forma, exames parasitológicos diretos e indiretos também são considerados para o diagnóstico, dentre eles o mais utilizado é a demonstração direta do parasita através de material coletado da lesão e observação das lâminas geradas (BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017). Outra técnica de diagnóstico bastante empregada é a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), que visa detecção do material genético do parasita na amostra (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015). Como técnica auxiliar para diagnóstico da leishmaniose temos a citometria de fluxo (DE ASSIS SOUZA et al., 2013b; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; TEIXEIRA-CARVALHO et al., 2015). A citometria de fluxo se mostrou eficaz em detectar anticorpos anti-*Leishmania* circulantes e monitorar a cura pós-tratamento da LTA, utilizando parasitos vivos e parasitos fixados (ASSIS et al., 2013; DE ASSIS SOUZA et al., 2013b; MENDES et al., 2019; PEDRAL-SAMPAIO et al., 2016; SILVA et al., 2013).

2.2.4 Tratamento na LTA

O tratamento preferencial disponível para todas as formas da doença são dois antimoniais pentavalentes: o antimoniato de meglumina (comercialmente vendido como Glucatime®) e o estibogluconato de sódio (comercialmente vendido como Pentostam®) (**Quadro 1**). Entretanto, no Brasil, apenas a primeira opção é o utilizado (BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017). A aplicação desse medicamento é realizada preferencialmente via intramuscular, tendo como alternativa administração via intravenosa geralmente em pessoas subnutridas e com trombocitopenia. Os antimoniais apresentam custo elevado, requerem repetidas doses para alcançar um resultado satisfatório e estão frequentemente associados com efeitos adversos importantes (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Somado a isso, a própria aplicação envolve dor ao paciente, o que pode levar a sua desistência em continuar o tratamento, uma vez que a aplicação é diária. Em alguns casos recomenda-se a aplicação intralesional, que é menos dolorosa e os efeitos adversos são mais leves em comparação a aplicação convencional (BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017).

Os antimoniais não são específicos para a doença e seus mecanismos de ação ainda não foram elucidados completamente (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). Além do mais, a utilização dos antimonais pentavalentes ao longo de 70 anos trouxe como consequência o surgimento de parasitas resistentes (MEHEUS et al., 2010b; OLIVEIRA et al., 2011). Outro medicamento alternativo que segue disponível é a anfotericina B que, por sua vez, está disponíveis no Brasil em duas formas: desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal; essa última mostrou-se ser menos nefrotóxica quando comparada à primeira forma (BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2017). Levando em conta que os medicamentos disponíveis apresentam uma toxicidade considerável e a aplicação perdura por um período de vários dias, é imperativo que o diagnóstico seja preciso e rápido. Ainda estão claros os mecanismos de vias metabólicas envolvidos na atuação do fármaco para a cura da doença (GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010; REITHINGER et al., 2007; REIS 2007). Vale salientar que há indivíduos com

cura espontânea da LTA, sem que esses tenham sido tratados previamente. Isso evidencia a importância da resposta imunológica, principalmente na terapêutica, no sucesso do combate à doença (BRITO et al., 2001).

Quadro 1 - Tratamento e acompanhamento das formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana.

Druga	Dose	Via	Duração	Monitoramento durante tratamento	Acompanhamento após tratamento
1ª Escolha					
Antimoniato N-metil glucamina	Cutânea localizada ou disseminada: 15mg/kg/dia (10 - 20mg Sb+5/kg/dia) Mucosa: 20mg/Sb+5/kg/dia Difusa: 20mg/Sb+5/kg/dia	Endovenosa ou intramuscular	Cutânea localizada ou disseminada: 20 dias Mucosa: 30 dias Difusa: 20 dias	<50 anos: semanal ≥50 anos: acompanhamento eletrocardiográfico duas vezes por semana. Demais exames semanalmente	Mensal, por 3 meses. Não havendo resposta satisfatória, deve-se utilizar as drogas alternativas
Alternativas					
Desoxicolato de anfotericina B	1mg/kg/dia diariamente ou em dias alternados (dose máxima diária de 50mg) Deve ser administrada até atingir as seguintes doses totais: Forma cutânea: 1 a 1,5g Forma mucosa: 2,5 a 3g	Endovenosa	Doses aplicadas em períodos variáveis; depende da tolerância	Diário	Mensal, por 3 meses
Anfotericina B lipossomal*	1 a 4mg/kg/dia	Endovenosa	Diariamente, até completar 1 a 1,5g de dose total		
Isotionato de pentamidina	4mg/kg/dia, em dias alternados	Endovenosa ou intramuscular	3 a 10 aplicações ^b	Duas vezes por semana	

Fonte: Guia de vigilância em saúde, 2017

Nota: "a" Esta droga está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) para uso no tratamento da leishmaniose visceral (LV), mas não existe registro para uso na leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo considerada uma droga *off label*. O uso *off label* de qualquer medicamento pode ser realizado por conta e risco do médico que o prescreve. A recomendação está baseada em experiências relatadas na literatura que permitem indicar o uso da Anfotericina B lipossomal para LTA, nos casos em que todas as demais opções terapêuticas tenham sido utilizadas sem sucesso ou contraindicadas. **"b"** Três aplicações para pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis* e 10 aplicações para pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* ou *L. (L.) amazonensis*.

2.3 Imunologia na Leishmaniose

O sistema imunológico é um sistema complexo de defesa que desempenha o papel de evitar infecções e evita o estabelecimento de diversas doenças. Da mesma forma, na leishmaniose, a resposta desencadeada por esse sistema é importante para o desenvolvimento ou não da doença através da interação de suas células e moléculas associadas (ROSSI; FASEL, 2017). Essa interação entre o

parasita e o sistema imunológico abre um leque de possibilidades e aplicações, como por exemplo, para diagnóstico e monitoramento da resposta ao tratamento (HARTLEY et al., 2013; KIP et al., 2015).

A resposta imune em humanos pode apresentar um papel que favorece a cura da doença, por meio da indução de células e produção de mediadores que favorecem a destruição do parasita. Além disso, pode também promover um imunobalanco por esses mesmo fatores, contendo assim sua proliferação. Portanto, é fundamental a interação e presença de células como macrófagos, linfócitos T, quimiocinas, citocinas e anticorpos para que exista um controle da doença (BIRNBAUM; CRAFT, 2011; ROSSI; FASEL, 2017; VILLANI; SARKIZOVA; HACOEN, 2018).

O sistema imunológico possui uma grande diversidade das células imunes, exibindo um amplo espectro de fenótipos que são identificados por moléculas que refletem o comportamento e função exercidos pela célula (VILLANI; SARKIZOVA; HACOEN, 2018). O entendimento desses fenótipos imunológicos exibidos durante a infecção direciona e otimiza os estudos acerca do desenvolvimento de moléculas terapêuticas, como também o próprio entendimento da relação do parasita com o organismo do hospedeiro (PAPENFUSS, 2017; ROSSI; FASEL, 2017; VILLANI; SARKIZOVA; HACOEN, 2018).

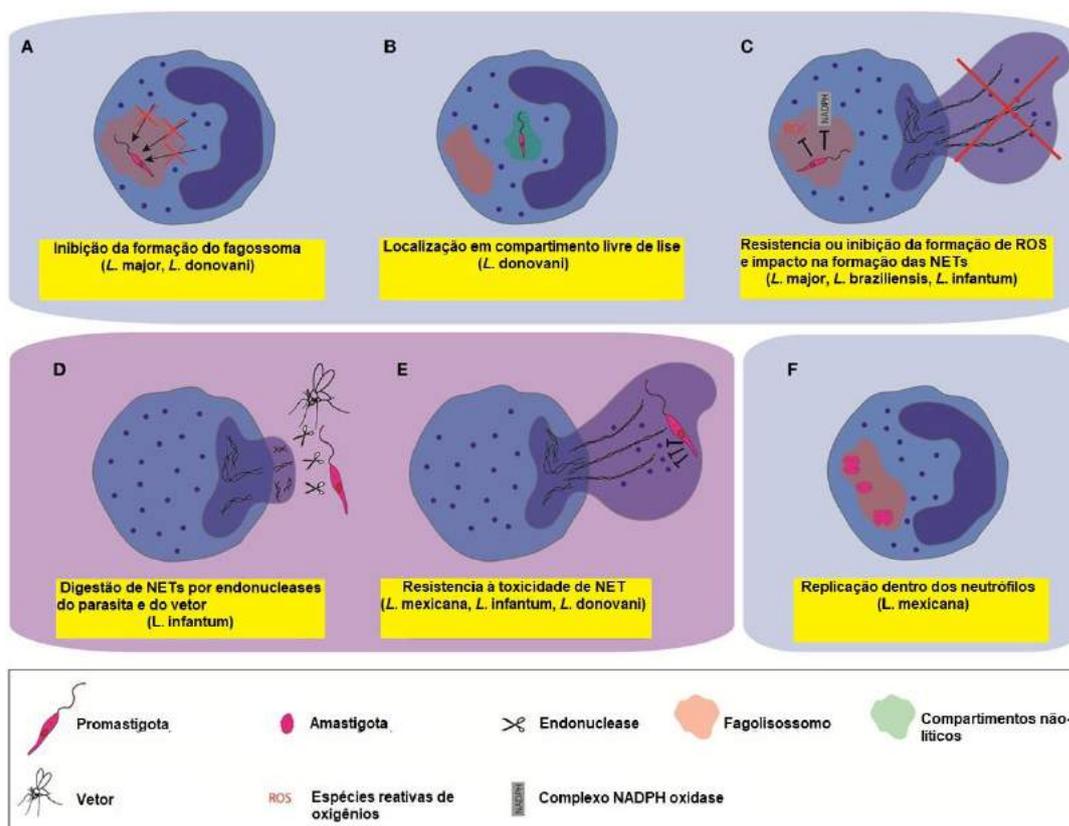
O estabelecimento da infecção é, em grande parte, dependente do primeiro contato dos parasitas com um tipo celular importante, os neutrófilos. Eles são a primeira linha celular de defesa, rapidamente fagocitando os parasitas. Os neutrófilos podem combater o parasita por ação interna, com digestão por meio de moléculas no fagolisossomo, como também externamente por meio de armadilhas extracelulares de neutrófilos (NETs) e extrusão de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BAHRAMI; HARANDI; RAFATI, 2018; REGLI et al., 2017). As NETs são compostas do DNA do próprio neutrófilo associado a proteínas microbicidas que aprisionam o parasita, restringindo sua propagação, e até levando a morte celular (VAN AVONDT; HARTL, 2018).

Entretanto, o microambiente interno do neutrófilo não é capaz de sustentar a sobrevivência do parasita por muito tempo, principalmente devido ao seu pH interno (PETERS et al., 2009). Além disso, há diversos mecanismos de escape que as *Leishmania* spp. podem utilizar para evadir da ação dos neutrófilos (**Figura 6**) (REGLI et al., 2017). Dentre esses mecanismos, o parasita pode prejudicar a formação de fagolisossomos maduros e sua fusão com grânulos de neutrófilos (**Figura 6A**). Também se inserindo em compartimentos celulares que moléculas digestivas não alcançam (**Figura 6B**), além de resistir à toxicidade associada à produção de ROS (**Figura 6C**). Algumas *Leishmania* spp. também pode inibir diretamente (**Figura 6C**) ou indiretamente a formação de NETs (**Figura 6D**), principalmente pela digestão da NETs usando endonucleases derivadas de patógenos e do vetores. Além disso, algumas espécies podem resistir tanto a ação direta das NETs, se envolvendo com de moléculas de superfície resistentes à protease (**Figura 6E**), como também sendo capaz de replicar livremente em neutrófilos (**Figura 6F**) (REGLI et al., 2017). Devido a tudo isso, conseqüentemente, outros tipos celulares são fundamentais para o estabelecimento do parasita no corpo hospedeiro.

Entre os tipos celulares que contribuem para esse estabelecimento, pode-se destacar as células dendríticas (dDCs) dérmicas, também chamadas de células de Langerhan que expressam principalmente CD207 (Langerina, uma lectina tipo-C) (CARVALHO et al., 2016). Essas células também são capazes fagocitar os parasitas nas primeiras horas após a infecção inicial, e podem comportar um grande número deles. Essas dDCs são responsáveis pelo reconhecimento de PAMPs de *Leishmania* spp. na derme, principalmente por receptores tipo toll-2 (TLR-2) e toll 4 (TLR-4) (FEIJÓ et al., 2016; KOMAI-KOMA et al., 2014; VARGAS-INCHAUSTEGUI et al., 2009). Notavelmente, após esse reconhecimento as dDCs atuam apresentando antígeno do parasita, via MHC-II, à linfócitos que vão atuar contra a infecção. A qualidade da apresentação do antígeno pode determinar a eficiência da ativação desses linfócitos, onde envolve também outras moléculas co-estimulatórias como CD40, CD54, CD80 e CD86 (FEIJÓ et al., 2016; SAHA et al., 2006). Essa capacidade de processamento e apresentação de antígeno confere as DCs o título

de principais células apresentadoras de antígenos (APC), principalmente para linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (ROSSI; FASEL, 2017; STEBUT; TENZER, 2017; VILLANI; SARKIZOVA; HACOHEN, 2018).

Figura 6 - Mecanismos de evasão de *Leishmania* spp. em neutrófilos



Fonte: adaptado de Regli et al., 2017

Nota: Estratégias usadas por *Leishmania* spp. para evadir da ação de neutrófilos.

Contudo, o parasita desenvolveu mecanismos que parecem modular ou bloquear a atividade de co-apresentação de antígenos pelas DCs (RIBEIRO-GOMES et al., 2015). Na infecção por *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum* é observado um aumento da expressão de CD86 em DCs, entretanto uma diminuição da expressão de CD209. Essa baixa expressão de CD209 parece facilitar a entrada dos parasitas nas DCs (FALCÃO et al., 2016). Além disso, *L. infantum* parece contribuir para a inibição da apoptose de DCs infectadas, preservando assim a célula hospedeira e facilitando a disseminação para outros órgãos (FALCÃO et al., 2016). Em modelos murinos, *L. amazonensis* é capaz de induzir a produção de

cAMP em DCs, o qual inibi a co-estimulação dessas células (FIGUEIREDO et al., 2017). Também foi demonstrado que *L. amazonensis* é capaz de afetar na maturação de DCs, por acúmulo de cálcio intracelular, de modo a dirigir na diferenciação de linfócitos para um perfil anti-inflamatório (FIGUEIREDO et al., 2017).

Além das DCs dérmicas, decorrendo 24 horas após o início da infecção, outra população celular dominante é a de macrófagos dérmicos, que se tornam potenciais reservatórios para esses parasitas devido à intensa atividade fagocítica (NG et al., 2008). Apesar dos macrófagos também exercerem função de APC, sua principal função é a de fagocitose e eliminação do parasita, caracterizando o perfil clássico de macrófagos do tipo M1. Além da alta atividade fagocítica, as células M1 desempenham funções de produção de ROS e óxido nítrico, liberação de metaloproteinase e secreção de quimiocinas e citocinas que contruibuem no recrutamento celular (ITALIANI et al., 2020; MANTOVANI et al., 2013). Dentre as principais citocinas associadas destacam-se IFN- γ e TNF, principalmente responsáveis pelo recrutamento de células citotóxicas como NK e linfócitos Th1.

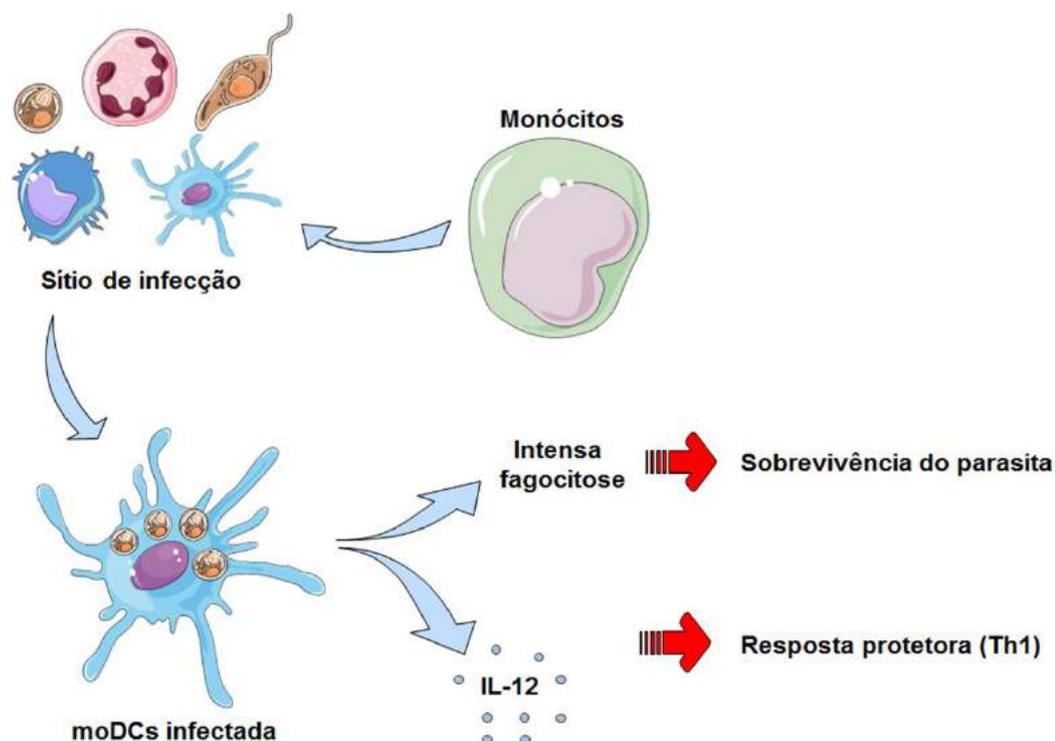
Entretanto, a depender do microambiente algumas citocinas, como IL-4, podem direcionar uma polarização de macrófagos para um perfil alternativo ou desativado, também chamado de M2 (FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016; ITALIANI et al., 2020; MANTOVANI et al., 2013). O perfil M2 é principalmente responsável por inibir a ativação do M1 e células com efeitos inflamatórios. O perfil M2 contribui para preservar o tecido, atenuando a inflamação e reconstruindo o tecido (cicatrização)(FRANKEN; SCHIWON; KURTS, 2016; ITALIANI et al., 2020; MANTOVANI et al., 2013). Na LTA o perfil M2 de macrófagos parece estar associado ao sucesso dos parasitas no desenvolvimento das lesões. A depender da espécie, as células M2 podem se tornar mais permissivas a *Leishmania*, contribuindo para sua propagação (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018). Por outro lado, os macrófagos de perfil M2 fagocitavam menos parasitas quando infectados por cepas associadas à autocura (LEE et al., 2018).

Devido ao baixo número de DCs e macrófagos dérmicos, que não seriam suficientes para acarretar em uma lesão, há uma contribuição maior de outros tipos celulares no sítio de infecção. Possivelmente, há um recrutamento de monócitos que se diferenciam em células dendríticas derivadas de monócitos (moDCs) (CHARMOY et al., 2010; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007). Essa população celular tem o importante aspecto por ter alta capacidade fagocítica. No entanto, essa capacidade favorece o crescimento e a sobrevivência dos parasitas. Em consequência disso, consegue comportar um grande número de parasitas em seu interior, de forma que necessitaria de um grande número de células infectadas para sinalizar o surgimento da doença (**Figura 7**). (DE TREZ et al., 2009; LEÓN; LÓPEZ-BRAVO; ARDAVÍN, 2007).

A imunidade inata é fundamental durante o estabelecimento da doença e no contato inicial com a *Leishmania* sp. Entretanto, outros tipos celulares estão relacionados ao desenvolvimento de uma resposta protetora em longo prazo (ROSSI; FASEL, 2017). Essa resposta tem como intuito prevenir a reinfecção, aspecto importante quando se leva em conta o cenário epidemiológico das leishmanioses (ROSSI; FASEL, 2017). Grande parte dos estudos que relacionam os mecanismos imunológicos nas leishmanioses são baseados em modelo murinos. Esses modelos permitiram a compreensão dos mecanismos da resposta imunológica. De fato, esses estudos vêm elucidando o importante papel das citocinas pró-inflamatórias da via Th1 na resistência e das citocinas da via Th2 associadas à susceptibilidade (DE LUCA; MACEDO, 2016b). Contudo, essas relações imunológica demonstram divergências ao comparar os modelos murinos e os ensaios clínicos com seres humanos (OLIVEIRA et al., 2014).

São observadas quatro principais de células T para esse papel protetor: Células T auxiliares 1 (Th1), células T auxiliares 2 (Th2), células T auxiliares 17 (Th17) e células T reguladoras (Treg) (BETTELLI et al., 2006). Vale salientar que outros tipos celulares são relacionados com o papel protetor. As populações de células T citotóxicas (Tc) também desempenham uma contribuição importante como células efetoras e atuantes na relação parasita-hospedeiro nas leishmanioses (NOVAIS; SCOTT, 2015).

Figura 7- Dinâmica no sítio de infecção por *Leishmania* spp. associando moDCs.



Fonte: o autor, 2017

Nota: No sítio de infecção há uma pluralidade de tipos celulares que interagem com o parasita. O micro ambiente formado proporciona condições para migração de monócitos que por sua vez podem se diferenciar em moDCs, essas que por sua vez podem contribuir tanto para sobrevivência do parasita quanto para uma resposta protetora. Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

2.3.1 Papel dos linfócitos T auxiliares (CD4+)

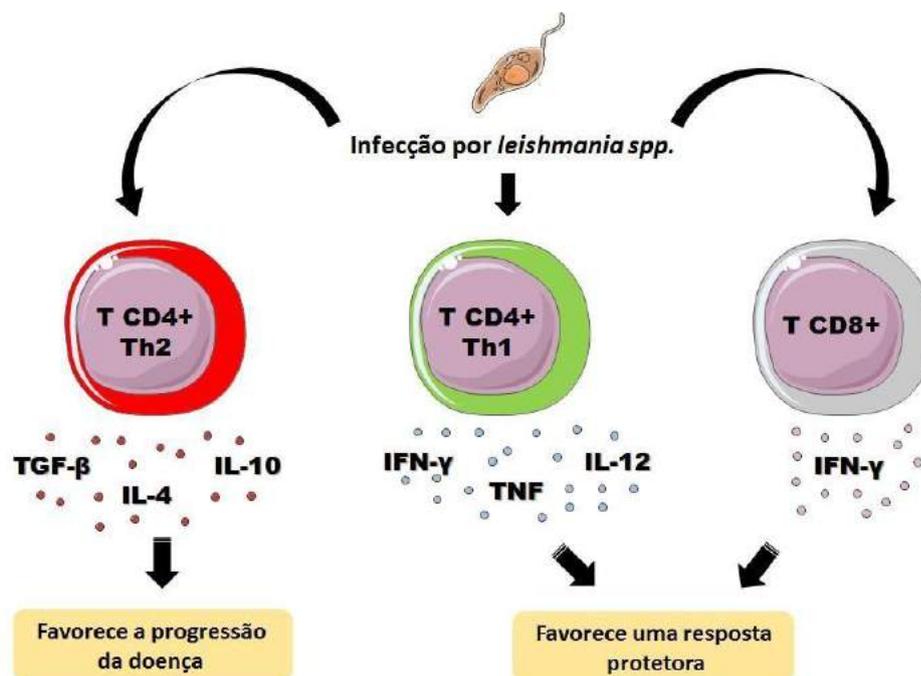
Particularmente nas leishmanioses, os fatores de proteção têm sido relacionados principalmente com a presença de linfócitos T CD4⁺ com o perfil Th1 produzindo IFN- γ , TNF e IL-12 (**Figura 8**). Esses fatores são associados com a ativação de macrófagos e consequente eliminação de parasitas (LOEUILLET et al., 2016; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; ROSSI; FASEL, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Oposto a isso, o perfil Th2 tem sido relacionado com alta carga parasitária, inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos ativado por IFN- γ , esse fato se deve principalmente pelas citocinas IL-4, IL-10, TGF- β desse perfil, levando também a uma inibição da diferenciação de linfócitos, principalmente

por IL-10 (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016; ROSSI; FASEL, 2017). Em camundongos resistentes, na infecção por *L. major* é observado um perfil com poucas lesões acompanhado com uma baixa predominância de parasitas, concomitante a isso um perfil pronunciado de Th1 CD4⁺, destacado pela produção principalmente de citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α , e IL-2 (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014; MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Em humanos, é observado que na evolução para uma lesão mucosa da doença há um perfil de secreção aumentada de TNF e IFN- γ mediada por células T CD4⁺ (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Na forma clássica da LT as várias citocinas, incluindo TNF e IFN- γ , parecem desempenhar papéis que transitam entre ambos os perfis pró e anti-inflamatórios, destacando a complexidade dessa resposta em humanos (ROSSI; FASEL, 2017; SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017). Em linhas gerais, as células Th1 secretoras de citocinas desempenham um papel crucial para cura clínica de pacientes com LT (COUTINHO et al., 1996).

Os linfócitos Th17 são importantes produtores de algumas citocinas, tais como a IL-17, IL-22 e IL-6. Ainda que o papel dessas citocinas na infecção por *Leishmania* spp. não esteja completamente elucidado, resultados de diversos trabalhos demonstraram uma dependência espécie-específica e de fatores do hospedeiro. Mais recentemente, foi observado que a infecção por *L. infantum* induz a produção de IL-17a que, por consequência, é capaz de potencializar a resposta do tipo Th1, também prevenindo expansão de células Treg e linfócitos produtores de IL-10 (NASCIMENTO, 2015). Em modelos murinos foi observado que a IL-17 é um importante mediador da patologia da doença em camundongos C57BL/6 que não expressam IL-10 infectados com *L. major* (GONZALEZ-LOMBANA et al., 2013). Já em camundongos BALB/c susceptíveis a IL-17 também foi envolvida com a progressão da doença após infecção com *L. major* (LOPEZ KOSTKA et al., 2009). Em pacientes foi encontrado para leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* uma associação patológica de IL-17, enquanto que em leishmaniose visceral foi encontrada uma relação de resistência (BACELLAR et al., 2009; NOVAIS; SCOTT, 2015; ROBERTO et al., 2011).

Figura 8 - Perfis de resposta imunológica à infecção por *Leishmania* spp. em modelo murino.



Fonte: o autor, 2017

Nota: Em modelos murinos, observa-se que logo após a infecção por *Leishmania* spp., a resposta imunológica induzida pode favorecer a progressão da doença por meio da indução de um perfil de resposta com linfócitos T CD4⁺ produzindo citocinas como IL-4, IL-10 e TGF-β. Ou, a resposta imunológica pode induzir a proteção contra a doença por meio de um perfil de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ produtores, principalmente, de IFN-γ. Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

2.3.2 Papel dos linfócitos T CD8⁺

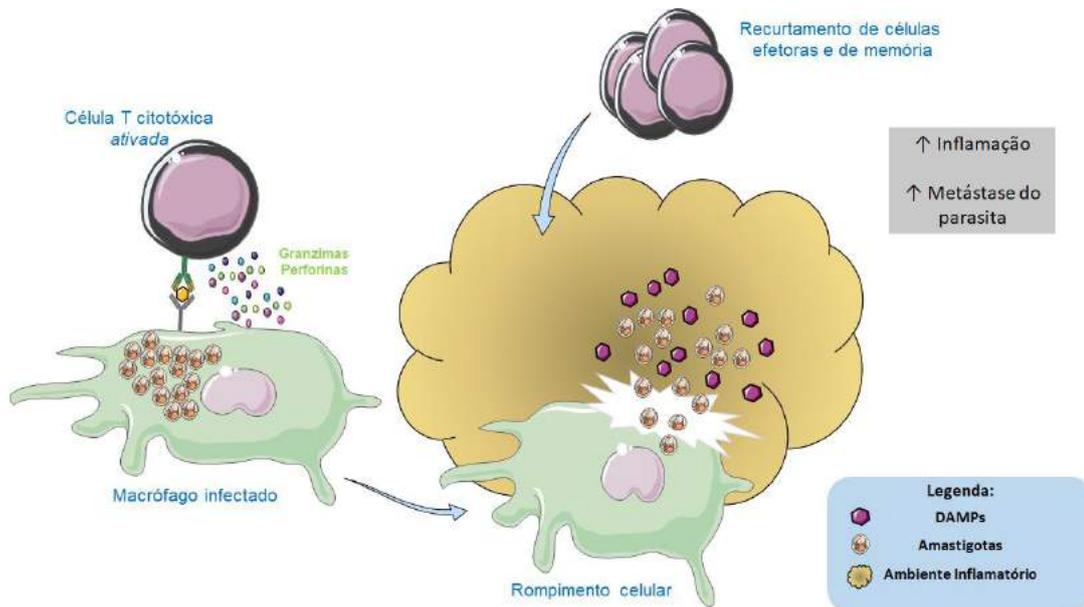
Dentre os conjuntos de células efetoras, os linfócitos T citotóxicos estão entre as células que possuem grande participação na patogênese da LTA (CAMPOS et al., 2017). Esse tipo celular é caracterizado pela expressão de CD8 na sua superfície, sendo um importante produtor de mediadores citotóxicos, como granzimas e perforinas, que provocam a destruição da célula infectada, e conseqüentemente do parasita (BOUSSOFFARA et al., 2019; NOVAIS; SCOTT, 2015).

Apesar de reconhecer a importância dos linfócitos T CD4⁺ Th1 como mecanismo protetor nas leishmanioses, é observado cada vez mais que os linfócitos T CD8⁺ também apresentam um papel protetor importante (**Figura 8**) (DA SILVA

SANTOS; BRODSKYN, 2014; DE OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). Isso é bem observado em camundongos com depleção transitória de linfócitos T CD4⁺ susceptíveis a infecção por *L. major*, onde os linfócitos T CD8⁺ foram essenciais para manter os animais resistentes à infecção (MÜLLER et al., 1991; STÄGER; RAFATI, 2012). Além disso, em pacientes curados para LTA é observado uma maior frequência de célula T CD8⁺, enquanto que uma frequência menor dessas células é observada em pacientes com doença persistente (EGUI et al., 2018). A característica chave da ação de proteção realizada pelos linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ , é principalmente pela capacidade dessas células de alternar a resposta Th2 para a resposta Th1 (UZONNA; JOYCE; SCOTT, 2004).

Entretanto, essas células T CD8⁺ também podem ser associadas com dano tecidual em pacientes com LT (GOLLOB et al., 2008; RIBEIRO et al., 2013). Isso ocorre quando há uma resposta exacerbada de devido a mediadores citotóxicos secretados por essas células que se apresentam altamente concentrados na área da lesão nesses pacientes (NOVAIS; SCOTT, 2015). Todos esse processo é retroalimentado de maneira que, ao levar a lise celular pelo ambiente tóxico, há liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que por sua vez estimulam ainda mais a ação citotóxica das T CD8⁺ (**Figura 9**) (BONILLA et al., 2012; STROWIG et al., 2012). Tem sido observado células T CD8⁺ expressando marcadores intracelulares que antes apenas se conhecia em células T auxiliares, de forma que essas subpopulações desempenham muitas vezes papéis análogos aos que as subpopulações de células T auxiliares desempenham, incluindo na produção de algumas das principais citocinas desses perfis (**Figura 10**) (VALENTINE; HOYER, 2019).

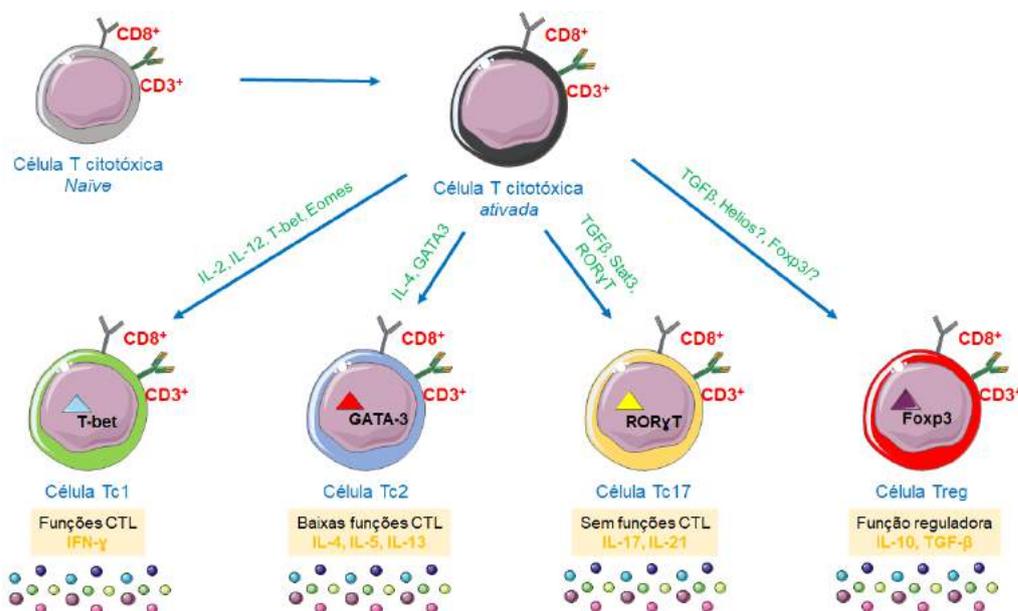
Figura 9 - Representação do ambiente inflamatório e interação com células TCD8+.



Fonte: adaptado de NOVAIS; SCOTT, 2015

Nota: Esquema representativo do ambiente inflamatório na leishmaniose, com foco em macrófagos e células T CD8 citotóxicas. Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

Figura 10 - Subpopulações de células T CD8+.



Fonte: adaptado de VALENTINE; HOYER, 2019.

Nota: Subpopulações de linfócitos T CD8⁺ de acordo com a expressão de fatores de transcrição e principais citocinas produzidas por esses perfis.

Legenda: Tc – células T citotóxica; Tc1 – célula T citotóxica tipo 1; Tc2 – célula citotóxica tipo 2; Tc17

– célula citotóxica tipo 17; Treg – célula T regulatória; CTL – função citotóxica clássica de linfócitos T citotóxicos. Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

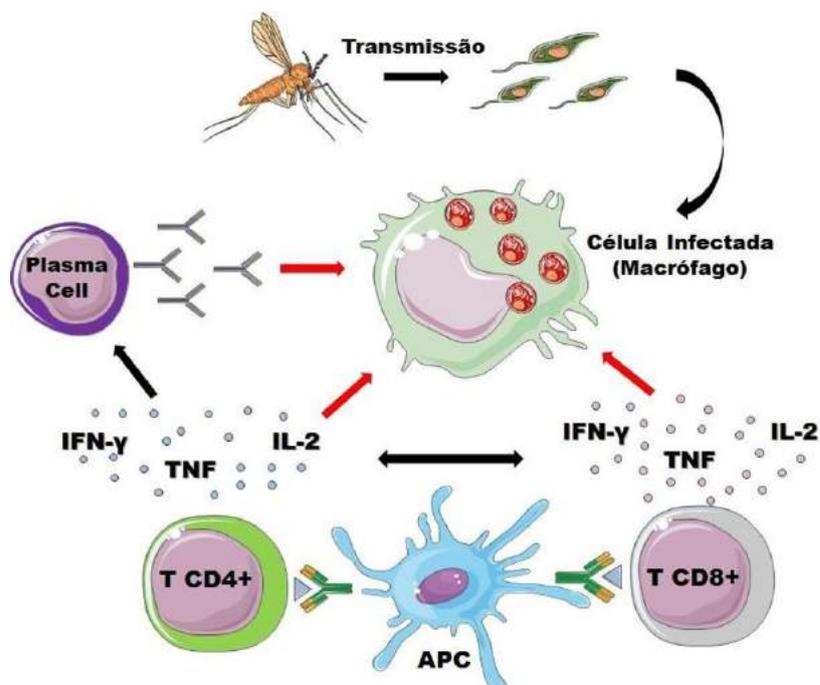
2.3.4 Papel dos linfócitos T de memória

A memória imunológica é quando uma célula T de memória desempenha um papel importante para prevenir a reinfecção contra o patógeno. Esse papel protetor é interessante para a abordagem de vacinas contra *Leishmania* uma vez que gera uma resposta mais rápida e eficaz contra o parasita (DE LUCA; MACEDO, 2016b; SCHROEDER; AEBISCHER, 2011). A população de células T de memória (Tm) é bem heterogênea, tendo três principais subpopulações: células T de memória central (TCM), célula T de memória efetora (TEM) e as células T de memória residente (TRM) (SHIN; IWASAKI, 2013). Diferentes das células T naives (CD45RA⁺), as células Tm são caracterizadas pela expressão do marcador de superfície CD45RO (CD45RO⁺CD45RA⁻) (HOSSEIN KESHAVARZ VALIAN, ET AL, 2012).

As células TCM expressam constitutivamente CCR7 e CD62L e são encontradas em áreas de células T de órgãos linfóides secundários onde são capazes de proliferar e se diferenciar em células efetoras em resposta a estimulação antigênica (SHIN; IWASAKI, 2013). As células TEM reduzem a expressão de CCR7, têm expressão heterogênea de CD62L e são capazes de migrar para tecidos inflamados e têm funções efetoras imediatas (SALLUSTO, 2004; SALLUSTO et al., 1999). Um estudo demonstrou que em modelos murinos infectados com *L. major*, as células T CD4⁺ efetoras são perdidas na ausência de parasitas, já as células T CD4⁺ de memória central são mantidas e posteriormente se diferenciam em células T efetoras para mediar a proteção (ZAPH et al., 2004). O estudo anterior sugere que as células TCM são potenciais alvos de investigação de vacinas contra *Leishmania* spp. Já células TRM expressam CD103 e CD69, onde a expressão de CD103 parece estar relacionado com a morfologia de células dendrítica e a capacidade de serem residentes no tecido (SHIN; IWASAKI, 2013). Recentemente, foi observada a presença de células TRM específicas contra *Leishmania* spp. Elas são capazes de produzir altos níveis IFN- γ e de recrutar células T circulantes na pele, resultando em

um melhor controle dos parasitas, a partir de uma resposta protetora ideal contra o patógeno (GLENNIE et al., 2015).

Figura 11 - Mecanismo de ação desejado para uma vacina em potencial contra *Leishmania* spp.



Fonte: o autor, 2018.

Nota: Esquema representativo das possíveis formas de ação induzidas por uma vacina eficaz e desejada para combate a leishmaniose. A molécula vacinal deve prover uma resposta de combate capaz de ativar DCs eficientes, que irão co-apresentar antígenos do parasita a linfócitos efetores e produtores de citocinas. O microambiente de citocinas poderá provocar recrutamento e maturação de outras células, o que incluem plasmócitos, produtores de anticorpos, e macrófagos ativados capazes de fagocitar e destruir os parasitas durante a infecção. Os componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

De fato, devido à importância e a plasticidade funcional do sistema imune na leishmaniose, ele se torna um objeto favorável de estratégias de combate à doença. Tendo entendimento disso, uma das melhores formas do uso desse sistema é o de estratégias vacinais. Uma estratégia vacinal desejável deve considerar moléculas que sejam capazes de: ativar corretamente APCs, que por sua vez devem apresentar de forma eficiente antígenos do parasita para linfócitos efetores, via MHC I e II; serem capazes de induzir linfócitos T produtores IFN- γ , TNF, IL-2, entre outras citocinas de caráter inflamatório; as citocinas induzidas devem ser suficientes para levar a

ativação de macrófagos e outras células citotóxicas como T CD8+ e NK; induzindo os macrófagos a produzi ROS e RNS, como também induzir produção de moléculas como granzimas, perforinas e Fas/FasL; e induzir células capazes de produzir e secretar anticorpos anti-*Leishmania* (**Figura 11**) (IBORRA et al., 2018). Tais mecanismos combinados da resposta imune seriam capazes de levar a destruição dos parasitas no organismo humano.

2.5 Vacinação

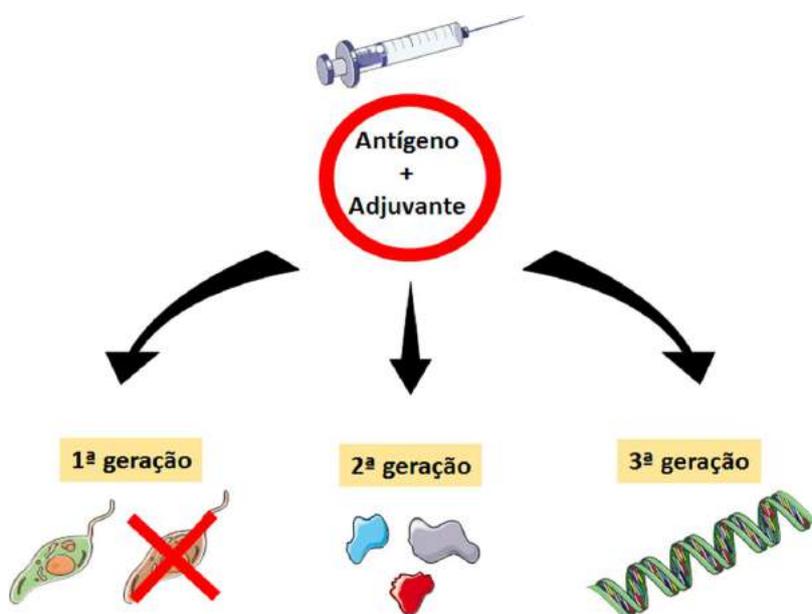
O maior desafio para uma vacina é induzir o desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra um patógeno em específico. A duas vacinas licenciadas atualmente em circulação são voltadas para leishmaniose canina. No Brasil, a Leishmune ® obteve aprovação de uso em áreas endêmicas por ser capaz de proteger cães da LV canina, também sendo usada para diagnósticos em humanos. Essa vacina se baseia em uma molécula presente em todas as fases do parasita, extraída de *L. donovani*, e associada à saponina como adjuvante (MOAFI et al., 2019; SRIVASTAVA et al., 2016; WYLIE et al., 2014). Outra vacina também licenciada, mais uma vez para LV canina, é a LiESP / QA-21 ou CaniLeish ®. De origem francesa e com distribuição para Europa, a CaniLeish ® foi produzida através de proteínas segregadas extraídas de *Leishmania infantum* (LiESP), e usa saponina como adjuvante (STARITA; GAVAZZA; LUBAS, 2016; VIANA et al., 2016). Vale salientar que ambas são voltadas para leishmaniose canina e a manifestação visceral da doença. Essa carência de produtos vacinais direcionados a LTA em humanos ainda gera muitos esforços por parte dos grupos de pesquisas. Alguns candidatos vacinais têm sido investigados, mas ainda se encontram em fase I e II, enquanto os de fase III são voltados principalmente para LV (**Tabela 2**).

De modo geral, uma vacina consiste de dois elementos essenciais: o antígeno e o adjuvante (KOCOURKOVA et al., 2016). Diferentes moléculas estão sendo utilizadas como adjuvantes vacinais, uma vez que são capazes de ativar o sistema imune do indivíduo e permitir uma melhor resposta ao antígeno (AWATE; BABIUK; MUTWIRI, 2013). Dentro os adjuvantes disponíveis, o CpG-ODN destaca-se pelo uso crescente em ensaios experimentais. Essa molécula é formada por sequências

de oligonucleotídeos com domínios citosina-fosfato-guanina não metilados e que são capazes de estimular receptores tipo Toll-9 (TLR-9), importantes receptores de DCs e linfócitos B (GURSEL; GURSEL, 2016; HANAGATA, 2017). O CpG-ODN tem sido usado em alguns estratégias vacinais e terapêuticas contra câncer, justamente por mostrar o potencial na indução IL-12, TNF e IFN- γ por células Th1 (HANAGATA, 2017; IBORRA et al., 2018).

As vacinas são organizadas com base na composição do antígeno principal. Basicamente existem três classes de vacinas: primeira, segunda e terceira geração (**Figura 12**). As bases do antígeno usado nas vacinas de primeira geração podem ser por parasita completo, inativado ou morto, seja por processos físicos e ou químicos. Já as vacinas de segunda geração são compostas por antígenos molecularmente definidos, podendo ser de uma ou mais proteínas, por exemplo. Por fim, as vacinas de terceira geração são a abordagem mais moderna, a qual utiliza de DNA como antígeno vacinal (OSMAN et al., 2017).

Figura 12 - Tipos de vacinas quanto ao tipo de antígeno.



Fonte: o autor, 2019.

Nota: As vacinas são divididas em três tipos de acordo com o antígeno usado como base, de modo que: 1ª geração – parasita vivo atenuado ou morto; 2ª geração – moléculas pequenas do parasita como proteínas, peptídeos ou epítomos; 3ª geração – fragmentos de DNA ou histonas. Os

componentes desta figura foram criados usando modelos modificados da Servier Medical Art, que são licenciados sob uma *Creative Commons Attribution 3.0 Unported License*; <https://smart.servier.com/>

Tabela 2 - Status de vacinas voltadas para LT e LT registradas em ensaios clínicos.

	Classificação	Fase I	Fase II	Fase III	Referência
Leishvaccine	Primeira geração			x	(TEIXEIRA et al., 2011)
ALM ρ	Primeira geração		x		(DE LUCA; MACEDO, 2016a)
Leishmune	Primeira geração			x	(WYLIE et al., 2014)
Canileish	Primeira geração			x	(STARITA; GAVAZZA; LUBAS, 2016)
GALM α	Primeira geração		x		(PROVINCE, 2020)
LEISH-F1	Segunda geração	x			(CHAKRAVARTY et al., 2011)
LEISH-F2	Segunda geração		x		(https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01011309) ultimo acesso em: 20/07/2020
LEISH-F3	Segunda geração	x			(CHRISTIAANSEN et al., 2017)
Leish-Tec	Segunda geração			x	(REGINA-SILVA et al., 2016)
SMT γ + NH μ	Segunda geração	x			(SRIVASTAVA et al., 2016)
ChAd63-KH	Terceira geração		x		(OSMAN et al., 2017)

Fonte: adaptado de MOAFI et al., 2019.

2.5.1 Vacinas de primeira geração

As vacinas de primeira geração estão associadas a um processo chamado de leishmanização (LZ). Esse processo consiste na inoculação de uma cepa viva virulenta ou atenuada para produzir a lesão. No início esse método foi muito utilizado em populações de alto risco, uma vez que se provou ser eficiente em induzir uma

resposta protetora contra exposição subsequente a *Leishmania* spp (GREENBLATT, 1980; HANDMAN, 2001). Todavia, nessa indução que deveria provocar uma lesão que eventualmente levaria a uma cura espontânea, foi relatada “cronificação” das lesões em alguns casos, dificultando o tratamento (GHALIB; MODABBER, 2007; KHATAMI et al., 2007). Essa técnica ficou em desuso por um tempo, mas atualmente alguns grupos voltaram a emprega-la experimentalmente. (AUDREY ROMANO et al., 2016; IBORRA et al., 2018; SALJOUGHIAN; TAHERI; RAFATI, 2014).

Dentre as abordagens que foram e ainda são exploradas, há introdução de cassetes suicidas no genoma de *Leishmania* spp. que inclui genes de sensibilidade à drogas. Alguns exemplos deste último são *L. major* expressando o gene da timidina quinase sensível a ganciclovir do Herpes vírus I (MUYOMBWE et al., 1998) ou o gene da citosina deaminase de *Saccharomyces cerevisiae* sensível ao 5-fluorocitosina (DAVOUDI et al., 2005). Ainda há várias discussões éticas sobre ensaios clínicos em seres humanos com parasitas vivos, ainda que esses parasitas não apresentem alguns genes de virulência ou mesmo apresentem genes de susceptibilidade à drogas (BORJA-CABRERA et al., 2008; REQUENA et al., 2004). Apesar dessa controvérsia, um fator vantajoso do uso desses parasitas geneticamente atenuados é que eles persistem no hospedeiro por um tempo maior. Como consequência, provêm antígenos em quantidade e tempo suficiente para induzir a geração de células específicas de memória imunológica que podem combater uma reinfecção (SELVAPANDIYAN et al., 2012).

Ainda que os novos estudos com vacinas de primeira geração estejam em curso, por diferentes fatores, há uma série de limitações na abordagem desses candidatos. Neste sentido, alternativas ao uso dessas vacinas foram criadas no sentido de obter melhores resultados, como por exemplo, o alvo em genes de virulência em *Leishmania* spp. Nesta categoria são incluídas as vacinas produzidas com organismos geneticamente modificados, *knock-out* de genes de virulência de *Leishmania* spp. (COSTA et al., 2011), tais como dihidrofolato-redutase timidilato sintase (CRUZ; COBURN; BEVERLEY, 1991), cisteíno-proteinase (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; SOUZA et al., 1994) ou transportador de biopterina

(PAPADOPOULOU et al., 2002). O sucesso no uso desses parasitas modificados, é devido ao curto ciclo de vida, que é suficiente para induzir uma resposta imune específica, além de ser capaz de eliminar a infecção e não induzir doença no homem.

Primordialmente, a vacina deve ter componentes seguros para uso em populações humanas, não gerando efeitos colaterais importantes. Nos novos candidatos à vacinas de primeira geração, há supressão ou remoção de alguns genes que afeta a fisiologia do parasita, como também a associação de adjuvantes. Bons exemplos disso são alguns candidatos de cepas de *L. major* com deleção para genes como LPG2, associado ao complexo de Golgi, e HSP70-II que está associado a sobrevivência no hospedeiro vertebrado (MANDELL; BEVERLEY, 2017; SOLANA et al., 2017). Outro candidato interessante é um recombinante de *L. tarentolae*, que infecta naturalmente lagartos, que não desenvolve a doença em humanos. Algumas abordagens demonstraram o potencial dessa cepa *L. tarentolae* de em gerar proteção em modelos murinos infectados com *L. infantum* (KATEBI et al., 2015; PIRDEL; FARAJNIA, 2017).

2.5.2 Vacinas de segunda geração

As vacinas que são baseadas no uso de antígenos recombinantes se mostram uma alternativa promissora, e fornecem bons resultados e esclarecimentos quanto à segurança para uso em humanos e/ou animais. Diante disso, são feitas investigações da imunogenicidade de antígenos em potencial de espécies de *Leishmania*. Os mais promissores foram a proteína 11 de membrana do kinetoplastídeo (AGALLOU; MARGARONI; KARAGOUNI, 2011; CARRILLO et al., 2008; DE MENDONÇA; CYSNE-FINKELSTEIN; MATOS, 2015), esteroil 24-c-metiltransferase (GOTO et al., 2007, 2009) proteína A2 específica do amastigota (GHOSH; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2001), cisteína proteinase B (RAFATI; ZAHEDIFARD; NAZGOUEE, 2006), fator de alongamento e iniciação de *L. (V.) braziliensis* (SKEIKY et al., 1998), K26/HASPB (STÄGER; SMITH; KAYE, 2000), kinase C ativada de *Leishmania* spp. (BENHNINI et al., 2009), antígeno 2 da superfície de promastigota (HANDMAN et al., 1995), nucleosídeo hidrolase (AL-

WABEL et al., 2007; NICO et al., 2014) e glicoproteína expressa de superfície gp63 (CONNELL et al., 1993).

Muitas vezes algumas vacinas são formuladas com base na combinação de uma série de moléculas diferentes, um bom exemplo é a Leish-111F/MPL-SE. Esta vacina consiste na combinação do homólogo de *L. major* do antioxidante tiol-específico de eucarioto, proteína 1 de estresse de *L. major* e fator de iniciação e alongamento de *L. (V) braziliensis*, combinados com o adjuvante MPL-SE. Em modelos murinos de LT e LV, Leish-111F/MPL-SE induziu proteção (COLER et al., 2007; SKEIKY et al., 2002). Entretanto, a vacina foi eficaz apenas para casos leves de LV canina e foi comprometida em cães com doença grave. (GRADONI et al., 2005; TRIGO et al., 2010). A vacina Leish-111F/MPL-SE demonstrou ser segura, imunogênica e reatogênica em voluntários nos EUA e em pacientes de LT e LMC no Brasil e Peru, respectivamente (GHALIB; MODABBER, 2007). A combinação de vacinação com os componentes da Leish-111F, com a proteína de choque térmico 83 (Lbhsp83) e GM-CSF, conjuntamente à quimioterapia, induziu uma melhora clínica na resposta de pacientes e na cura de seis pacientes com LMC (BADARO et al., 2006).

A Leish-111F/MPL-SE, agora chamada de LEISH-F1, atingiu estudos clínicos de fase II, entretanto o IDRI, que é o instituto que originou essa primeira versão, começou a investir em novas versões dessa vacina (MOAFI et al., 2019). A segunda versão, chamada de LEISH-F2, é uma proteína artificial que exclui o marcador N-terminal da histidina, resultando em maior semelhança com as proteínas naturais de espécies selvagens (GILLESPIE et al., 2016). Após a aprovação de segurança e imunogenicidade, a vacina entrou na Fase II de um ensaio clínico, onde foram avaliados seus efeitos terapêuticos em pacientes com CL e comparado à quimioterapia. A LEISH-F2 manteve a associação com o adjuvante MPL-SE como o de sua versão anterior (GILLESPIE et al., 2016). Uma terceira versão, chamada de o.LEISH-F3, é outra vacina multicomponente composta por duas proteínas: nucleosídeo hidrolase (NH), derivadas de *L. donovani*, e esterol 24-c-metiltransferase (SMT), derivadas de *L. infantum* (CHRISTIAANSEN et al., 2017). Dessa vez, essa versão usa nanoemulsão óleo-em-água estável em glicopiranosil

lipídico A (GLA-SE) como adjuvante. O GLA-SE funciona como Ligante TLR-4 (CHRISTIAANSEN et al., 2017), importante receptor para algumas APCs.

Embora existam vários candidatos a antígenos vacinais, vale destacar que a maioria deles são pesquisados há vários anos. Boa parte desses antígenos foram descobertos com metodologias antigas com base na indução de anticorpos. Além disso, muitos desses candidatos foram testados somente em modelos murinos e não mostram resposta em células humanas. Também não se sabe se esses antígenos possuem epitopos que se ligam a MHC I ou MHC II, receptores que participam na apresentação de antígenos para células T. De fato, existe uma necessidade de novos candidatos que tenham sido investigados e selecionados por metodologias mais avançadas. Uma abordagem recente que permite uma escolha mais racional e uma triagem mais segura de possíveis antígenos é o uso de ferramentas de bioinformática (BRITO et al., 2017; FREITAS-SILVA et al., 2016; JOHN; JOHN; KHOLIA, 2012; SEYED; TAHERI; RAFATI, 2016).

2.5.3 Vacinas de terceira geração

A proposta da imunização genética surgiu como uma alternativa interessante, com a finalidade de induzir imunidade específica em hospedeiros. O diferencial observado nesse tipo vacinal é a capacidade de expressão seletiva de genes muito próximos a sua conformação nativa natural, indução de resposta imune celular específica, persistência da expressão do antígeno por um período de tempo, e, por fim, indução de células de memória para proteger contra reinfecção (TANG; DEVIT; JOHNSTON, 1992). Sem dúvidas, a vacinação com DNA tem como importante característica a indução conjunta de linfócitos T CD8+ citotóxicos e T CD4+ auxiliares e a produção de anticorpos (DAS; ALI, 2012).

Para esse fim, há uma procura recorrente por diferentes antígenos capazes de imunização de camundongos para vacina de DNA, como por exemplo, com proteínas ribossomais ou seus genes em formulações. Alguns estudos, como por exemplo, a vacina de DNA pVAX-P1, investigaram a eficácia do gene P1 de *L. donovani* (MASIH; ARORA; VASISHTA, 2011). A associação dessa vacina administrada com reforço, conseguiu imunizar hamsters e proteger contra a infecção

por *L. donovani*, aumentando da expressão de citocinas de resposta Th1 e reduzindo a mortalidade e a carga de parasitas no baço. Ademais, outros estudos demonstraram a contribuição de diferentes vacinas de DNA construídas com genes de histonas (H2A, H2B, H3, H4) na proteção de BALB/c contra a infecção por *L. major* (CARRIÓN, 2011; CARRIÓN; FOLGUEIRA; ALONSO, 2008). Outras pesquisas demonstraram que a vacinação com histonas H3 e H4 reduziram o edema na pata infectada com *L. major*, e a carga de parasitas nos linfonodos popliteais e baço. Esses e outros estudos foram possíveis a partir de análises de bibliotecas de cDNA de *Leishmania* que permitiram a identificação de diferentes antígenos (MELBY et al., 2000).

Atualmente, a vacina de terceira geração mais promissora e avançada para teste em humanos é a ChAd63-KH. Essa molécula é construída baseada em adenovírus símio, que se mostrou importante na indução de células T CD8 +, especificadas para antígenos de *Leishmania* (OSMAN et al., 2017). Esse efeito vem da codificação do gene KH, constituído por dois genes de antígenos de *L. donovani*: KMP-11 e HASPB. Em teste clínicos utilizando essa vacina, foi observada a indução eficientemente da produção de IFN- γ e a ativação de DCs (OSMAN et al., 2017). Até o momento, a ChAd63-KH ainda se encontra em fase II de testes clínicos (IBORRA et al., 2018).

É presumido que a exposição contínua a antígenos seja um passo decisivo para o desenvolvimento de células T de memória (ZINKERNAGEL et al., 1996). Ainda que outros parâmetros se mostram importantes nesta resposta, tais como o tipo de células que são ativadas e o nível e duração da estimulação (ZAPH et al., 2004). Há limitações em vacinas com parasitas mortos, principalmente devidos sua ineficácia em manter células de memória. Porém esse fato parece ser resolvido administrando repetidas injeções de parasitas mortos, resultando assim na expansão de populações de células de memória que por consequência confere em proteção contra o desafio com vírus (OKWOR; KURIAKOSE; UZONNA, 2010).

2.5.4 Potenciais antígenos vacinais

A espécie *L. (V.) braziliensis* é relatada como sendo uma das principais espécies responsáveis pelos casos endêmicos de leishmaniose tegumentar e mucocutânea no Brasil. Entretanto, grande parte dos trabalhos se concentram no uso de antígenos de outras espécies como *L. major*, *L. amazonensis* ou *L. donovani* (NANDA, 2009; SCHWARZ et al., 2013). De certo modo é demonstrado que os antígenos de *L. (V.) braziliensis* possuem grande potencial na indução de uma resposta imune celular em linfócitos de indivíduos com doença ativa, após o tratamento medicamentoso ou curado espontaneamente (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012a; BRELAZ et al., 2012). Além disso, foi identificado que células de pacientes após o tratamento secretam altos níveis de IFN- γ e TNF quando estimuladas com frações antigênicas de *L. (V.) braziliensis* (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012b; BRELAZ et al., 2012; DE ASSIS SOUZA et al., 2013b). Em contrapartida, as frações antigênicas possuem grande quantidade de moléculas do parasita e não são ideais para serem utilizadas como abordagem vacinal, devido ao tamanho da molécula e a possibilidade de reações cruzadas. Assim, o ideal é a busca de moléculas únicas ou uma combinação que seja capaz de estimular uma resposta protetora e de memória.

Diante da complexidade de encontrar um antígeno ideal, um trabalho realizado por nosso grupo utilizou uma combinação de métodos *in silico*, visando identificar epítomos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no proteoma predito de *L. (V.) braziliensis* (FREITAS-SILVA et al., 2016). Vale salientar que a abordagem por bioinformática é recente na busca de potenciais candidatos a vacinas para leishmaniose, o que difere esses epítomos de outros candidatos citados ao longo dessa revisão. Os resultados indicaram que os epítomos foram capazes de gerar uma proliferação linfocitária, sugerindo que essas moléculas possam ter um potencial de induzir uma resposta protetora contra LTA. Em paralelo, avaliamos a imunogenicidade de células T CD4⁺ e T CD8⁺ de PBMC de paciente estimulados com esses mesmos peptídeos. Os resultados sugeriram a imunogenicidade desses peptídeos uma vez que, além do ter potencial de proliferação de células T humanas,

sinalizaram a produção de algumas citocinas como IFN- γ , TNF, IL-6 e IL-17, enquanto uma baixa produção de citocinas como IL-4 e IL-10 (E SILVA et al., 2020).

Com esses resultados, demos continuidade neste trabalho ao investigar os peptídeos quanto a sua capacidade de induzir subpopulações das células T. O foco foi o estudo do perfil das subpopulações de células T auxiliares, citotóxicas e de memória, em pacientes com LTA após estímulo *in vitro* com os peptídeos. Além disso, investigamos os mesmos quanto a expressão das principais citocinas (TNF, IFN- γ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17a) que atuam nos perfis Th1/Th2 e Th17. Assim, com a identificação dos padrões dos perfis celulares induzido por esses peptídios, avançar em seu estudo para as futuras abordagem vacinais na LTA.

3 JUSTIFICATIVA

A LTA ainda constitui um sério problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais. O tratamento atual enfrenta limitações causadas pela elevada toxicidade, alto custo, muitas vezes com necessidade de internamento e a crescente resistência de cepas do parasita. Considerando esse fato e a importante relação entre a resposta imune e o desenvolvimento da doença, faz-se necessário medidas alternativas no combate a mesma. Ainda que a vacinação apresente potencial para prevenção de infecções e reinfecções, não há vacinas seguras e eficazes em circulação para humanos que contemplem o cenário epidemiológico da LTA. Neste contexto, o objetivo desse trabalho foi Avaliação do perfil fenotípico de PBMCs de pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana na presença de epítopos vacinais derivados do proteoma de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A hipótese foi que essas moléculas eram capazes de estimular fenótipos celulares envolvidos com a resistência e a imunorregulação na LTA. Os padrões de células T de memória apresentados, juntamente com o perfil de células T auxiliares e citotóxicas, sugerem o potencial desses peptídeos como promissores candidatos vacinais para LTA.

4 OBJETIVOS

4.1 Geral

Avaliar a indução imunofenotípica de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) de pacientes com LTA gerada por epítopos derivados do proteoma de *L. (V.) braziliensis*.

4.2 Específicos

- Avaliação do perfil de linfócitos T auxiliares e T de memória *in vitro* em PBMC de pacientes após estímulo com epítopos peptídicos de *L. (V.) braziliensis*;
- Quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ nos sobrenadantes de cultura dessas PBMC após o estímulo com epítopos peptídicos de *L. (V.) braziliensis*;

5 METODOLOGIA

5.1 Aspectos éticos:

O presente trabalho está inserido em um projeto que foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ) (CAAE: 11083812.7.0000.5190). Todos os indivíduos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexo III-V).

5.2. População de estudo

Para a captação de amostras neste trabalho, foi utilizado o método de conveniência ou disponibilidade através da busca ativa. As amostras de pacientes com LTA foram coletadas em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmanioses (SRL) do Instituto Aggeu Magalhães (FIOCRUZ/PE). Foram selecionados sete pacientes para o presente trabalho com confirmação laboratorial pelo SRL. O **Quadro 2** descreve os aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes avaliados. Foram utilizados como controle sete indivíduos saudáveis residentes de área não endêmica para leishmaniose e sem histórico da doença.

5.3 Seleção e preparação de peptídeos de *L. (v.) Braziliensis* utilizados:

Os epítopos peptídicos que foram utilizados neste projeto são moléculas correspondentes aos 10 melhores peptídeos classificados, descritos em trabalho anterior (Freitas-Silva et al., 2016) e foram sintetizados comercialmente (Genome Biotechnology, Brasil). Resumidamente, foi utilizado *TriTrypDB* para recuperar o proteoma previsto de *Leishmania* spp., posteriormente as sequências de proteoma previstas foram analisadas por diferentes métodos *in silico*. O banco de dados de relações do *EpitopeDB* foi criado e gerenciado usando o *MySQL* como sistema de gerenciamento de banco de dados. Analisadores e algoritmos nas linguagens PERL e SQL foram desenvolvidos para acessar e integrar os resultados, e por fim, os dados foram agrupados e posteriormente utilizados para modelagem molecular. Para o ranqueamento das moléculas finais foi considerado quanto a afinidade entre essas moléculas e MHC classe I e II e receptores de células T CD4⁺ e CD8⁺. A

validação dessas moléculas foi a partir de cultura de PBMC humano, de grupo controle e pacientes antes do tratamento, através de ensaio de proliferação celular (Freitas-Silva et al., 2016).

Quadro 2 - Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais dos pacientes

Procedência	Sexo/ Idade	Ocupação	Características da lesão						
			Forma clínica	No. de Lesões	Diâmetro da Lesão cm ²	Tempo Evolução	Localização da lesão	PD	PCR
Paciente 1 Tabuleiro de Manjop- Cruz de Rebouças- Igarassu - PE	M- 30	Jardineiro	Úlcero- crotosa	02	2x2 1,0x0,5	4 meses	Braços D e E	+	+
Paciente 2 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	M-58	Motorista Aposentado	Úlcero- crotosa	01	3x3	2 meses	Pescoço	+	+
Paciente 3 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	F-12	Estudante	Ulcerada	01	1,5x1,5	3 semanas	Perna E	+	+
Paciente 4 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	F-54	Do Lar	Ulcerada	03	3x3 1,5x1,5 1,5x1,0	3 meses	Perna E	+	+
Paciente 5 Sítio Caetés – Igarassu - PE	F-20	Do Lar	Ulcerada	01	1,5x1,5	1 mês e 15 dias	Antebraço E	NR	+
Paciente 6 Sítio Tambor- Três Ladeiras - PE	F-70	Agricultora Aposentada	Ulcerada	01	1,0x0,5	1 mês	Dedo do pé D	-	+
Paciente 7 Vila Jarapiã-Três Ladeiras - PE	F-29	Do Lar	Ulcerada	01	0,5x0,5	1 mês	Dedo do Pé E	-	+

Nota: M – Masculino. F- Feminino. D – Direito. E – Esquerdo. PD – Pesquisa direta. PCR – Reação em Cadeia de Polimerase. NR – Não Realizado.

5.4 Obtenção de células mononucleadas de sangue periférico:

O sangue coletado foi diluído a 1:1 (v/v) com meio do Instituto Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (pH 7,2); depositado na solução gradiente Ficoll-paque PLUS (GE) e centrifugado por 35 min a 400 x g. Em seguida, foi isolada a camada de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) e as células foram lavadas duas vezes com RPMI 1640 (pH 7,2) por centrifugação a 300 x g durante 10 min. As células foram ressuspensas em RPMI 1640 contendo 2 mM de L-glutamina, 50 mg/L de sulfato de gentamicina, suplementado com 10% de soro bovino fetal (ambos os reagentes Cultilab, Brasil).

5.5 Cultivo Celular:

As células ressuspensas (conforme item 5.4) foram contadas e a sua concentração ajustada para 10^6 células/mL antes da cultura. 2×10^5 PBMCs foram depositadas em placas de 96 poços de fundo em U (BD Falcon, USA) e foram estimuladas individualmente com 15 $\mu\text{g/mL}$ de um pool formado por 10 peptídeos originados do trabalho de Freitas-Silva et al., 2016. Foram realizadas triplicatas para o “pool” testado. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂ por 24h, 48h e 72h, para dosagem de sobrenadante, e 72h para marcação com anticorpos (**ver item 5.6.2**). Depois deste período, as placas foram centrifugadas por 10 min a 400 x g e o sobrenadante foi coletado e estocado a -80°C para quantificação das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ pelo método de ELISA (kit Invitrogen – Thermo Fischer Scientific) seguindo as instruções do fabricante. A leitura das absorbâncias foi feita em leitora de placa Multiskan (Thermo Fischer) utilizando o filtro de 450nm.

5.6 Ensaio de citometria de fluxo

5.6.1 Anticorpos monoclonais utilizados na marcação de citometria:

Os anticorpos monoclonais usados nesse estudo foram provenientes do fabricante Becton Dickinson (BD) e estão descritos na tabela 3.

Tabela 3 - Marcadores distribuídos quanto aos seus respectivos painéis e fluoróforos

ANTICORPOS MONOCLONAIS USADOS		
Marcador	Fluocromo	Clone
Anti-CD3	APC-Cy7	SK7
Anti-CD4	FITC	SK3
Anti-CD8	APC	RPA-T8
Anti-CD45RA	PE-Cy7	HI100
Anti-CD62L	PE	TWAJ
Anti-TBET	PECF594	04-46
Anti-ROR γ T	BV421	Q21-559

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

5.6.2 Marcação *in vitro* de linfócitos T com anticorpos monoclonais:

Para determinação das populações de células T CD4⁺, CD8⁺, reguladoras, de memória e seus subtipos, após cultura, as células foram suspensas em PBS-Wash e marcadas com os anticorpos de superfície anti-CD3, CD4, CD8 e CD45RA, (ver tabelas 3 e 4) e por 1h a 4°C. Em seguida as células foram processadas com base no protocolo do “Transcription Factor Buffer Set” da BD Pharmigen (San Diego, CA) e marcadas com os anticorpos intracelulares anti- Tbet e ROR γ T (30 minutos, TA, ao abrigo da luz). Depois disso, as células foram lavadas 2x com tampão do kit, por fim, resuspensas em paraformaldeído para realização da leitura em citometro de fluxo. Foram adquiridos 100 mil eventos por amostra em citômetro de fluxo (FACSARIA III- BD Bioscience) usando o software “DiVa” (BD Bioscience) para aquisição dos dados e para análise o software FlowJo 10.1 (©Tree Star Inc.). Os marcadores estudados e seus fenótipos estão descritos nas **tabelas 3 e 4**.

Tabela 4 - Relação entre os fenótipos estudados e os marcadores atribuídos a cada fenótipo de células T.

Resumo dos fenótipos celulares investigados			
Fenótipo celular	Marcadores condicionais para o fenótipo	Fenótipo celular	Marcadores condicionais para o fenótipo
Linfócitos T	CD3+	Linfócitos Th1	CD4+ TBET+
Linfócitos Th	CD3+ CD4+	Linfócitos Th17	CD4+ ROR γ T+
Linfócitos T citotóxicos	CD3+ CD8+	Linfócitos TEM	CD45RA- CD62L-
Linfócitos T naive	CD45RA+	Linfócitos TCM	CD45RA- CD62L+
Linfócitos Tm	CD45RA-		

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Nota: Linfócito Th – Linfócito T auxiliar; Linfócito Th1 – Linfócito Th tipo 1;; Linfócito Th17 – Linfócito Th tipo 17; Linfócito Treg – Linfócito Tregulador; Linfócito Tm – Linfócito T de memória; Linfócito TEM – Linfócito T de memória efetor; Linfócito TCM – Linfócito T de memória central;

5.6.3 Estratégia de análise na citometria de fluxo:

Para discriminação das diferentes populações de linfócitos estudadas neste trabalho, foi aplicado o seguinte racional: 1- as células foram delimitadas como linfócitos de acordo com seu padrão de tamanho e granulosidade característicos (Figura 13A), sendo criado um “gate” (região) para isolar essa população; 2 – Desse “gate” foi realizada a separação das “singlets” (singles cells/evento único) de possíveis “doublets” (aglomerado de células) também observando o padrão de tamanho e granulosidade característicos (Figura 13 B e C); 3 – Dos “singlets” foi determinada a população de linfócitos T a partir da expressão positiva de CD3 (Figura 13 D); 4 – Da população de linfócitos T foram determinadas as populações de linfócitos T CD4 (Figura 13 E) e de linfócitos T CD8 (Figura 13 F); 5 – Separadamente, de ambas as populações de linfócitos T CD4 e T CD8, foi delimitada a população negativa para expressão de CD45RA (Figura 13 G), caracterizando a população de linfócitos T de memória; 6 – Da população de linfócitos T de memória, foram delimitadas as populações de linfócitos TCM (CD62L+) e TEM (CD62L-) pela expressão de CD62L (Figura 13 H); 7 – Ainda das populações de linfócitos T CD4 e T CD8, foi delimitado as populações positivas para expressão de Tbet (Figura 13 I) e RORgT (Figura 13 J). As delimitações dos quadrantes foram baseadas na utilização de controles de fluorescência menos um (FMO, do inglês “fluorescence minus one”).

- Para determinar os perfis celulares de linfócitos T auxiliares/citotóxicos tipo 1 (Th1) e tipo 17 (Th17):

Th1: CD3⁺ CD4⁺/CD8⁺ Tbet⁺

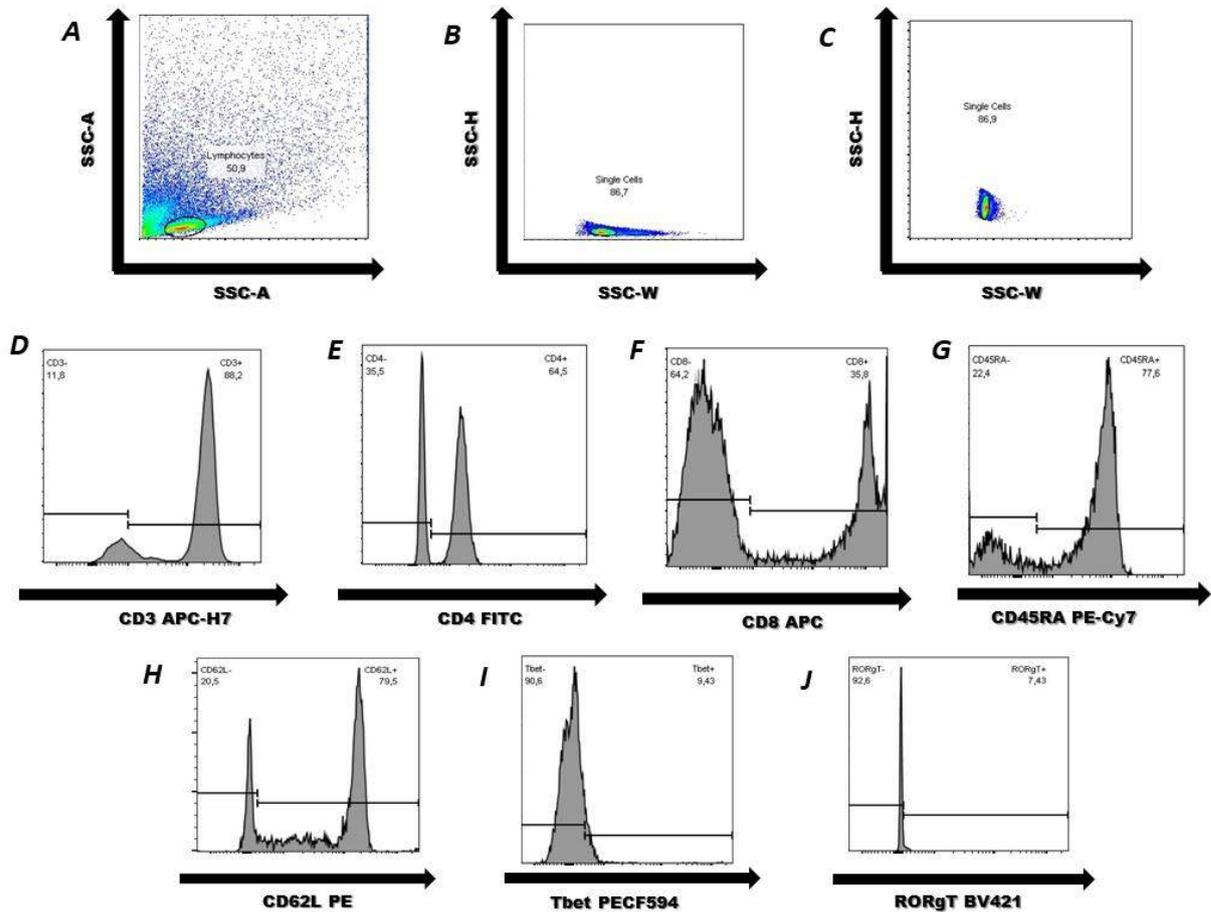
Th17: CD3⁺ CD4⁺/CD8⁺ RORgT⁺

- Para determinar os perfis celulares de linfócitos T de memória central (TCM) e de memória efetora (TEM):

TCM: CD3⁺ CD4⁺/CD8⁺ CD45RA⁻ CD62L⁺

TEM: CD3⁺ CD4⁺/CD8⁺ CD45RA⁻ CD62L⁻

Figura 13 - Estratégia de análise empregada para o painel de marcadores fenotípicos



Nota: Representação da estratégia de análise empregadas de acordo com os marcadores usados no painel 1. Em "A" Dotplot de tamanho por granulosidade (FSC-A/SSC-A) delimitando população linfocitária; em "B" dotplot Single cells considerando a granulosidade (SSC-H, SSC-W) derivada de "A"; em "C" dotplot Single cells considerando o tamanho (FSC-H, FSC-W) derivada de "B"; em "D" histograma delimitando população positiva para o marcador CD3⁺ (APC-H7) derivado de "C"; em "E" histograma delimitando populações quanto ao marcador CD4⁺ (FITC) derivado da população positiva em "D"; em "F" histograma representando população CD8⁺ (APC) derivado da população positiva em "D"; em "G" histograma representando população CD4⁺ ou/e CD8⁺ expressando CD45RA (PE-Cy7) derivado das populações positivas em "E" para CD4⁺ e "F" para CD8⁺; em "H" histograma representando população CD45RA⁻ expressando CD62L (PE) derivado de "G"; em "I" histograma representando população CD4⁺ e/ou CD8⁺ expressando TBET (PECF594) derivado das populações positivas em "E" para CD4⁺ e "F" para CD8⁺; em "J" histograma representando população CD4⁺ e/ou CD8⁺ expressando RORγT (BV421) derivado das populações positivas em "E" para CD4⁺ e "F" para CD8⁺.

5.7 Análise estatística:

A análise estatística foi realizada através dos softwares SPSS 8.0 e GraphPad Prisma 5.1, empregando-se testes paramétricos e/ou não paramétricos de acordo com a distribuição da normalidade, utilizando o teste de Shapiro-Wilk. Para as análises entre os grupos (Paciente x Controles) foi utilizado o teste T (paramétrico) e Mann-Whitney (não-paramétrico). Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$ = estatisticamente significativos).

6 RESULTADOS

6.1 Fenotipagem por citometria de fluxo

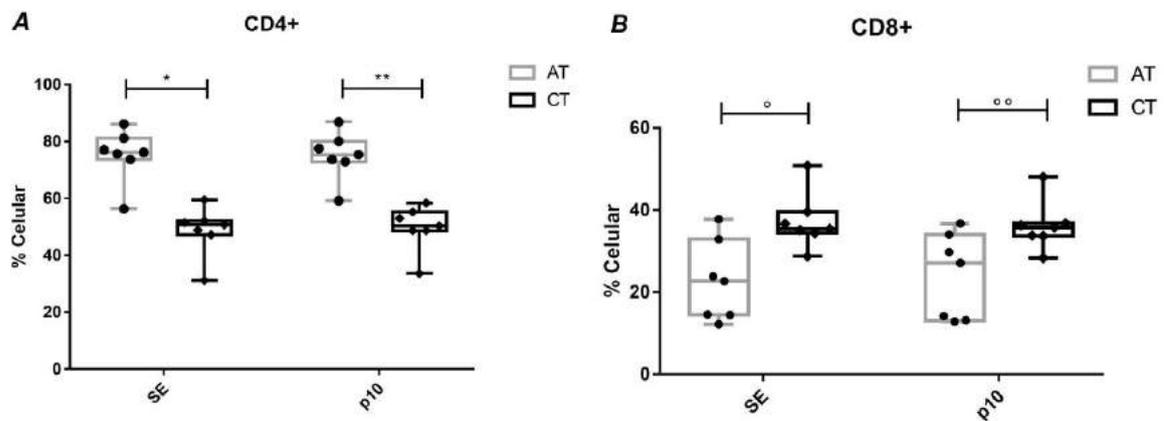
Os resultados a seguir correspondem a análise de células PBMC de indivíduos controle (CT) e pacientes com lesão ativa (AT), marcadas após cultura de 72h, frente ao estímulo com “pool” de 10 peptídeos (p10) derivados do trabalho anterior de Freitas-Silva et al. 2016. Todos os valores de porcentagem média de células, desvio padrão e valor de p significativo correspondentes estão registrados nas **tabelas 3 e 4** ao final dessa sessão.

- **Perfil de linfócitos T expressando os marcadores ROR γ T e Tbet:**

O percentual de linfócitos T CD4⁺ foi significativamente maior no grupo AT quando comparado ao grupo CT, em ambos os estímulos SE e P10 (**Figura 14A**). Foi observado também diferença significativamente maior no percentual de linfócitos T CD8⁺ no grupo AT quando comparado ao grupo CT, em ambos os estímulos SE e P10. (**Figura 14B**). Contudo, não observamos diferença significativa importante no estímulo com p10, em relação ao controle. Não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

Ao se observar as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando Tbet, em ambas as populações, se observou diferença significativamente maior do grupo AT em comparação ao grupo CT (**Figura 15A e B**). Essa diferença foi observada em ambos os estímulos SE e p10. Apesar disso, não observou-se diferença na expressão de T-bet entre as amostras SE e p10 em nenhuma das populações de T CD4⁺ e T CD8⁺. Não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

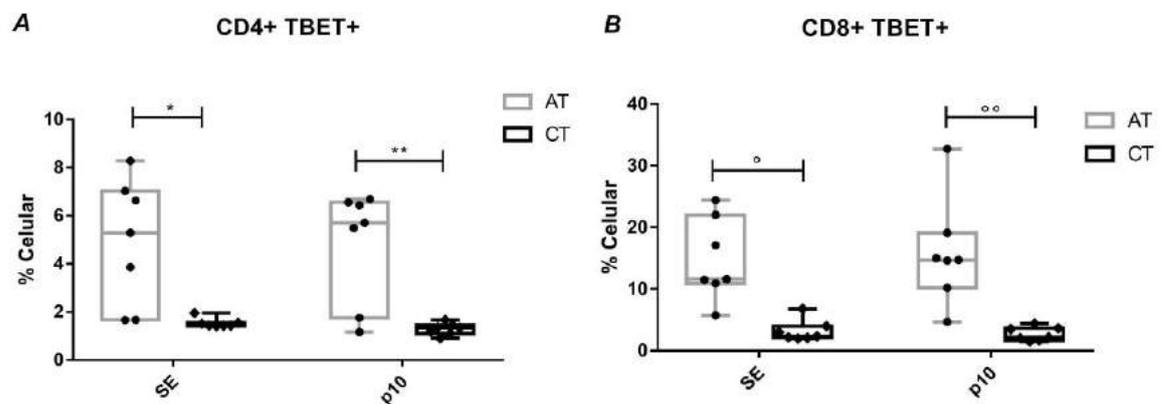
Figura 14 - Percentual de células T CD4+ e T CD8+ de pacientes e indivíduos controle após estímulo.



Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células T CD4+ (células T auxiliares) e T CD8+ de paciente X indivíduos controle após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico.

Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = Pool de 10 epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*. * $p = 0,0001$; ** $p = 0,0006$; ° $p = 0,0071$; °° $p = 0,0198$.

Figura 15 - Percentual de células T CD4+ e T CD8+ expressando Tbet de pacientes e indivíduos controle após estímulo.

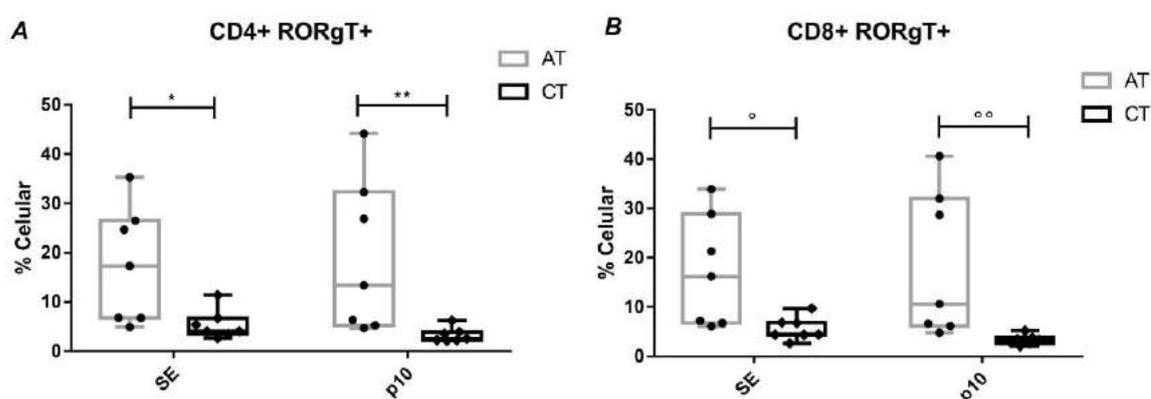


Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células T CD4+ expressando Tbet (Th1) e células T CD8+ expressando Tbet (Tc1) de controle X paciente após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico.

Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = Pool de 10 epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*. * $p = 0,0023$; ** $p = 0,0111$; ° $p = 0,0012$; °° $p = 0,0019$.

Por sua vez, foi observado nas populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando RORgT, em ambas as populações, se observou diferença significativamente maior do grupo AT em comparação ao grupo CT (**Figura 16A e B**). Essa diferença foi observada em ambos os estímulos SE e p10. Apesar disso, não observou-se diferença na expressão de RORgT entre as amostras SE e p10 em nenhuma das populações de T CD4⁺ e T CD8⁺. Não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

Figura 16 - Percentual de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando RORgT de pacientes e indivíduos controle após estímulo.



Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células T CD4⁺ expressando RORgT (Th17) e células T CD8⁺ expressando RORgT (Tc17) de controle X paciente após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico.

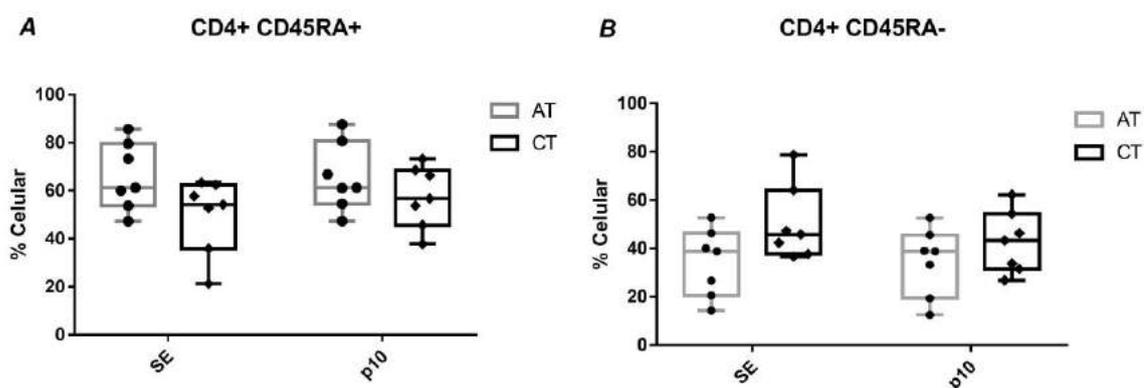
Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = Pool de 10 epítomos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*. * $p = 0,0223$; ** $p = 0,0223$; ° $p = 0,0206$; °° $p = 0,0192$.

▪ Perfil de linfócitos T de memória e suas subpopulações TCM e TEM:

A investigação da população de linfócitos T CD4⁺ quanto ao estado de ativação e de memória foi baseada na expressão de CD45RA. As células foram consideradas Naives (não ativadas) pela expressão positiva de CD45RA e de memória pela expressão negativa do mesmo marcador. Desse modo, foi observado que para ambos os linfócitos CD45RA⁺ e CD45RA⁻ não se apresentou diferença significativa entre os grupos AT e CT (**Figura 17**). Entretanto, pode ser observada uma tendência de mais células CD45RA⁺ em AT quando comparado ao CT (**Figura**

17A). Conseqüentemente, foi observada uma menor frequência de células CD45RA⁻ em AT ao comparar com CT (**Figura 17B**). Não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

Figura 17 - Percentual de células T CD4⁺ expressando CD45RA em pacientes e indivíduos controle após estímulo.

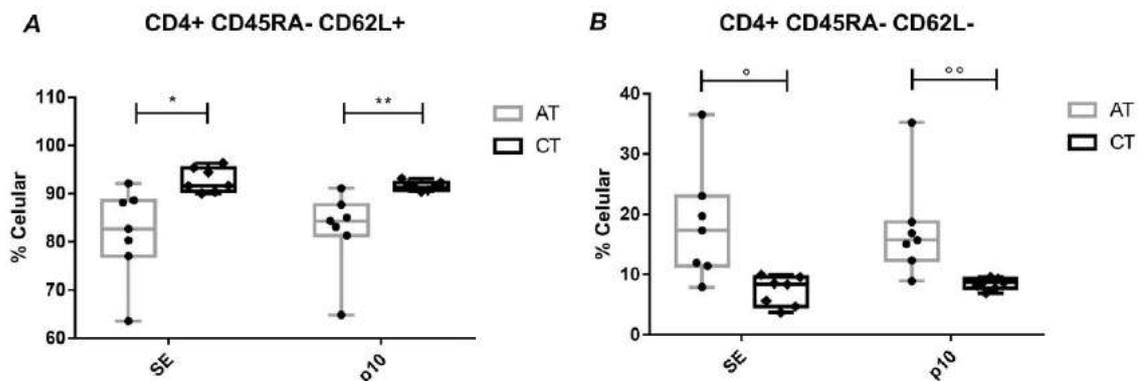


Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células CD4⁺ expressando o marcador CD45RA de controle X paciente após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico e antígeno total. Em “**A**” representa a população de células CD4⁺ naivas (CD45RA⁺) enquanto em “**B**” é representada a população de células T CD4⁺ de memória (CD45RA⁻).

Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo;; p10 = Pool de 10 epitopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*.

Dentro da população de linfócitos T de memória (CD45RA⁻) o marcador CD62L é expresso positivamente em linfócitos TCM (CD62L⁺) e negativamente em linfócitos TEM (CD62L⁻). Na população de linfócitos de memória T CD4⁺ foi observada diferença significativamente menor de TCM no grupo AT ao se comparar com o grupo CT (**Figura 18A**). Em oposição a isso, TEM teve uma frequência significativamente maior em AT ao se comparar com CT (**Figura 18B**). Essas diferenças foram observadas em ambos os estímulos. Entretanto não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

Figura 18 - Percentual de células T CD4⁺CD45RA⁻ expressando CD62L em pacientes e indivíduos controle após estímulo.

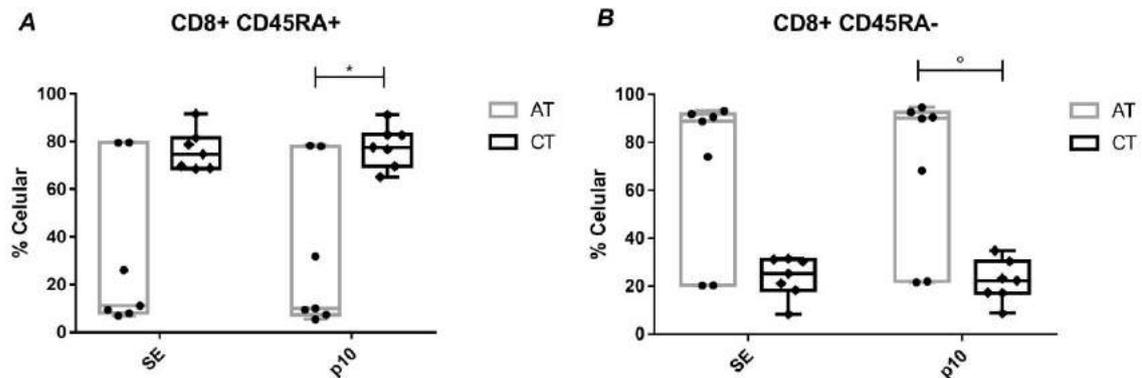


Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células CD4⁺CD45RA⁻ expressando o marcador CD62L de controle X paciente após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico e antígeno total. Em “**A**” é representada a população de células T CD4⁺ TCM (CD62L⁺), enquanto em “**B**” representa a população de células CD4⁺ TEM (CD62L⁻).

Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = Pool de 10 epítomos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*. * $p = 0,0124$; ** $p = 0,0150$; ° $p = 0,0122$; °° $p = 0,0150$.

Semelhante à abordagem na população de células T CD4⁺, a população de linfócitos T CD8⁺ foi descriminada entre Naive e células de memória de acordo com a expressão de CD45RA. Os linfócitos T CD8⁺ Naives no grupo AT apresentaram diferença significativamente menor ao comparar com o grupo CT (**Figura 19 A**). Essa diferença foi observada no estímulo com p10, entretanto há uma tendência semelhante em SE embora não tenha sido significativo. As células T CD8⁺ de memória foram significativamente mais frequentes no grupo AT em comparação a CT (**Figura 19 B**). Mais uma vez, essa diferença só foi observada no estímulo com p10, enquanto que em SE não chegou ao valor de p significativo. Não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

Figura 19 - Percentual de células T CD8⁺ expressando CD45RA em pacientes e indivíduos controle após estímulo.

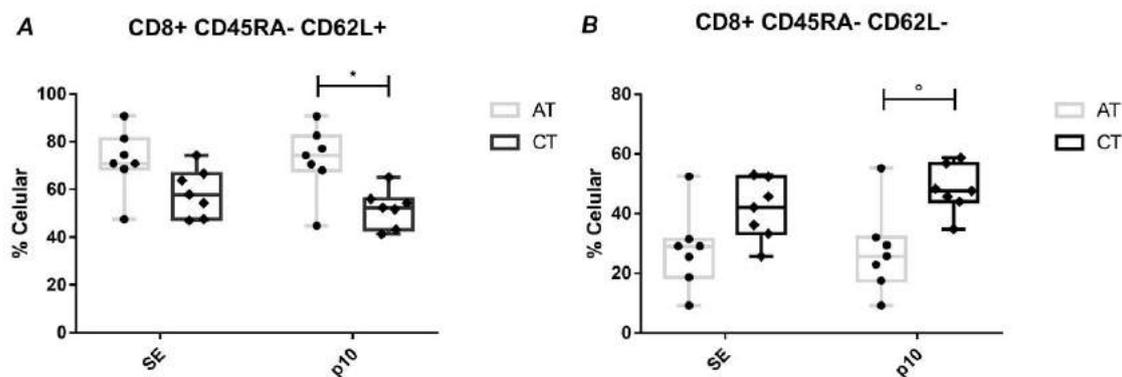


Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células CD4⁺ expressando o marcador CD45RA de controle X paciente após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico e antígeno total. Em “**A**” representa a população de células CD4⁺ naives (CD45RA⁺) enquanto em “**B**” é representada a população de células T CD4⁺ de memória (CD45RA⁻).

Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo;; p10 = Pool de 10 epítomos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*. * $p = 0,0379$; ° $p = 0,0379$.

De igual forma, a população de células T CD8⁺ de memória foram investigadas quanto à frequência de TCM e TEM usando o marcador CD62L. Diferente do observado em T CD4⁺ de memória, as células T CD8⁺ TCM apresentaram diferença significativamente maior no grupo AT em comparação ao CT, frente ao estímulo com p10 (**Figura 20 A**). Embora que se observa que essa população no SE tem a mesma tendência de maior frequência em AT em comparação ao CT. Ao se observar a frequência de TEM em linfócitos T CD8⁺, se observa uma diferença significativamente menor em AT ao se comparar com CT, no estímulo com p10 e com a mesma tendência em SE (**Figura 20 B**). Entretanto não houve diferença nas comparações intragrupo (ATxAT e CTxCT).

Figura 20 - Percentual de células T CD8⁺CD45RA⁻ expressando CD62L em pacientes e indivíduos controle após estímulo.



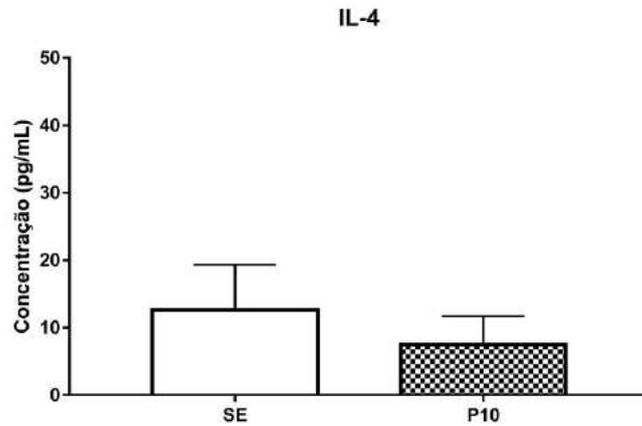
Nota: Gráfico comparativo da porcentagem da população de células CD8⁺CD45RA⁻ expressando o marcador CD62L de controle X paciente após cultura frente aos estímulos com “pool” peptídico e antígeno total. Em “A” representada a população de células T CD8⁺ TCM (CD62L⁺) enquanto em “B” é representada a população de células CD8⁺ TEM (CD62L⁻).

Legenda: CT = grupo controle; AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = Pool de 10 epítomos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*. * $p = 0,0064$; ° $p = 0,0064$.

6.2 Dosagem de citocinas do sobrenadante de cultura

Sendo assim, os resultados serão apresentados referentes aos tempos de 48h e 72h de cultura do grupo AT. Para a citocina IL-4, foi observada produção apenas no tempo de 48h, em ambos SE e p10, porém não significativo entre eles (**Figura 21**). A citocina IL-10 foi detectada em ambos os tempos. Para IL-10, no grupo SE houve uma redução da produção entre os tempos de 48h e 72h, não sendo significativo (**Figura 22**). Em contrapartida, para essa mesma citocina, observou um aumento na sua produção entre o tempo de 48h e 72h após o estímulo com p10, não sendo significativo (**Figura 22**). Já para a citocina IL-2, foi apenas detectada em 72h no grupo SE, enquanto que após o estímulo com p10 não foi observada produção de IL2, sugerindo que houve uma supressão por parte do “pool” de peptídeos (**Figura 23**). Finalmente, para IFN- γ também apenas foi detectada em 72h no grupo SE, enquanto no grupo p10 houve supressão da produção nesse mesmo tempo (**Figura 24**).

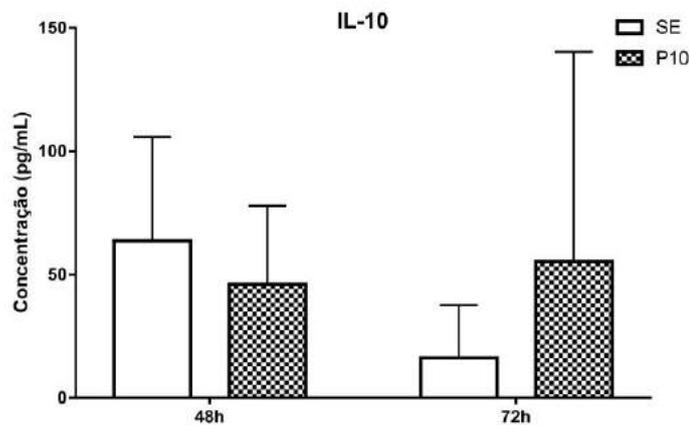
Figura 21 - Produção da citocina IL-4 pelo grupo AT após 48h de cultivo frente ao estímulos com p10.



Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-4 frente a cada estímulo após 48h.

Legenda: AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = "Pool" de 10 epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*.

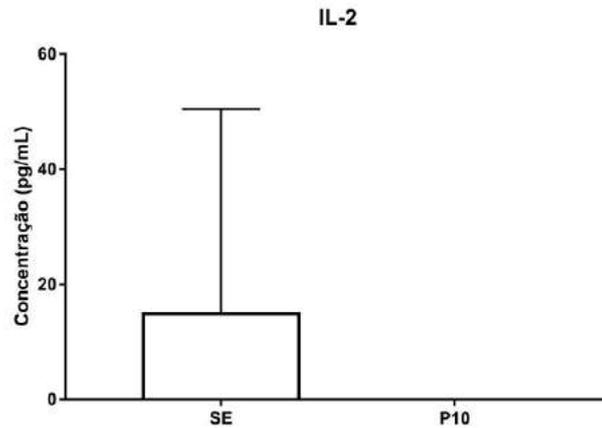
Figura 22 - Produção da citocina IL-10 pelo grupo AT após 48h e 72h de cultivo frente ao estímulos com p10.



Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-10 frente a cada estímulo nos tempos de 48h e 72h.

Legenda: AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = "Pool" de 10 epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*.

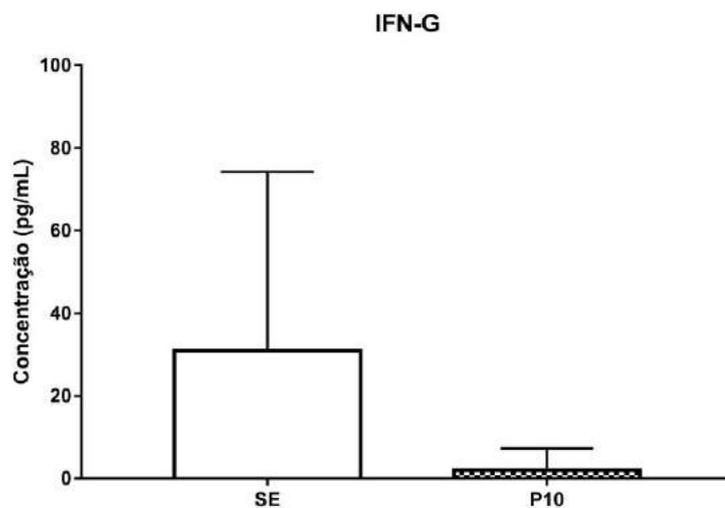
Figura 23 - Produção da citocina IFN pelo grupo AT após 72h de cultivo frente ao estímulo com p10.



Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IL-2 frente a cada estímulo após 72h.

Legenda: AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = "Pool" de 10 epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*.

Figura 24 - Produção da citocina IL-2 pelo grupo AT após 72h de cultivo frente ao estímulo com p10.



Nota: Gráfico representando as médias de concentração da citocina IFN- γ frente a cada estímulo após 72h.

Legenda: AT = grupo de pacientes antes do tratamento; SE = sem estímulo; p10 = "Pool" de 10 epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. braziliensis*.

Tabela 3 - Resumo dos principais resultados referentes aos linfócitos T CD4⁺

Subpopulação de T helper	Marcador	Tipo de estímulo	Média celular / Desvio padrão de AT	Média celular / Desvio padrão de CT	Relação de significância de AT em relação a CT	Valores significativos de p em relação ao controle
T helper	CD4+	Sem estímulo	75,21% ± 9,288	48,76% ± 8,657	↑	0,0001
		"Pool" 10	75,40% ± 8,463	50,30% ± 7,941	↑	0,0006
T helper 1	Tbet+	Sem estímulo	5,29% ± 2,618	1,43% ± 0,1943	↑	0,0023
		"Pool" 10	5,70% ± 2,35	1,34% ± 0,2478	↑	0,0111
T helper 17	RORgT+	Sem estímulo	17,47% ± 11,82	5,39% ± 2,967	↑	0,0223
		"Pool" 10	13,40% ± 15,60	2,56% ± 1,482	↑	0,0023
T Naive	CD45RA+	Sem estímulo	65,80% ± 14,02	49,64% ± 15,47	X	-
		"Pool" 10	65,57% ± 14,15	57,40% ± 12,84	X	-
T de memória	CD45RA-	Sem estímulo	34,20% ± 14,02	50,36% ± 15,47	X	-
		"Pool" 10	34,43% ± 14,15	42,60% ± 12,84	X	-
Linfócito T de memória efetor	CD45RA- CD62L-	Sem estímulo	18,25% ± 9,595	7,194% ± 2,505	↑	0,0122
		"Pool" 10	17,53% ± 8,417	8,457% ± 0,925	↑	0,0150
Linfócito T de memória central	CD45RA- CD62L+	Sem estímulo	81,76% ± 9,6	92,79% ± 2,51	↓	0,0124
		"Pool" 10	82,47% ± 8,422	91,56% ± 0,9307	↓	0,0150

Nota: ↑ = significativamente maior comparado ao grupo controle com o mesmo estímulo; ↓ = significativamente menor comparado ao grupo controle com o mesmo estímulo; X = não significativo.

Tabela 4 - Resumo dos principais resultados referentes aos linfócitos T CD8⁺

População e Subpopulação	Marcador diagnóstico da população	Tipo de estímulo	Média celular / Desvio padrão de AT	Média celular / Desvio padrão de CT	Relação de significância de AT em relação a CT	Valores significativos de p em relação ao controle
T citotóxico	CD8 ⁺	Sem estímulo	22,60% ± 9,803	37,21% ± 6,811	↓	0,0071
		"Pool" 10	23,94% ± 10,36	36,09% ± 5,981	↓	0,0198
Tc 1	Tbet+	Sem estímulo	11,60% ± 6,677	2,36% ± 1,735	↑	0,0012
		"Pool" 10	15,85% ± 8,706	2,70% ± 1,131	↑	0,0019
Tc 17	RORgT+	Sem estímulo	17,20% ± 11,29	5,59% ± 2,346	↑	0,0206
		"Pool" 10	18,50% ± 14,82	3,319% ± 1,009	↑	0,0192
T Naive	CD45RA+	Sem estímulo	11,20% ± 12,65	74,70% ± 3,206	X	-
		"Pool" 10	10,00% ± 12,50	77,60% ± 3,306	↓	0,0379
T de memória	CD45RA-	Sem estímulo	88,80% ± 12,65	25,30% ± 3,209	X	-
		"Pool" 10	90,00% ± 12,50	22,40% ± 3,310	↑	0,0379
Linfócito T de memória efetor	CD45RA- CD62L-	Sem estímulo	27,93% ± 13,38	41,20% ± 10,11	x	-
		"Pool" 10	27,42% ± 14,42	47,99% ± 8,039	↓	0,0064
Linfócito T de memória central	CD45RA- CD62L+	Sem estímulo	72,07% ± 13,29	58,80% ± 10,11	x	-
		"Pool" 10	72,57% ± 14,42	52,01% ± 8,039	↑	0,0064

Nota: ↑ = significativamente maior comparado ao grupo controle com o mesmo estímulo; ↓ = significativamente menor comparado ao grupo controle com o mesmo estímulo; X = não significativo.

7 DISCUSSÃO

As leishmanioses configuram um problema que está longe de ser erradicado, visto que seu tratamento atual exhibe diversos problemas como toxicidade e resistência (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Ainda que existam investimentos em novos fármacos, a toxicidade ainda é uma barreira grande a ser superada. Diante disso, a vacinação é uma medida de controle importante e necessária, capaz de prevenir da doença por parte de indivíduos saudáveis, como também a reinfeção de indivíduos curados. A vacina em si atua como um estímulo imunológico, sendo assim o arranjo de células e seus fatores secretados determinam a eficácia da resposta imune. Logo, nosso conhecimento em imunologia nos direciona para quais populações celulares são primordiais e sinalizam para uma vacina ideal. Portanto, a imunofenotipagem é uma ferramenta indispensável na avaliação de moléculas quanto a seu potencial vacinal. Dentre as tecnologias atuais que auxiliam nessa investigação, a citometria de fluxo nos dá a possibilidade de avaliar diversos parâmetros fenotípicos e moleculares (PAPENFUSS, 2017). Desse modo, ao empregar a citometria de fluxo em nosso trabalho, fomos capazes de investigar o perfil de células T de memórias, tão importantes para prevenção e resposta protetora contra a doença.

Entendendo a importância do antígeno na composição de uma vacina, esse componente deve ser capaz de interagir com os receptores das células imunológicas, que por sua vez, irá gerar um tipo de resposta. Sendo assim, esse antígeno é de extrema importância para o sucesso da vacinação. Dada à diversidade de antígenos que podem ser usados, técnicas de triagem mais elaboradas são necessárias para chegar a uma molécula mais confiável para uso. Ao levar em conta essas questões, nosso grupo de pesquisa atuou na procura dessas moléculas potenciais, utilizando ferramentas modernas de bioinformática como descrito em Freitas-E-Silva et al., 2016. Ao fim desse trabalho, chegamos em dez potenciais epítopos peptídicos derivados do proteoma de *L. (V.) brazilienses*.

Nas investigações seguintes, foi observado que existe um grau de proliferação linfocitária do sangue de pacientes e indivíduos controle ao estimular com esses peptídeos (FREITAS-E-SILVA et al., 2020, 2016). Esses dados nos incentivaram a procurar definir que tipo celular está presente nessa resposta ao nosso estímulo.

Entretanto, foi observado também que esses peptídeos quando usados isoladamente não demonstram uma indução tão forte das populações de interesse. Esse fato pode ser explicado por uma característica dos próprios linfócitos T, que dependem da quantidade e tempo suficiente de apresentação da molécula para então responderem de forma eficaz (ZINKERNAGEL, 2000). Essa particularidade dos linfócitos T nos levou a empregar esses dez peptídeos em forma de “Pool”, para assim atender as necessidades de indução. Contudo, não foi observada diferença em ambos os grupos, paciente e controle, quando estimulados com esse “pool” ao se comparar as amostras não estimuladas. Possivelmente duas hipóteses podem explicar esse efeito: a concentração dos peptídeos não foi suficiente para gerar uma resposta celular e/ou a interação entre alguns peptídeos podem ter anulado/antagonizado o efeito de outros.

Os resultados provenientes desse estudo demonstram que, houve um aumento significativo da população T CD4⁺ em pacientes com lesão ativa, quando comparados ao controle. Essas células são desejadas, uma vez que são importantes produtoras de citocinas que atuam na maturação, ativação e direcionamento de diversas células efetoras que combatem a doença (IBORRA et al., 2018; ROSSI; FASEL, 2018). Em contrapartida, houve uma redução significativa de T CD8⁺ em pacientes, quando comparado ao controle, nas amostras SE e estimuladas com p10. O baixo nível de células T CD8⁺ no sangue de pacientes pode ser explicado pelo fato de que, a maioria dessas células citotóxicas migram para a área da lesão (F. Conceição-Silva et. al., 1990; A.M. Da-Cruz, A.L. Bertho, M.P. Oliveira-Neto and S.G. Coutinho, 2005).

Houve um aumento significativo da expressão de Tbet em células T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes quando comparado ao controle em todos os estímulos. O Tbet é um fator de transcrição conhecido responsável por polarizar a diferenciação de linfócitos T CD4⁺ para o tipo Th1 (O’GARRA; GABRYŠOVÁ, 2016; SZABO et al., 2000). Entretanto, vem sendo observado que esse fator de transcrição pode desempenhar papel importante em células T CD8⁺, como demonstrado em estudo com camundongos infectados com *T. cruzi* (COBB et al., 2009). Ainda sim, pouco se sabe sobre essa relação do Tbet associado a linfócitos T CD8⁺, tão pouco o papel dessa população específica relacionada à leishmaniose tegumentar em humanos.

Em infecções virais e doenças inflamatórias como miosite, T CD8⁺Tbet⁺ reprimiu a expressão de fatores inibitórios como PD-1, gerando uma resposta satisfatória. Em contrapartida, a exaustão desse subtipo foi associada à persistência da inflamação em ambos os casos (DZANGUÉ-TCHOUPOU et al., 2019; KAO et al., 2011). Desse modo, um perfil Th1, secretor de citocinas próinflamatórias, em conjunto com um perfil Tc1 poderiam garantir uma resposta mais eficiente contra LTA.

Os dados encontrados mostraram que há um aumento significativo na expressão de ROR γ T em células T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes quando comparado ao controle em todos os estímulos. Da mesma forma, o fator de transcrição ROR γ T é responsável principalmente pela diferenciação de linfócitos T auxiliares para o perfil Th17 (IVANOV et al., 2006). Embora, recentemente têm sido mostradas células T CD8 expressando esse marcador em algumas doenças inflamatórias (CHELLAPPA et al., 2017; HUBER et al., 2009). Esse dado é interessante principalmente quando não há informações da relação dessa população T CD8⁺ expressando ROR γ T no universo da leishmaniose tegumentar. Essas células parecem manter sua atividade próinflamatória como produtora de citocinas, principalmente IL-17, mas sua capacidade de gerar e liberar granzimas é suprimida (CHELLAPPA et al., 2017). Para a abordagem da LTA pode ser interessante, pois previne um ambiente inflamatório exacerbado, não deixando de atuar no combate ao parasita.

É observada a redução significativa de células T Naive em CD8⁺ de pacientes quando comparado ao controle. Esse efeito é esperado uma vez que ao decorrer da infecção se pressupõe que existe um grau de ativação no curso da resposta imunológica, caracterizado pela redução da expressão do marcador CD45RA (RODRÍGUEZ-PEREA et al., 2016). Diferentemente, foi observado que a população de células T Naives CD4⁺ se mostra maior em pacientes quando comparado ao controle em todos os estímulos, embora não significativo. Normalmente é observado em outras doenças parasitárias que o percentual de células T CD4⁺ naives fica na faixa de 50% ou superior (SALLUSTO F. et al., 1999; HAILU A, et al, 2005). Esse fato curioso parece sinalizar que as células T CD8⁺ são mais ativas no processo relacionado à memória durante a infecção por *L. braziliensis* na LTA, sendo necessário uma maior investigação dessa dinâmica populacional de memória entre T CD4⁺ e T CD8⁺. Em geral, as células de memória conseguem persistir por mais

tempo, mesmo sem a presença do antígeno, e são capazes de responder rapidamente caso ocorra uma reinfecção (MARTIN; BADOVINAC, 2018; SAMJI; KHANNA, 2017). Esse aspecto é muito desejado numa estratégia vacinal, portanto é essencial que esse tipo celular esteja presente.

Quando observado a participação das subpopulações de linfócitos T de memória nessas populações, observamos que as células TEM são significativamente maior na população T CD4+ de pacientes quando comparado ao controle, após o estímulo. Na LTA é observado que essa população TEM CD4+ se encontra em alta densidade, tanto em PBMC quanto na área da lesão, em pacientes com lesão ativa (MENDES-AGUIAR et al., 2016). Em outras doenças parasitárias como a malária, o perfil TEM está associado a uma resposta protetiva com indução de INF- γ (COCKBURN IA, ZAVALA, 2007; JANGPATARAPONGSA K. et al., 2006; F.HOSSEIN KESHAVARZ VALIAN, 2012).

Enquanto isso, a população TEM CD8+ demonstrou ser mais reduzida em nossos resultados. Essa redução das TEM na população CD8+ pode estar relacionado a um aumento na ação citotóxica. Esse aumento na função efetora pode estar levando ao aumento da apoptose nessa população (BERTHO AL et al, 2000; MENDES-AGUIAR et al., 2016). Notavelmente, a população T CD8+ tem uma maior polarização de células TCM em pacientes quando comparado ao controle saudável após estímulo. A população de células TCM são fundamentais para a manutenção da população TEM. Por persistirem longos períodos de tempo, em um segundo contato com um antígeno, as TCM tem a capacidade de expandir e se diferenciarem rapidamente em TEM, contribuindo assim para uma resposta rápida e efetora em caso de reinfecção (ZAPH et al., 2004; SHIN, IWASAKI, 2013).

Em nosso estudo, as citocinas investigadas não apresentaram resultados significativos entre os estímulos. Entretanto, houve uma tendência de aumento na produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-4 e IL-10) na presença do “pool” de peptídeos, enquanto que para citocinas pró-inflamatórias (IL-2 e IFN- γ) houve uma redução, quando comparado ao SE. Esse efeito pode indicar que, em pacientes com lesão ativa, esses peptídeos poderiam promover uma resposta mais balanceada (ROSSI; FASEL, 2018).

Neste presente trabalho, embora o estímulo com os peptídeos não demonstrasse sucesso, a abordagem imunofenotípica foi capaz de sinalizar alguns dos principais fenótipos celulares desejados para o combate a LTA. Além disso, outros perfis ainda não vistos no contexto da LTA, como células T CD8+ expressando T-bet e ROR γ T, foram observados. Esses dados novos podem contribuir para investigações futuras de outras moléculas, como também sinalizar a importância desses perfis pouco estudados. Vale ressaltar que, por essas moléculas serem inéditas, talvez outras concentrações de estímulo pudessem gerar resultados mais satisfatórios, sendo essa outra limitação desse trabalho. Além disso, outros grupos de pacientes como pós-tratamento, durante o tratamento e cura espontânea, poderiam prover mais resultados relacionados aos perfis de memória. Ademais, os resultados encontrados em nosso estudo ajudam a elucidar alguns dos aspectos envolvidos na LTA, principalmente relacionado aos fenótipos ainda não abordados nesse campo. De fato, os peptídeos usados necessitam de mais investigações que possam contribuir para o desenvolvimento de uma medida profilática para a LTA.

8 CONCLUSÃO

- A população de linfócitos T CD4⁺ foi significativamente maior em pacientes com LTA, quando comparado aos indivíduos controles.
- A população de células T CD8⁺ teve uma redução significativa em pacientes com LTA, quando comparado aos indivíduos controles. Podendo indicar um controle maior da população citotóxica, de modo a prevenir a exarcebação da resposta inflamatória.
- Ambas as populações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressaram significativamente o marcador T-bet em pacientes com LTA após o estímulo, indicando um potencial de gerar citocinas pró-inflamatórias de resposta a infecção;
- O marcador RORgT foi expresso de forma significativa em ambas as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em pacientes com LTA, após o estímulo. Esse marcador em ambas as populações está relacionado à produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e IL-6;
- Na população T CD4⁺ houve uma maior prevalência de células TEM enquanto que as células TCM foram encontradas em menor número em pacientes quando comparado a indivíduos saudáveis. Isso pode sinalizar que as células T CD4⁺ de memória pode se destacar mais na função efetora durante a infecção por LTA;
- Na população T CD8⁺ as células TCM foram mais abundantes que as TEM, em pacientes com LTA ao se comparar com indivíduos saudáveis. Esse efeito pode sinalizar que na LTA as células T CD8⁺ de memória tem a tendência de gerar uma resposta de memória mais duradoura.
- O pool de peptídeos usado nesse estudo não foi capaz de gerar diferenças na indução de populações celulares quando comparada a amostras sem estímulo;
- Não houve produção significativa das citocinas investigadas no sobrenadante de PBMCs de pacientes após o estímulo com o Pool, quando comparado ao não estimulado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017.

AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008.

ANVERSA, L. S. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

ARENAS, R. et al. Leishmaniasis: A review. **F1000Research**, v. 6, n. May, p. 1–15, 2017.

ASSIS, M. DE et al. Microbial Pathogenesis Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients : Pro fi les in active disease , after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 27–32, 2013.

AUDREY ROMANO et al. Cutaneous infection with *Leishmania major* mediates heterologous protection against visceral infection with *Leishmania infantum*. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 1, p. 100–106, 2016.

BACELLAR, O. et al. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **National institutes of Health**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.

BAHRAMI, F.; HARANDI, A. M.; RAFATI, S. Biomarkers of cutaneous leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. JUN, p. 1–8, 2018.

BERTHOLET, S. et al. Optimized subunit vaccine protects against experimental leishmaniasis. **Vaccine**, v. 27, n. 50, p. 7036–7045, 2009.

BETTELLI, E. et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. **Nature**, v. 441, n. 7090, p. 235–238, 2006.

BIRNBAUM, R.; CRAFT, N. Innate immunity and leishmania vaccination

strategies. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 89–102, 2011.

BONILLA, W. V. et al. The alarmin interleukin-33 drives protective antiviral CD8+ T cell responses. **Science**, v. 335, n. 6071, p. 984–989, 2012.

BOUSSOFFARA, T. et al. Activated cytotoxic T cells within zoonotic cutaneous leishmaniasis lesions. **Immunity Inflammation and Disease**, v. 7, n. 3, p. 95–104, 2019.

BRASIL. Saúde Brasil 2007: uma análise da situação de saúde. 2007.

BRASIL; / MINISTÉRIO DA SAÚDE, SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, D. DE V. DAS D. T. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico]**. [s.l: s.n.].

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012a.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012b.

BRELAZ, M. C. A. et al. Antigenic fractions of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite immunology**, v. 34, n. 4, p. 236–9, abr. 2012.

BRILHANTE, A. F. et al. Canine cutaneous leishmaniasis by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an agricultural settlement, endemic area for leishmaniasis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, n. 4, p. 927–930, 2016.

BRITO, R. C. F. et al. Immunoinformatics features linked to *Leishmania* vaccine development: Data integration of experimental and in silico studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 2, p. 1–18, 2017.

- CALVOPINA, M.; ARMIJOS, R. X.; HASHIGUCHI, Y. Epidemiology of leishmaniasis in Ecuador: Current status of knowledge - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 7, p. 663–672, 2004.
- CAMPOS, T. M. et al. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 11, p. 733–740, 2017.
- CARVALHO, A. K. et al. Differential Recruitment of Dendritic Cells Subsets to Lymph Nodes Correlates with a Protective or Permissive T-Cell Response during *Leishmania (Viannia) Braziliensis* or *Leishmania (Leishmania) Amazonensis* Infection. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, 2016.
- CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.
- CHAKRAVARTY, J. et al. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1+MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v. 29, n. 19, p. 3531–3537, 2011.
- CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of *Leishmania major* inoculation in resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.
- CHELLAPPA, S. et al. CD8 + T Cells That Coexpress ROR γ t and T-bet Are Functionally Impaired and Expand in Patients with Distal Bile Duct Cancer . **The Journal of Immunology**, v. 198, n. 4, p. 1729–1739, 2017.
- CHRISTIAANSEN, A. F. et al. CD11a and CD49d enhance the detection of antigen-specific T cells following human vaccination. v. 35, n. 33, p. 4255–4261, 2017.
- COBB, D. et al. T-bet-dependent regulation of CD8 + T-cell expansion during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 128, n. 4, p. 589–599, 2009.
- COSTA, C. H. N. et al. Vaccines for the leishmaniases: proposals for a research

agenda. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e943, jan. 2011.

COUGHLAN, S. et al. The genome of *Leishmania adleri* from a mammalian host highlights chromosome fission in *Sauroleishmania*. **Scientific Reports**, v. 7, n. January, p. 1–13, 2017.

COUTINHO, S. G. et al. T-Cell Responsiveness of American Cutaneous Leishmaniasis Patients to Purified *Leishmania pifanoi* Amastigote Antigens and *Leishmania braziliensis* Promastigote Antigens: Immunologic Patterns Associated with Cure. **Experimental Parasitology**, v. 84, n. 2, p. 144–155, nov. 1996.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in public health**, v. 2, n. September, p. 165, 2014.

DATASUS. No Title. 2017.

DAVID; CRAFT. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2009.

DE ASSIS SOUZA, M. et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 27–32, 2013a.

DE ASSIS SOUZA, M. et al. Cytokines and NO in American tegumentary leishmaniasis patients: Profiles in active disease, after therapy and in self-healed individuals. **Microbial Pathogenesis**, v. 57, p. 27–32, 2013b.

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–8, 2016a.

DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 151, abr. 2016b.

DE OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–9, 2012.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

DE TREZ, C. et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.

DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 276, 2012.

DZANGUÉ-TCHOUPOU, G. et al. CD8+ T-bet+ cells as a predominant biomarker for inclusion body myositis. **Autoimmunity Reviews**, v. 18, n. 4, p. 325–333, 2019.

E SILVA, R. DE F. et al. Immunogenicity of Potential CD4+ and CD8+ T Cell Epitopes Derived From the Proteome of Leishmania braziliensis. **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. February, p. 1–14, 2020.

EGUI, A. et al. Phenotypic and Functional Profiles of Antigen-Specific CD4+ and CD8+ T Cells Associated With Infection Control in Patients With Cutaneous Leishmaniasis. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 8, n. November, p. 393, 2018.

FALCÃO, S. DE A. C. et al. Leishmania infantum and Leishmania braziliensis: Differences and similarities to evade the innate immune system. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, p. 1–10, 2016.

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

FIGUEIREDO, A. B. et al. Leishmania amazonensis-induced cAMP triggered by adenosine A2B receptor is important to inhibit dendritic cell activation and evade immune response in infected mice. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. JUL, p. 1–14, 2017.

FRANKEN, L.; SCHIWON, M.; KURTS, C. Macrophages: Sentinels and regulators of the immune system. **Cellular Microbiology**, v. 18, n. 4, p. 475–487, 2016.

FREITAS-SILVA et al. Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, 2016.

GILLESPIE, P. M. et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. **Vaccine**, v. 34, n. 26, p. 2992–2995, 2016.

GOLLOB, K. J. et al. Immunoregulatory mechanisms and CD4 – CD8 – (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis : A balancing act between protection and pathology. p. 1338–1343, 2008.

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana American cutaneous leishmaniasis. **Medicina Tropical**, v. 36, n. 13, p. 71–80, 2003.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

GONZÁLEZ, C. et al. Climate change and risk of leishmaniasis in North America: Predictions from ecological niche models of vector and reservoir species. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 1, 2010.

GUREL, M. S.; TEKIN, B.; UZUN, S. Cutaneous leishmaniasis: A great imitator. **Clinics in Dermatology**, n. xxxx, 2019.

GURSEL, M.; GURSEL, I. Development of CpG ODN Based Vaccine Adjuvant Formulations. v. 6, p. 221–244, 2016.

GUSTAVO UZÊDA MACHADO; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects*. **An Bras Dermatol.**, v. 8, n. 2, p. 232–232, 2019.

HANAGATA, N. CpG oligodeoxynucleotide nanomedicines for the prophylaxis or treatment of cancers, infectious diseases, and allergies. **International**

Journal of Nanomedicine, v. 12, p. 515–531, 2017.

HARTLEY, M. A. et al. The therapeutic potential of immune cross-talk in leishmaniasis. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 2, p. 119–130, 2013.

HOTEZ, P. J. NTDs V.2.0: “Blue Marble Health”-Neglected Tropical Disease Control and Elimination in a Shifting Health Policy Landscape. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 11, 2013.

HUBER, M. et al. Th17-like developmental process leads to CD8+ Tc17 cells with reduced cytotoxic activity. **European Journal of Immunology**, v. 39, n. 7, p. 1716–1725, 2009.

IBORRA, S. et al. Vaccine candidates against leishmania under current research. **Expert Review of Vaccines**, v. 17, n. 4, p. 323–334, 2018.

ITALIANI, P. et al. Profiling the Course of Resolving vs . Persistent Inflammation in Human Monocytes : The Role of IL-1 Family Molecules. v. 11, n. July, 2020.

IVANOV, I. I. et al. The Orphan Nuclear Receptor ROR γ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. **Cell**, v. 126, n. 6, p. 1121–1133, 2006.

JOHN, L.; JOHN, G. J.; KHOLIA, T. A reverse vaccinology approach for the identification of potential vaccine candidates from leishmania spp. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 167, n. 5, p. 1340–1350, 2012.

KAO, C. et al. Transcription factor T-bet represses expression of the inhibitory receptor PD-1 and sustains virus-specific CD8+ T cell responses during chronic infection. **Nature Immunology**, v. 12, n. 7, p. 663–671, 2011.

KATEBI, A. et al. Leishmania tarentolae secreting the sand fly salivary antigen PpSP15 confers protection against Leishmania major infection in a susceptible BALB/c mice model. **Molecular Immunology**, v. 67, n. 2, p. 501–511, 2015.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of global infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 177–85, 2010.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KIP, A. E. et al. Systematic review of biomarkers to monitor therapeutic response in leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 1, p. 1–14, 2015.

KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.

KOMAI-KOMA, M. et al. Anti-Toll-like receptor 2 and 4 antibodies suppress inflammatory response in mice. **Immunology**, v. 143, n. 3, p. 354–362, 2014.

LARA-SILVA, F. DE O. et al. Epidemiological aspects of vector, parasite, and domestic reservoir in areas of recent transmission and no reported human cases of visceral leishmaniasis in Brazil. **Acta Tropica**, v. 148, p. 128–136, 2015.

LEE, S. H. et al. Mannose receptor high, M2 dermal macrophages mediate nonhealing *Leishmania major* infection in a Th1 immune environment. **Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 1, p. 357–375, 2018.

LEÓN, B.; LÓPEZ-BRAVO, M.; ARDAVÍN, C. Monocyte-Derived Dendritic Cells Formed at the Infection Site Control the Induction of Protective T Helper 1 Responses against *Leishmania*. **Immunity**, v. 26, n. 4, p. 519–531, 2007.

LOEUILLET, C. et al. Study of *Leishmania* pathogenesis in mice: experimental considerations. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 144, dez. 2016.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 3039–46, mar. 2009.

MANDELL, M. A.; BEVERLEY, S. M. Continual renewal and replication of

persistent *Leishmania major* parasites in concomitantly immune hosts.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 114, n. 5, p. E801–E810, 2017.

MANTOVANI, A. et al. Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. **Journal of Pathology**, v. 229, n. 2, p. 176–185, 2013.

MARTIN, M. D.; BADOVINAC, V. P. Defining memory CD8 T cell. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. NOV, p. 1–10, 2018.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEHEUS, F. et al. Cost-Effectiveness Analysis of Combination Therapies for Visceral Leishmaniasis in the Indian Subcontinent. v. 4, n. 9, 2010a.

MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, 2010b.

MEMBRIVE, N. A. et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Southern Brazil. n. January, p. 2–5, 2017.

MENDES, A. P. O. et al. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using *L. (V.) braziliensis* fixed promastigotes: A comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC Infectious Diseases**, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.

MENDONÇA, M. G. et al. Persistence of *Leishmania* parasites in scars after clinical cure of american cutaneous leishmaniasis: Is there a sterile cure? **Journal of Infectious Diseases**, v. 189, n. 6, p. 1018–1023, 2004.

MOAFI, M. et al. *Leishmania* Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. **International Journal of Preventive Medicine**, v. 8, 2019.

- MORENO, E. S. et al. Evidence of a sylvatic enzootic cycle of leishmania infantum in the State of Amapá, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, n. August, p. 13–15, 2020.
- MÜLLER et al. Establishment of resistance to Leishmania major infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells. 1991.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. [Review]. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- NAGILL, R.; KAUR, S. Vaccine candidates for leishmaniasis: A review. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 10, p. 1464–1488, 2011.
- NANDA, T. K. AND N. K. Protective Response to Leishmania major in BALB/c Mice Requires Antigen Processing in the Absence of DM1. **J Immunol**, v. 76, n. October 2009, p. 211–220, 2009.
- NASCIMENTO, M. S. L. ET AL. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against Leishmania infantum infection. **The Journal of infectious diseases**, 2015.
- NG, L. G. et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 11, 2008.
- NOVAIS, F. O.; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. **Seminars in Immunopathology**, v. 37, n. 3, p. 251–259, 2015.
- O’GARRA, A.; GABRYŠOVÁ, L. Correction: Transcription Factors Directing Th2 Differentiation: Gata-3 Plays a Dominant Role. **The Journal of Immunology**, v. 197, n. 11, p. 4504–4504, 2016.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. v. 76, n.

October 2009, p. 211–220, 2014.

OPAS/OMS. No Title. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA SAÚDE. Leishmanioses: informe epidemiológico das Américas. **World Health Organization**, n. 6, p. 1–7, 2018.

OSMAN, M. et al. A third generation vaccine for human visceral leishmaniasis and post kala azar dermal leishmaniasis: First-in-human trial of ChAd63-KH. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–24, 2017.

PAHO/WHO. No Title. 2017.

PAPENFUSS, T. L. Immunopathology in Toxicology and Drug Development. **Immunopathology in Toxicology and Drug Development**, v. 2, p. 601–618, 2017.

PEDRAL-SAMPAIO, G. et al. Detection of IgG Anti-leishmania antigen by flow cytometry as a diagnostic test for cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1–9, 2016.

PETERS, N. C. et al. Vector transmission of *Leishmania* abrogates vaccine-induced protective immunity. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.

PIGOTT, D. M. et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1–21, 2014.

PIRDEL, L.; FARAJNIA, S. A Non-pathogenic Recombinant *Leishmania* Expressing Lipophosphoglycan 3 Against Experimental Infection with *Leishmania infantum*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 86, n. 1, p. 15–22, 2017.

PROVINCE, R. K. Clinical Trial Protocol Evaluations of phase II double blind randomized controlled clinical trial , single dose of the gentamicin-attenuated line of *Leishmania major* H-line vaccine against cutaneous leishmaniasis in comparison with phosphate buffer saline. 2020.

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease

Agents. **Annu. Rev. Entomol**, v. 58, p. 227–50, 2013.

REGINA-SILVA, S. et al. Field randomized trial to evaluate the efficacy of the Leish-Tec® vaccine against canine visceral leishmaniasis in an endemic area of Brazil. **Vaccine**, v. 34, n. 19, p. 2233–2239, 2016.

REGLI, I. B. et al. Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. NOV, p. 1–8, 2017.

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 & disease**, v. 6, p. e2018, 2015.

RIBEIRO, V. M. et al. Control of visceral leishmaniasis in Brazil: recommendations from Brasileish. **Parasites & Vectors**, v. 6, n. 1, p. 8, 2013.

ROBERTO, N. et al. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. v. 86, n. 3, p. 573–579, 2011.

RODRÍGUEZ-PEREA, A. L. et al. Phenotypical characterization of regulatory T cells in humans and rodents. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 185, n. 3, p. 281–291, 2016.

ROGERS, K. A. et al. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiol Lett**, v. 209, n. 1, p. 1–7, 2002.

ROQUE, A. L. R.; JANSEN, A. M. Wild and synanthropic reservoirs of *Leishmania* species in the Americas. **International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife**, v. 3, n. 3, p. 251–262, 2014.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! v. 30, n. 3, p. 103–111, 2017.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

SAHA, S. et al. Immune responses in kala-azar. **The Indian journal of medical research**, v. 123, n. 3, p. 245–266, mar. 2006.

SALJOUGHIAN, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Live vaccination tactics: Possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAR, p. 1–11, 2014.

SALLUSTO, F. et al. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. v. 401, n. October, 1999.

SALLUSTO, F. Central memory and effector memory T cell subsets: Function, Generation, and Maintenance. **Annual Review of Immunology**, v. 22, n. 1, p. 745–763, 2004.

SAMJI, T.; KHANNA, K. M. Understanding Memory CD8+ T cells. **Physiology & behavior**, v. 176, n. 12, p. 139–148, 2017.

SANGIORGI, B. et al. Natural breeding places for phlebotomine sand flies (Diptera: Psychodidae) in a semiarid region of Bahia State, Brazil. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012a.

SANGIORGI, B. et al. Natural Breeding Places for Phlebotomine Sand Flies (Diptera : Psychodidae) in a Semiarid Region of Bahia State , Brazil. v. 2012, 2012b.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCHROEDER, J.; AEBISCHER, T. Vaccines for Leishmaniasis: From proteome to vaccine candidates. **Human Vaccines**, v. 7, n. February, p. 10–15, jan. 2011.

SCHWARZ, T. et al. T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SEYED, N.; TAHERI, T.; RAFATI, S. Post-genomics and vaccine improvement for Leishmania. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, n. APR, p. 1–13, 2016.

SHIN, H.; IWASAKI, A. Tissue-resident memory T cells. **Immunological reviews**, v. 255, n. 1, p. 165–81, set. 2013.

SILVA, L. A. et al. USE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DIAGNOSIS OF ASYMPTOMATIC Leishmania INFECTION IN A VISCERAL LEISHMANIASIS-ENDEMIC AREA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 101–4, 2013.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. P. Clinical and immunopathological spectrum of american cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239–251, 2004.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.

SOLANA, J. C. et al. Vaccination with a Leishmania infantum HSP70-II null mutant confers long-term protective immunity against Leishmania major infection in two mice models. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–26, 2017.

SRIVASTAVA, S. et al. Possibilities and challenges for developing a successful vaccine for leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–15, 2016.

STÄGER, S.; RAFATI, S. CD8+ T cells in Leishmania infections: Friends or foes? **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JAN, p. 1–8, 2012.

STARITA, C.; GAVAZZA, A.; LUBAS, G. Hematological, Biochemical, and Serological Findings in Healthy Canine Blood Donors after the Administration of CaniLeish® Vaccine. **Veterinary Medicine International**, v. 2016, 2016.

STEBUT, E. VON; TENZER, S. International Journal of Medical Microbiology
Cutaneous leishmaniasis : Distinct functions of dendritic cells and macrophages

in the interaction of the host immune system with *Leishmania major*.

International Journal of Medical Microbiology, n. September, p. 0–1, 2017.

STROWIG, T. et al. Inflammasomes in health and disease. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 278–286, 2012.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655–669, 2000.

TEIXEIRA-CARVALHO, A. et al. FC-TRIPLEX Chagas/Leish IgG1: A multiplexed flow cytometry method for differential serological diagnosis of Chagas disease and leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 10, n. 4, p. 1–15, 2015.

TEIXEIRA, M. C. A. et al. An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens.

Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 106, n. 2, p. 182–189, 2011.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F. et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. October, p. 2529, 2018.

UZONNA, J. E.; JOYCE, K. L.; SCOTT, P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 199, n. 11, p. 1559–66, 2004.

VALENTINE, K. M.; HOYER, K. K. CXCR5+ CD8 T Cells: Protective or Pathogenic? **Frontiers in Immunology**, v. 10, n. June, p. 1–10, 2019.

VAN AVONDT, K.; HARTL, D. Mechanisms and disease relevance of neutrophil extracellular trap formation. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 48, n. January, p. 1–10, 2018.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A. et al. Distinct roles for MyD88 and toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice. **Infection and**

Immunity, v. 77, n. 7, p. 2948–2956, 2009.

VEASEY, J. V. et al. Identification of *Leishmania* species by high-resolution DNA dissociation in cases of American cutaneous leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 95, n. 4, 2020.

VIANA, K. F. et al. Application of rapid in vitro co-culture system of macrophages and T-cell subsets to assess the immunogenicity of dogs vaccinated with live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites (LdCen-/-). **Parasites and Vectors**, v. 9, n. 1, p. 1–10, 2016.

VILLANI, A.-C.; SARKIZOVA, S.; HACOEN, N. Systems Immunology: Learning the Rules of the Immune System. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 813–842, 2018.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, 2011.

WHO/PAHO. No Title. 2019.

WHO. **WHO | Leishmaniasis.**, 2015.

WHO. WHO | Photos on leishmaniasis for download. 2016.

WHO. No Title. 2019.

WHO; AMERICAS/LEISHMANIASIS, R. O. FOR THE. **Manual de procedimientos para la vigilancia y control de las leishmaniasis.** [s.l.: s.n.].

WYLIE, C. E. et al. A systematic review of the efficacy of prophylactic control measures for naturally-occurring canine leishmaniosis, part I: Vaccinations. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 117, n. 1, p. 7–18, 2014.

ZAPH, C. et al. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. **Nature medicine**, v. 10, n. 10, p. 1104–1110, 2004.

ZHANG, J. R. et al. Pathogenic *Leishmania* spp. detected in lizards from

Northwest China using molecular methods. **BMC Veterinary Research**, v. 15, n. 1, p. 1–13, 2019.

APÊNDICE A – Participação em artigo publicado: Immunogenicity of Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes Derived From the Proteome of *Leishmania braziliensis*



ORIGINAL RESEARCH
published: 14 February 2020
doi: 10.3389/fimmu.2019.03145



Immunogenicity of Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes Derived From the Proteome of *Leishmania braziliensis*

Rafael de Freitas e Silva^{1,2}, Beatriz Coutinho de Oliveira², Ailton Alvaro da Silva², Maria Carolina Accioly Brezaz de Castro^{2,3}, Luiz Felipe Gomes Rebelo Ferreira⁴, Marcelo Zaldini Hernandes⁴, Maria Edileuza Felinto de Brito², Osvaldo Pompílio de-Melo-Neto⁵, Antônio Mauro Rezende⁵ and Valéria Régio Alves Pereira^{2*}

¹ Department of Natural Sciences, Universidade de Pernambuco, Garanhuns, Brazil, ² Department of Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil, ³ Parasitology Laboratory, Universidade Federal de Pernambuco, Vitória de Santo Antão, Brazil, ⁴ Department of Pharmaceutical Sciences, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ⁵ Department of Microbiology, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

Clarisa B. Palatnik-de-Sousa,
Federal University of Rio de Janeiro, Brazil

Reviewed by:

Rajiv Kumar,
Banaras Hindu University, India
Lenny Moise,
EpiVax, United States

*Correspondence:

Valéria Régio Alves Pereira
valeria@cpqam.fiocruz.br

Specialty section:

This article was submitted to Vaccines and Molecular Therapeutics, a section of the journal Frontiers in Immunology

Received: 02 May 2019

Accepted: 27 December 2019

Published: 14 February 2020

Citation:

e Silva RdF, de Oliveira BC, da Silva AA, Brezaz de Castro MCA, Ferreira LFG, Hernandes MZ, de Brito MEF, de-Melo-Neto OP, Rezende AM and Pereira VRA (2020) Immunogenicity of Potential CD4⁺ and CD8⁺ T Cell Epitopes Derived From the Proteome of *Leishmania braziliensis*. *Front. Immunol.* 10:3145. doi: 10.3389/fimmu.2019.03145

Background: A safe and effective vaccine against human leishmaniasis still requires the identification of better antigens for immunization and adequate models to evaluate the immune response. To support vaccine development, this work tested the immunogenicity of 10 different peptides derived from the proteome of *Leishmania braziliensis*, which were selected by their *in silico* affinity to MHC complexes.

Research design and Methods: Comparative cell proliferation assays were performed by culturing, in the presence of each peptide, PBMC cells from subclinical subjects (SC), cutaneous leishmaniasis patients with active disease (AD), post-treatment (PT) individuals, and healthy controls. Culture supernatants were then used for Th1, Th2, and Th17 cytokine measurements. Cells from selected PT samples were also used to assess the expression, by T cells, of the T-bet Th1 transcription factor.

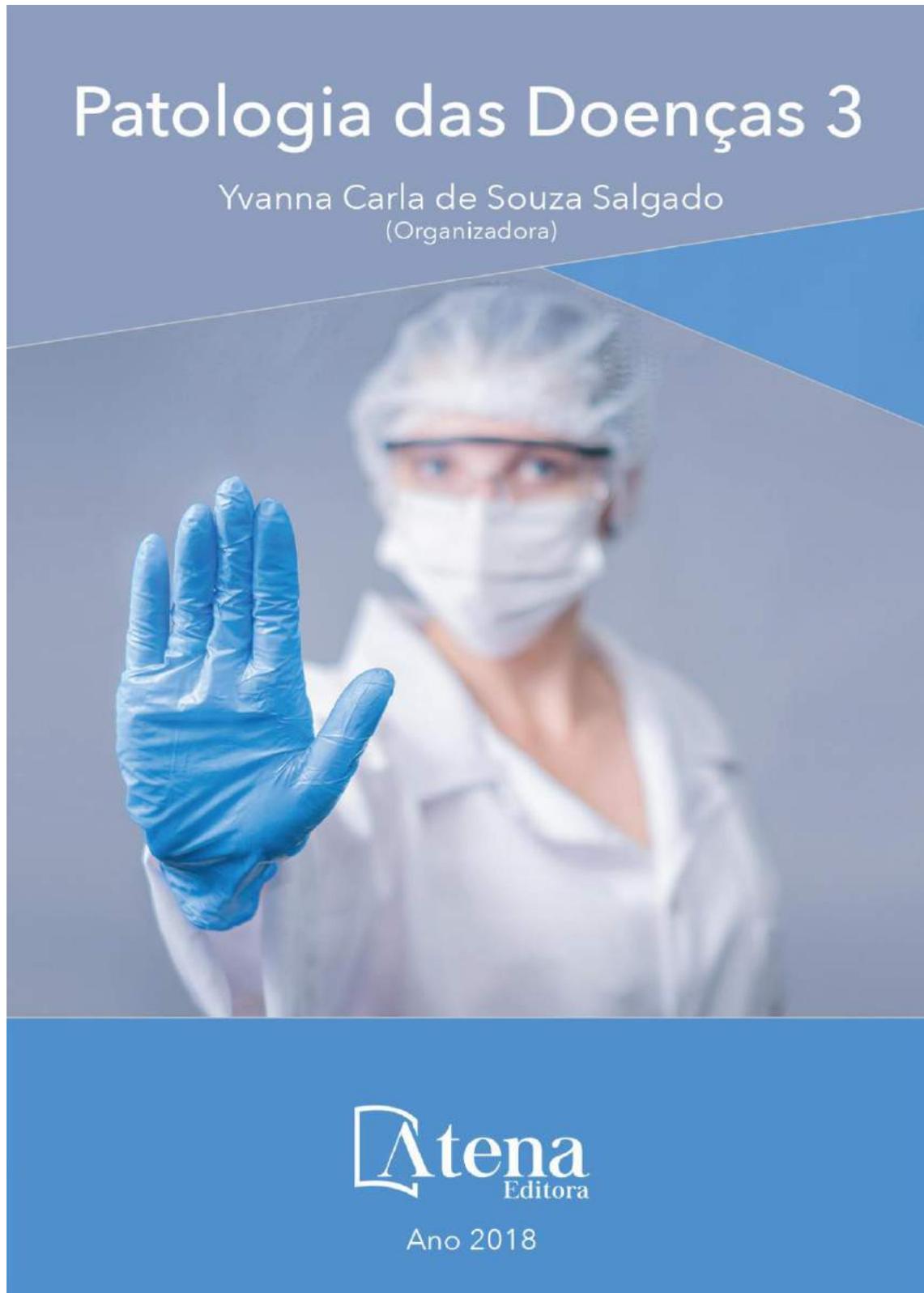
Results: A robust cell proliferation was observed for the SC group, for all the tested peptides. The levels of Th1 cytokines were peptide-dependent and had substantial variations between groups, where, for instance, IFN- γ and TNF levels were some of the highest, particularly on PT cultures, when compared to IL-2. On the other hand, Th2 cytokines displayed much less variation. IL-6 was the most abundant among all the evaluated cytokines while IL-4 and IL-10 could be found at much lower concentrations. IL-17 was also detected with variations in SC and AD groups. T-bet was up-regulated in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from the PT group after stimulation with all peptides.

Conclusions: The peptide epitopes can differentially stimulate cells from SC, AD, and PT individuals, leading to distinct immune responses.

Keywords: neglected diseases, cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, immunogenicity, CD4⁺ CD8⁺ T cell epitopes

APÊNDICE B – Publicação de capítulo de livro de eBook:

Avaliação da imunogenicidade de células dendríticas estimuladas com peptídeos recombinantes de *Leishmania Viannia braziliensis*



2018 by Atena Editora

Copyright © da Atena Editora

Editora Chefe: Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

Diagramação e Edição de Arte: Geraldo Alves e Natália Sandrini

Revisão: Os autores

Conselho Editorial

- Prof. Dr. Alan Mario Zuffo – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas
 Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília
 Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa
 Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná
 Prof. Dr. Darllan Collins da Cunha e Silva – Universidade Estadual Paulista
 Profª Drª Deusilene Souza Vieira Dall'Acqua – Universidade Federal de Rondônia
 Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná
 Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul
 Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria
 Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná
 Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
 Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice
 Profª Drª Juliane Sant'Ana Bento – Universidade Federal do Rio Grande do Sul
 Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense
 Prof. Dr. Jorge González Aguilera – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
 Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins
 Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte
 Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão
 Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará
 Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista
 Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará
 Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas
 Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande
 Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa
 Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) (eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)

P312 Patologia das doenças 3 [recurso eletrônico] / Organizadora Yvanna Carla de Souza Salgado. – Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018. – (Patologia das Doenças; v. 3)

Formato: PDF

Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader

Modo de acesso: World Wide Web

Inclui bibliografia

ISBN 978-85-85107-86-4

DOI 10.22533/at.ed.864181411

1. Doenças transmissíveis. 2. Patologia. I. Salgado, Yvanna Carla de Souza. II. Série.

CDD 616.9

Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores.

2018

Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

www.atenaeditora.com.br

CAPÍTULO 10

AVALIAÇÃO DA IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS ESTIMULADAS COM PEPTÍDEOS RECOMBINANTES DE *LEISHMANIA VIANNIA BRAZILIENSES*

Ailton Alvaro da Silva

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Rafael de Freitas e Silva

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.
Universidade de Pernambuco campus Garanhuns, 55294-902, Garanhuns, PE

Beatriz Coutinho de Oliveira

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.
Universidade Federal de Pernambuco – Centro Acadêmico de Vitória (CAV), Vitória de Santo Antão

Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira

Universidade Federal de Pernambuco campus Recife, Dept. de Ciências Farmacêuticas

Marcelo Zaldini Hernandes

Universidade Federal de Pernambuco campus Recife, Dept. de Ciências Farmacêuticas

Oswaldo Pompílio de Melo Neto

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Antônio Mauro Rezende

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

Valéria Rêgo Alves Pereira

Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE, 50.740-465, Cidade Universitária, Recife, PE, Brasil.

RESUMO: As leishmanioses são um grupo de doenças negligenciadas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidos pela picada de flebotômíneos infectados. O tratamento utiliza drogas que apresentam algumas limitações, com relatos de resistência dos parasitas. A vacinação, que vem como uma proposta promissora para o controle da doença, deve promover a correta ativação e geração de memória imunológica, e necessita da apresentação de um antígeno ideal por células dendríticas (DCs). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi analisar *in vitro*, a imunogenicidade de DCs murinas estimuladas com peptídeos derivados de proteínas de *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Para a produção das DCs, foram isoladas células de medula óssea (MO) de camundongos BALB/c. As células foram estimuladas com os peptídeos por 24h e 48h. Após esse período, as células foram marcadas com anticorpos monoclonais: anti-CD11c, anti-CD40, anti-MHC I e anti-MHC II, conjugados à fluorocromos, para análise por citometria de fluxo. Os resultados preliminares das análises demonstraram expressão de todos os marcadores nos intervalos de tempo testados, e é observada uma forte redução na expressão do CD11c, quando comparado ao grupo controle não estimulado. Estes resultados são promissores para futuros estudos de desenvolvimento de uma vacina eficaz no

controle das leishmanioses.

PALAVRAS-CHAVE: Vacina; Leishmaniose; Epítopos peptídicos.

ABSTRACT: Leishmaniasis is a group of neglected diseases caused by protozoans of the genus *Leishmania* and transmitted by the bite of infected sandflies. The drugs used for the treatment present some limitations, with reports of resistance of the parasite. Vaccination comes as a promising proposal to control the disease. It should be able to promote a proper activation and generation of immunological memory, requiring the presentation of an ideal antigen by dendritic cells (DCs). In this sense, the objective of this work was to analyze, *in vitro*, the immunogenicity of murine DCs stimulated with peptides derived from *Leishmania (Viannia) braziliensis* proteins. For the production of the DCs, bone marrow (BM) cells were isolated from BALB/c mice. These cells were stimulated with the peptides for 24h and 48h. After this period, the cells were labeled with monoclonal antibodies: anti-CD11c, anti-CD40, anti-MHC I, anti-MHC II, conjugated to fluorochromes, for flow cytometric analysis. Preliminary results have demonstrated expression of all markers at the time intervals which were tested and a strong reduction at the CD11c expression was observed when compared to the non-stimulated control group. These results are promising for future studies regarding the development of an effective vaccine to control the leishmaniasis.

KEYWORDS: Vaccine; Leishmaniasis; Peptide epitopes.

1 | INTRODUÇÃO

As leishmanioses representam um grupo de doenças tropicais negligenciadas (DTNs) presentes em cerca de 98 países, com relatos de aproximadamente 2 milhões de novos casos de pessoas infectadas por ano (WHO, 2015). Os agentes etiológicos responsáveis por essas doenças são protozoários do gênero *Leishmania* e sua transmissão ocorre no momento em que fêmeas de flebótomos infectadas realizam repasto sanguíneo e injetam os protozoários no hospedeiro vertebrado (MURRAY et al., 2005; WHO, 2015). A leishmaniose pode apresentar as manifestações clínicas tegumentar (LT), mucocutânea (LMC) e a visceral (LV) (CARVALHO et al., 2012).

No tratamento, as drogas de primeira escolha são os antimoniais, porém, são limitados por serem caros, altamente tóxicos e requerem repetidas doses para atingir a concentração ideal de tratamento (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010). Outro fator limitante é a resistência ao tratamento pelo parasita (MEHEUS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Neste contexto, uma vacina segura e eficiente se mostra uma opção de controle viável, uma vez que ela seria capaz de ativar corretamente o sistema imunológico e induzir resposta memória imunológicas adequadas. As células dendríticas (DCs) são as principais apresentadoras de antígenos e sua ativação é espécie específica (GHOSH; BANDYOPADHYAY, 2004). Foi visto que a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. (V.) braziliensis*) está relacionada com a ativação

das DCs e consequente ativação de linfócitos T efetores e a indução de uma resposta imune protetora (VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, 2008).

Ademais, frações antigênicas derivadas de outras espécies de *Leishmania* são capazes de induzir a ativação de DCs, estimulando a expressão de moléculas de MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (MASIC et al. 2012).

2 | LEISHMANIA: CICLO DE VIDA E MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

Existem pouco mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de causar a doença em humanos (BEAUMIER et al., 2013). Os principais vetores de transmissão do parasita no Velho e Novo Mundo são flebotomíneos do gênero *Phlebotomus* spp. e *Lutzomyia* spp., respectivamente (KILLICK-KENDRICK, 1999). Dentro desse ciclo complexo, também existem as chamadas espécies reservatórios naturais que são importantes no efeito de distribuição da carga parasitária em áreas silvestres.

O parasita pode se apresentar basicamente sob duas fases evolutivas: a promastigota e a amastigota. As formas promastigotas são flageladas, tem alto potencial infectivo e são transmitidas durante a picada do flebotomíneo infectado, onde são regurgitadas (DOSTÁLOVÁ; VOLF, 2012). No hospedeiro, as formas promastigotas após serem fagocitadas, transformam-se em amastigotas. As formas amastigotas se multiplicam através de divisão binária e devido ao grande número de parasitas que podem proliferar no interior das células, provocam o seu rompimento e então são capazes de infectar novas células adjacentes. O ciclo se completa quando o flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo, captando células infectadas para o interior de seu trato digestivo, reiniciando o ciclo (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011).

As leishmanioses possuem uma variedade de apresentações clínicas, desde formas tegumentares que podem acometer pele e mucosas, até formas viscerais potencialmente fatais se não tratadas (CARVALHO et al., 2012). Estima-se que ocorram 0,2 – 0,4 milhões de casos de LV e 0,7 – 1,2 milhões de casos de LT (ALVAR et al., 2012), e que provoque de 20 a 30 mil óbitos (WHO, 2015).

A forma cutânea ou tegumentar (LT) das leishmanioses é considerada a forma mais branda da doença e apresenta ampla distribuição em países e territórios do Velho e Novo Mundo (DAVID; CRAFT, 2009). A lesão se manifesta como uma úlcera ou nódulo único próximo ou na região de picada do flebotomíneo podendo se disseminar para áreas diferentes do corpo ou pode ser subclínica, (K. J. GOLLOB, 2008).

A LMC é uma manifestação clínica que causa grandes desfigurações e impactos psicossociais importantes, além dos danos provocados à saúde. A LMC é resultado da destruição crônica e progressiva de tecidos do nariz, boca, oro e naso-faringe e pálpebras. A doença pode progredir afetando a função respiratória e dificultar a nutrição do indivíduo acometido (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Desta maneira, infecções secundárias decorrentes de má nutrição levam muitos dos indivíduos acometidos pela

doença a óbito.

A LV ou Kala-azar é a forma mais letal, uma vez que é caracterizada por importantes danos viscerais, podendo levar o indivíduo a óbito. A disseminação dos parasitas do local de infecção para os fagócitos do sistema retículo endotelial leva ao acometimento do baço, fígado e, destacando-se, a medula óssea, sendo essa a grande característica da LV. A consequência deste tipo de proliferação dos parasitas é a hepatoesplenomegalia, além de uma supressão das funções da medula óssea (EVANS; KEDZIERSKI, 2012; JAIN; JAIN, 2015).

3 | MEDIDAS DE CONTROLE PARA AS LEISHMANIOSES

Uma das grandes barreiras existentes para o controle da leishmaniose é a falta de uma vacina eficaz e universalmente aceita, principalmente pelas dificuldades encontradas na sua produção. O que tem sido aplicado como estratégias de controle dessas doenças são: o diagnóstico, a quimioterapia com antimoniais e, preventivamente, o controle de vetores. (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012).

O diagnóstico é realizado por meio de uma associação de técnicas laboratoriais, para então se chegar a um diagnóstico seguro da doença. Em grande parte, a pesquisa de anticorpos anti-*Leishmania*, a cultura celular de amostras clínicas do indivíduo ou a detecção de material genético do parasita são as técnicas mais utilizadas (KOBETS; GREKOV; LIPOLDOVA, 2012). Contudo, necessitam de técnicas auxiliares para dar uma maior margem de segurança no diagnóstico. Os principais exemplos dessas técnicas auxiliares envolvem PCR ou suas variantes e a citometria de fluxo (OLIVEIRA et al., 2013; POURABBAS et al., 2013; SILVA et al., 2013).

O tratamento ocorre por meio de drogas não específicas para a doença e que não possuem seus mecanismos de ação elucidados completamente (SINGH; KUMAR; SINGH, 2012). A principal classe de drogas utilizadas há mais de 70 anos é a dos antimoniais pentavalentes. A consequência disso, aliada ao mau uso, se reflete no surgimento de parasitas resistentes nos últimos anos (MEHEUS et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2011). Adicionalmente, os antimoniais apresentam mais limitações, uma vez que tem custo elevado, requerem repetidas doses para alcançar um resultado satisfatório e estão frequentemente associados com efeitos adversos importantes (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2010).

Outra estratégia preventiva é o controle de vetores e dos reservatórios. Entretanto, só é efetiva sob determinadas condições, o que não é aplicável em todos os cenários epidemiológicos, pois há necessidade de infraestrutura e vigilância. Devido a todas as limitações apresentadas, sem dúvida a necessidade de uma vacina é a principal alternativa para controlar todas as formas da doença (COSTA et al., 2011).

4 | MECANISMOS IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NA INFECÇÃO

O estabelecimento da infecção é em grande parte dependente dos neutrófilos, que rapidamente fagocitam os parasitas, porém, permitem que eles ganhem acesso ao interior da célula. Contudo, como mecanismo de evasão, as formas promastigotas provocam a indução da apoptose de neutrófilos (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003) e com isso, os parasitas mascaram sua presença através da formação de corpos apoptóticos que não são reconhecidos pelo sistema imune.

As células dendríticas (DCs) dérmicas são capazes de fagocitar os parasitas nas primeiras horas após a infecção inicial. A população celular dominante 24 horas após o início da infecção é constituída basicamente de macrófagos dérmicos (NG et al., 2008). Um mecanismo de evasão se manifesta logo após a fagocitose de neutrófilos infectados e/ou apoptóticos por DCs no sítio inicial de entrada dos parasitas. Relatos de estudos recentes demonstram que há bloqueio da atividade de co-apresentação de antígenos pelas DCs (RIBEIRO- GOMES et al., 2015).

No estabelecimento da infecção é também observado o recrutamento de outros tipos celulares como monócitos. Os monócitos se diferenciam em células dendríticas, derivadas de monócitos (moDCs). Este tipo celular não necessariamente favorece a infecção, podendo também provocar uma resposta imunológica individual (CHARMOY et al., 2010). Porém, essas células tem alta atividade fagocítica, que, por sua vez, favorecem o crescimento e sobrevivência dos parasitas em seu interior. Por outro lado, as moDCs tem a capacidade de induzir uma resposta protetora do tipo Th1 através da produção de IL-12, citocina crucial neste tipo de resposta, além de expressar altas quantidades de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade classe II (MHC de Classe II) em sua superfície (DE TREZ et al., 2009).

No universo das leishmanioses, as interações complexas entre células do hospedeiro e moléculas do sistema imunológico modulam a resposta imunológica (DUTHIE et al., 2012). Os modelos murinos ajudam a compreender o importante papel das citocinas pró-inflamatórias da via Th1 na resistência e das citocinas da via Th2 associadas à susceptibilidade (DE LUCA; MACEDO, 2016). Em contrapartida, essa relação imunológica tem apresentado algumas discordâncias quando comparados os modelos murinos e os ensaios clínicos com seres humanos (OLIVEIRA et al., 2014).

Particularmente nas leishmanioses, os fatores de proteção têm sido relacionados principalmente com a presença de linfócitos T CD4⁺ com o perfil Th1 produzindo IFN- γ , TNF e IL-12. Essas citocinas são associados com a ativação de macrófagos e melhor controle da carga parasitária (LOEUILLET et al., 2016). Em contrapartida, o perfil Th2 tem sido relacionado com maior carga parasitária e inibição da produção de óxido nítrico por macrófagos ativados por IFN- γ . Esse fato se deve principalmente pelas citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β , levando também a uma inibição da diferenciação de linfócitos Th1 (GOMES- SILVA et al., 2007), principalmente por IL-10 (GAUTAM et al., 2011).

vivos atenuados ou mortos, como os critérios de segurança, reprodutibilidade e padronização das condições de cultura (DUTHIE et al., 2012; MODABBER, 2010). Neste sentido, alternativas ao uso dessas vacinas foram criadas no sentido de obter melhores resultados, como por exemplo, o “*gene targeting*” de genes de virulência em *Leishmania* spp. Nesta categoria são incluídas as vacinas produzidas com organismos geneticamente modificados, *knock-out* de genes de virulência de *Leishmania* spp. (COSTA et al., 2011). O sucesso no uso desses parasitas modificados é devido ao curto ciclo de vida, suficiente para induzir uma resposta imune específica, além de ser capaz de eliminar a infecção e não induzir doença no homem.

As vacinas, baseadas no uso de antígenos recombinantes, se mostram uma alternativa promissora, fornecem bons resultados e esclarecimentos quanto à segurança para uso em humanos e/ou animais. Diante disso, são feitas investigações da potencial imunogenicidade de antígenos de espécies de *Leishmania*. Alguns exemplos dos mais promissores foram: proteína 11 de membrana do kinetoplastídeo (AGALLOU et al., 2014; DE MENDONÇA; CYSNE-FINKELSTEIN; MATOS, 2015) e nucleosídeo hidrolase (NICO et al., 2014).

A proposta da imunização genética surgiu como uma alternativa interessante, visando induzir imunidade específica em hospedeiros. Nesse tipo vacinal é observado a capacidade de expressão seletiva de genes muito próximos a sua conformação nativa natural, indução de resposta imune celular específica, persistência da expressão do antígeno por um período, e, por fim, indução de células de memória para proteger contra reinfecção (TANG; DEVIT; JOHNSTON, 1992). Sem dúvidas, a vacinação com DNA tem como importante característica a indução conjunta de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e T CD4⁺ auxiliares e a produção de anticorpos (DAS; ALI, 2012).

Adicionalmente a isso, a combinação de vacinas DNA-proteínas também tem demonstrado ser uma alternativa promissora, como por exemplo associando diferentes estratégias para vacinação com DNA e com as proteínas KMP11, TRYP, LACK, e PAPLE22 (TODOLÍ et al., 2012). Uma vacina de DNA multiantigênica foi desenvolvida contendo KMP11, TRYP, LACK e GP63 para proteger cães contra LV causada por *L. infantum*. Após a imunização e o desafio com *L. infantum*, contudo, nem resposta celular nem humoral foram detectadas contra os antígenos (RODRÍGUEZ-CORTÉS et al., 2007).

6 | AS CÉLULAS DENDRÍTICAS: UM CANDIDATO A VACINA

As células apresentadoras de antígenos (APCs) tem papel fundamental na resposta imunológica, sobretudo contra a leishmaniose. As DC ganham destaque como uma importante classe de APCs para o sistema imunológico (LIU; UZONNA, 2010). A regulação da atividade das DCs parece ser espécie- específica, visto que algumas espécies de *Leishmania*, como a *L. majore* e a *L. donovani* são capazes de ativar as DCs

para expressarem moléculas co-estimulatórias e produzir IL-12 (GHOSH et al., 2006; WOELBING et al., 2006). Já a *L. (V.) braziliensis* está associada com forte indução de resposta imune, iniciada principalmente pela ativação de DCs e consequente ativação de linfócitos T efetores (VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, 2008).

Por essas características, diversos trabalhos têm utilizado DCs estimuladas com antígenos como estratégia no combate a diferentes tipos de doenças infecciosas, além do câncer (BROWNING, 2013; GARCÍA et al., 2013). Apesar disso, o número de estudos referentes ao desenvolvimento e investigação de vacinas para a leishmaniose que utilizam as DCs como modelos celulares carreadores de antígeno é limitado (COSTA et al., 2011). As DCs são derivadas de precursores medulares e são encontradas nos tecidos do organismo em um estado imaturo. Sua ativação ocorre no momento em que entram em contato com antígenos, provocando um amadurecimento, de forma a passarem a expressar diversos marcadores de superfície, sobretudo MHC de classe II e moléculas co-estimulatórias (OLEX et al., 2010).

Ainda falta uma maior compreensão dos fatores que governam os mecanismos de ação das DCs. O que está bem estabelecido experimentalmente, é que uma das maneiras pelas quais as DCs agem é por meio da indução dos diferentes subtipos efetores de linfócitos T helper (Th) (KLECHEVSKY et al., 2008), sendo os linfócitos Th1 produtores de INF- γ , associados com a resistência à infecção por *Leishmania* (DARRAH et al., 2010). A sinalização via Toll Like Receptors (TLR) é uma das responsáveis por induzir a secreção de citocinas pelas DCs, estimulando uma resposta do tipo Th1 (SOONG, 2008). O DNA CpG atua como uma das moléculas que se ligam ao TLR-9, e trabalhos realizados por vários grupos de pesquisa demonstraram que a utilização de DNA CpG com parasitas de *Leishmania* vivos ativam as DCs dérmicas a produzirem citocinas, especialmente a IL-6 (WENHUI WU, LUISE WEIGAND, 2009). A IL-6 induz diferentes efeitos, agindo como fator de diferenciação para linfócitos, células mesangiais e linfócitos Th17.

Nesse contexto, o desafio no estudo da abordagem de vacinas utilizando DCs é o encontro de antígenos ideais. Sendo assim, métodos clássicos desenvolvidos anteriormente na área de vacinas foram realizados para essa finalidade. Em contrapartida, há uma série de limitações desses métodos que dificultam o processo como um todo. Portanto, métodos modernos de investigação aplicando ferramentas de bioinformática têm sido utilizados para a pesquisa e desenvolvimento de vacinas (FLOWER, 2013).

7 | VACINOLOGIA REVERSA: UMA NOVA FORMA DE PENSAR VACINAS

Nos últimos anos, têm sido crescente o número de sequências genômicas de patógenos ao homem e animais registrados em bancos de dados. O fácil acesso a muitas dessas sequências permite a escolha racional de antígenos utilizando métodos

computacionais, ou *in silico*. Um grande exemplo disso é a vacinologia reversa (SETTE, 2010).

A vacinologia reversa teve sua primeira aplicação no desenvolvimento de uma vacina contra o meningococo B (MenB), onde foi possível a identificação de 600 antígenos em potencial, que foram expressos em *Escherichia coli* e testados com soro de animais imunizados. Destes, foram identificados 90 novos antígenos que nunca tinham sido descritos na literatura, onde 29 apresentaram capacidade de induzir anticorpos capazes de destruir a bactéria *in vitro*. (GIULIANI et al., 2006).

Ao comparar com a vacinologia clássica, que só tinha chegado a 5 antígenos com atividade bactericida (TETTELIN et al., 2000), a vacinologia reversa se mostrou muito promissora ao fazer a busca no genoma dos parasitas. Além de identificar antígenos com potencial protetor, ela também permite avaliar o papel biológico de novas proteínas nos patógenos (LAUER et al., 2005; MADICO et al., 2006).

A maioria das doenças parasitárias necessitam da imunidade celular com linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, sendo um dos componentes principais para prevenção ou controle (DUTHIE et al., 2012; SACKS, 2014). Nesse sentido, a vacinologia reversa é capaz de identificar epítomos em potencial presentes em proteínas codificadas por patógenos e que podem ser reconhecidos por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (GROOT et al., 2009), uma vez que essa metodologia utiliza ferramentas capazes de realizar a predição da ligação de peptídeos especificamente às moléculas do MHC.

Nesse contexto, há diversos trabalhos procurando identificar antígenos de *Leishmania* spp. com base em vacinologia reversa. Alguns deles utilizaram métodos lineares e/ou estruturais na busca de epítomos no proteoma de diferentes espécies de *Leishmania* (MUTISO et al., 2013; FREITAS-SILVA et al., 2016). Em paralelo, outro trabalho concentrou esforços para identificar potenciais epítomos contidos em proteínas candidatas já previamente identificadas (MARIA et al., 2013). Mais tarde, foi desenvolvida de uma vacina com múltiplos epítomos de *Leishmania* (AGALLOU et al., 2014).

8 | IMUNOGENICIDADE DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MEDIADA POR EPÍTOPOS VACINAIS

Embora a *L. (V). braziliensis* seja uma das principais espécies responsáveis pelos casos endêmicos de leishmaniose tegumentar e mucocutânea no Brasil, grande parte dos trabalhos se concentra no uso de antígenos de outras espécies como *L. major*, *L. amazonensis* ou *L. donovani* (NANDA, 2009; SCHWARZ et al., 2013). As frações antigênicas possuem grande quantidade de moléculas do parasita e não são ideais para serem utilizadas como abordagem vacinal. Assim, o ideal é a busca de moléculas únicas ou uma combinação que seja capaz de estimular uma resposta protetora e de memória. Devido ao potencial das DCs para a abordagem vacinal e

diante da complexidade de encontrar um antígeno ideal, nosso grupo de pesquisa avaliou o efeito de epítomos peptídicos de *L. (V) braziliensis* em células dendríticas derivadas de medula óssea (BMDCs) em um modelo murino. Esses epítomos foram gerados, utilizando-se uma combinação de métodos *in silico*, considerando epítomos de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ no proteoma predito de *L. (V) braziliensis* (FREITAS-SILVA et al., 2016).

O estímulo de BMDCs com esses epítomos indicaram uma indução da expressão de moléculas de MHC classe I, MHC de classe II e CD40 nas primeiras 24h. Além disso, foi analisada a expressão das moléculas em BMDCs: negativas para o marcador CD11c e positivas para CD11c. Essa molécula, citada anteriormente, representa um marcador específico de DCs. Entretanto, observou-se uma redução nos níveis de expressão de MHC de classe I, MHC de classe II e CD40 nas BMDC CD11c⁺ estimuladas por 48h com os epítomos.

De modo geral, em células CD11c⁺, há uma forte redução na expressão dos marcadores anteriormente citados em células controle, nos tempos de 24h e 48h. Contudo, o percentual de células positivas para MHC II e CD40 foi maior que o do controle para ambos os intervalos investigados. Isso indica que durante a ativação dessas células há diminuição da expressão de CD11c (SINGH-JASUJA et al., 2013). Nesse mesmo trabalho, as amostras estimuladas com antígeno total de *L. (V) braziliensis* também expressaram altos níveis dos marcadores. Entretanto, para as amostras estimuladas com os peptídeos, observou-se uma diminuição nos níveis de expressão de MHC I, MHC II e CD40.

Os peptídeos, possivelmente induziram ativação na população de BMDCs CD11c⁺ e redução na expressão dos marcadores analisados MHC I, MHC II e CD40. Por outro lado, níveis crescentes de MHC II e CD40 foram observados na população de células BMDCs CD11c⁻ para os intervalos de tempo. A ativação do CD40 é uma das principais vias que estimulam a produção de IL-12, consequentemente, estimula o perfil Th1 com produção de IFN- γ e resistência a *L. major* (OKWOR; UZONNA, 2016).

Além de marcadores de superfície, foi observado que os epítomos foram capazes de induzir produção de citocinas importantes por BMDCs. Foram identificados níveis elevados das citocinas TNF e IL6 quando comparados com o controle. Em contrapartida, baixos níveis de citocinas foram encontrados para as células estimuladas com o antígeno total de *L. (V) braziliensis*, exceto IL-6 após 48h, nos quais os níveis foram maiores do que o controle. Níveis consideráveis de TNF e IL-6 também foram produzidos pelos controles, principalmente a IL-6. A produção crescente de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-6 e TNF por BMDC foi relatada após estimulação com lipopolissacárido (LPS) (ABDI; SINGH; MATZINGER, 2013; BOONSTRA et al., 2006; GEISEL et al., 2007; HELFT et al., 2015).

A IL-6 parece exercer um duplo papel como citocina pró-inflamatória e também de prevenir os perfis de células T reguladoras que podem estar associados à exacerbação da doença (COSTA et al., 2013; KIMURA; KISHIMOTO, 2010). Não só considerando

as principais citocinas envolvidas com o perfil de células Th1, mas também com a ausência ou os baixos níveis das outras citocinas do perfil de células Th2 e Th17, é provável que exista um potencial dos peptídeos em promover uma resposta imune, que culminaria com a proteção contra LT.

9 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

As leishmanioses ainda representam um sério problema de saúde pública nos países tropicais e subtropicais em desenvolvimento. Seu tratamento atual enfrenta limitações causadas pela elevada toxicidade, alto custo, muitas vezes com necessidade de internamento e a crescente resistência de cepas do parasita. Considerando esse fato e a importante relação entre a resposta imune e o desenvolvimento da doença, faz-se necessário medidas alternativas para o seu combate. A vacinação é uma abordagem promissora como medida de controle, uma vez que tem o papel de promover uma correta ativação do sistema imunológico e geração de memória imunológica, pré-requisitos fundamentais de proteção contra a doença. Entretanto, as vacinas tradicionais de primeira geração podem apresentar limitações que impedem o seu avanço e a produção segura. Métodos modernos *in silico*, como a bioinformática e o *docking* molecular, são essenciais para discriminar e identificar potenciais moléculas candidatas para uso como vacina contra as leishmanioses. O presente trabalho utilizou epítomos potenciais para linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, selecionados a partir do proteoma de *L. (V.) braziliensis*, já descrito em trabalho prévio de nosso grupo (FREITAS-SILVA et al., 2016). Esses epítomos até o momento se mostraram bons candidatos para uma vacina segura e eficaz contra a doença. Para uma estratégia vacinal ser bem sucedida é crucial que os mecanismos de resposta imunológica protetora e da geração e manutenção de células de memória imunológica, sejam bem compreendidos. A compreensão desses mecanismos constitui um dos aspectos mais negligenciados durante o desenvolvimento da vacina.

REFERÊNCIAS

- ABDI, K.; SINGH, N. J.; MATZINGER, P. LPS Activated Dendritic cells: "Exhausted" or alert and waiting? DCs: "Exhausted", alerted or waiting? v. 188, n. 12, p. 5981–5989, 2013.
- AGALLOU, M. et al. Experimental validation of multi-epitope peptides including promising MHC class I- and II-restricted epitopes of four known *Leishmania infantum* proteins. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. JUN, 2014.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- AWATE, S.; BABIUK, L. A.; MUTWIRI, G. Mechanisms of action of adjuvants.

- Frontiers in Immunology**, v. 4, n. MAY, p. 1–10, 2013.
- BEAUMIER, C. M. et al. New vaccines for neglected parasitic diseases and dengue. **Translational Research**, v. 162, n. 3, p. 144–155, 2013.
- BOONSTRA, A. et al. Macrophages and myeloid dendritic cells, but not plasmacytoid dendritic cells, produce IL-10 in response to MyD88- and TRIF- dependent TLR signals, and TLR-independent signals. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 177, n. 11, p. 7551–8, 2006.
- BROWNING, M. J. Antigen presenting cell/ tumor cell fusion vaccines for cancer immunotherapy. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 9, n. 7, p. 1545– 8, 2013.
- CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.
- CHARMOY, M. et al. Neutrophil-derived CCL3 is essential for the rapid recruitment of dendritic cells to the site of Leishmania major inoculation in resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 2, 2010.
- COSTA, C. H. N. et al. Vaccines for the leishmaniases: proposals for a research agenda. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 5, n. 3, p. e943, jan. 2011.
- COSTA, D. L. et al. Characterization of regulatory T cell (Treg) function in patients infected with Leishmania braziliensis. **Human Immunology**, v. 74, n. 12, p. 1491–1500, 2013.
- DARRAH, P. A. et al. IL-10 production differentially influences the magnitude, quality, and protective capacity of Th1 responses depending on the vaccine platform. **The Journal of experimental medicine**, v. 207, n. 7, p. 1421–33, 2010.
- DAS, A.;ALI, N. Vaccine prospects of killed but metabolically active Leishmania against visceral leishmaniasis. **Expert review of vaccines**, v. 11, n. 7, p. 763– 5, 2012.
- DAVID; CRAFT. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 293–307, 2009.
- DE LUCA, P. M.; MACEDO, A. B. B. Cutaneous leishmaniasis vaccination: A matter of quality. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. APR, p. 1–8, 2016.
- DE MENDONÇA, S. C. F.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; MATOS, D. C. DE S.
- Kinetoplastid membrane protein-11 as a vaccine candidate and a virulence factor in Leishmania. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. OCT, p. 1–6, 2015.
- DE TREZ, C. et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic Leishmania major infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.
- DOSTÁLOVÁ, A.; VOLF, P. Leishmania development in sand flies: parasite- vector interactions overview. **Parasites & vectors**, v. 5, p. 276, 2012.
- DUTHIE, M. S. et al. The Development and Clinical Evaluation of Second- Generation Leishmaniasis Vaccines. v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012.
- EVANS, K. J.; KEDZIERSKI, L. Development of vaccines against visceral leishmaniasis. **Journal of Tropical Medicine**, v. 2012, 2012.
- FLOWER, D. R. Designing immunogenic peptides. **Nature chemical biology**, v. 9, n. 12, p. 749–53, 2013.

FREITAS-SILVA et al. Combination of in silico methods in the search for potential CD4+ and CD8+ T cell epitopes in the proteome of *Leishmania braziliensis*. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. AUG, 2016.

GARCÍA, F. et al. A Dendritic Cell-Based Vaccine Elicits T Cell Responses Associated with Control of HIV-1 Replication. **Science translational medicine**, v. Vol. 5, n. Issue 166, p. 166ra2, 2013.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GEISEL, J. et al. Agonist Tolerance and Cross-Tolerance in Dendritic Cells 1.

The Journal of Immunology, v. 179, n. 9, p. 5811–8, 2007.

GHOSH, M. et al. *Leishmania donovani* infection of human myeloid dendritic cells leads to a Th1 response in CD4+ T cells from healthy donors and patients with kala-azar. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 3, p. 294–301, 2006.

GHOSH, M.; BANDYOPADHYAY, S. Interaction of *Leishmania* parasites with dendritic cells and its functional consequences. **Immunobiology**, v. 209, n. 1–2, p. 173–177, 2004.

GIULIANI, M. M. et al. A universal vaccine for serogroup B meningococcus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 29, p. 10834–9, 2006.

GLENNIE, N. D. et al. Skin-resident memory CD4 + T cells enhance protection against *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 9, p. 1405–1414, 2015.

GOMES-SILVA, A. et al. Can interferon- γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, n. 3, p. 440–444, 2007.

GONZALEZ-LOMBANA, C. et al. IL-17 Mediates Immunopathology in the Absence of IL-10 Following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 3, 2013.

GROOT, A. S. DE et al. **Epitope-Based Immunome-Derived Vaccines: A Strategy for Improved Design and Safety**. [s.l: s.n.].

GURSEL, M.; GURSEL, I. Development of CpG ODN Based Vaccine Adjuvant Formulations. v. 6, p. 221–244, 2016.

HANDMAN, E. Leishmaniasis: Current Status of Vaccine Development. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 14, n. 2, p. 229–243, 2001.

HELFT, J. et al. GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Resource GM-CSF Mouse Bone Marrow Cultures Comprise a Heterogeneous Population. p. 1197–1211, 2015.

JAIN, K.; JAIN, N. K. Vaccines for visceral leishmaniasis: A review. **Journal of Immunological Methods**, v. 422, p. 1–12, 2015.

K. J. GOLLOB. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. v. 76, n. October 2009, p. 211–220, 2008.

KHATAMI, A. et al. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: A systematic review of the randomized controlled trials. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 57, n. 2, 2007.

- KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of Phlebotomine sand flies. *Clinics in Dermatology*, v. 17, n. 3, p. 279–289, 1999.
- KIMURA, A.; KISHIMOTO, T. IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology*, v. 40, n. 7, p. 1830–1835, jul. 2010.
- KLECHEVSKY, E. et al. Functional Specializations of Human Epidermal Langerhans Cells and CD14+ Dermal Dendritic Cells. *Immunity*, v. 29, n. 3, p. 497–510, 2008.
- KOBETS, T.; GREKOV, I.; LIPOLDOVA, M. Leishmaniasis: Prevention, Parasite Detection and Treatment. *Current Medicinal Chemistry*, v. 19, n. 10, p. 1443–1474, 2012.
- KOCOURKOVA et al. Vaccine Ingredients: Components That Influence Vaccine Efficacy. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 2016.
- LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes? *Trends in Microbiology*, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.
- LAUER, P. et al. Genome analysis reveals pili in Group B Streptococcus. n. July, p. 95420, 2005.
- LIU, D.; UZONNA, J. E. The p110 delta isoform of phosphatidylinositol 3-kinase controls the quality of secondary anti-Leishmania immunity by regulating expansion and effector function of memory T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 184, n. 6, p. 3098–105, 2010.
- LOEUILLET, C. et al. Study of Leishmania pathogenesis in mice: experimental considerations. *Parasites & Vectors*, v. 9, n. 1, p. 144, dez. 2016.
- LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 182, n. 5, p. 3039–46, mar. 2009.
- MADICO, G. et al. The Meningococcal Vaccine Candidate GNA1870 Binds the Complement Regulatory Protein Factor H and Enhances Serum Resistance. *J Immunol*, v. 1, n. 177, p. 501–510, 2006.
- MARIA, A. et al. In silico prediction of promiscuous Leishmania infantum KMP- 11, H1, LeIF, CPA, CPB peptides and experimental validation of eliciting CD4+ and CD8+ T-cell specific responses. *Frontiers in Immunology*, v. 4, 2013.
- MCCALL, L. I. et al. Leishmanization revisited: Immunization with a naturally attenuated cutaneous Leishmania donovani isolate from Sri Lanka protects against visceral leishmaniasis. *Vaccine*, v. 31, n. 10, p. 1420–1425, 2013.
- MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. *Qjm*, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.
- MEHEUS, F. et al. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 9, 2010.
- MODABBER, F. Leishmaniasis vaccines: Past, present and future. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 36, n. SUPPL. 1, p. S58–S61, 2010.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. [Review]. *Lancet*, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- MUTISO, J. M. et al. Development of Leishmania vaccines: predicting the future from past and present experience. *Journal of biomedical research*, v. 27, n. 2, p. 85–102, 2013.

- NANDA, T. K. AND N. K. Protective Response to *Leishmania major* in BALB/c Mice Requires Antigen Processing in the Absence of DM1. **J Immunol**, v. 76, n. October 2009, p. 211–220, 2009.
- NASCIMENTO, M. S. L. ET AL. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **The Journal of infectious diseases**, 2015.
- NG, L. G. et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. **PLoS pathogens**, v. 4, n. 11, 2008.
- NICO, D. et al. Cross-protective immunity to *Leishmania amazonensis* is mediated by CD4+ and CD8+ epitopes of *Leishmania donovani* nucleoside hydrolase terminal domains. **Frontiers in Immunology**, v. 5, n. MAY, p. 1–10, 2014.
- NOVAIS, F. O. et al. CD8 + T Cells Lack Local Signals To Produce IFN- γ in the Skin during *Leishmania* Infection. 2018.
- OKWOR, I.; UZONNA, J. E. Pathways leading to interleukin-12 production and protective immunity in cutaneous leishmaniasis. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 32–36, 2016.
- OLEX, A. L. et al. Dynamics of dendritic cell maturation are identified through a novel filtering strategy applied to biological time-course microarray replicates. **BMC Immunology**, v. 11, n. 1, p. 19–41, 2010.
- OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.
- OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. v. 76, n. October 2009, p. 211–220, 2014.
- OLIVEIRA, A. P. DE et al. Author's personal copy Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. 2013.
- PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.
- POURABBAS, B. et al. Quantification of *Leishmania infantum* kinetoplast DNA for monitoring the response to meglumine antimoniate therapy in visceral leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 88, n. 5, p. 868–871, 2013.
- 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 & disease**, v. 6, p. e2018, 2015.
- RODRÍGUEZ-CORTÉS, A. et al. Vaccination with plasmid DNA encoding KMP11, TRYP, LACK and GP63 does not protect dogs against *Leishmania infantum* experimental challenge. **Vaccine**, v. 25, n. 46, p. 7962–7971, 2007.
- SCHWARZ, T. et al. T Cell-Derived IL-10 Determines Leishmaniasis Disease Outcome and Is Suppressed by a Dendritic Cell Based Vaccine. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 6, 2013.
- SETTE, A. Reverse Vaccinology: Developing Vaccines in the Era of Genomics. **Immunity**, v. 33, n. 4, p. 530–541, 2010.
- SHIN, H.; IWASAKI, A. Tissue resident T cells. v. 255, n. 1, p. 165–181, 2013.

- SILVA, L. A. et al. USE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION FOR THE DIAGNOSIS OF ASYMPTOMATIC Leishmania INFECTION IN A VISCERAL LEISHMANIASIS-ENDEMIC AREA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, n. 2, p. 101–4, 2013.
- SINGH-JASUJA, H. et al. Immunobiology The mouse dendritic cell marker CD11c is down-regulated upon cell activation through Toll-like receptor triggering. **Immunobiology**, v. 218, n. 1, p. 28–39, 2013.
- SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485–497, 2012.
- SOONG, L. Modulation of dendritic cell function by Leishmania parasites. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4355–4360, 2008.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Antimony toxicity. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, n. 12, p. 4267–4277, 2010.
- TANG, D. C. .; DEVIT, M. .; JOHNSTON, S. A. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. **Nature**, v. 358, n. 30 July, p. 417– 421, 1992.
- TETTELIN, H. et al. Complete Genome Sequence of Neisseria meningitidis Serogroup B Strain MC58. **Science**, v. 287, n. 5459, p. 1809–1815, 2000.
- THORPE, C. et al. Discovery of a vaccine antigen that protects mice from Chlamydia pneumoniae infection. **Vaccine**, v. 25, n. 12, p. 2252–2260, 2007.
- TODOLÍ, F. et al. Head-to-Head Comparison of Three Vaccination Strategies Based on DNA and Raw Insect-Derived Recombinant Proteins against Leishmania. **PLoS ONE**, v. 7, n. 12, 2012.
- VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. Leishmania braziliensis infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 180, n. 11, p. 7537–7545, 2008.
- WENHUI WU, LUISE WEIGAND, AND S. M. The IL-6-deficient mouse exhibits impaired lymphocytic responses to a vaccine combining live Leishmania major and CpG oligodeoxynucleotides. v. 76, n. October 2009, p. 211–220, 2009.
- WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of Leishmania: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 647–662, 2011.
- WHO. **WHO I Leishmaniasis.**, 2015.
- WOELBING, F. et al. Uptake of Leishmania major by dendritic cells is mediated by Fcγ receptors and facilitates acquisition of protective immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 203, n. 1, p. 177–188, 2006.

ANEXO I – Parecer do comitê de ética em pesquisa com seres humanos

Título do Projeto: "Avaliação In Vitro da Resposta Imunológica de Pacientes com Leishmaniose Utilizando Antígenos Recombinantes"
Pesquisador responsável: Valéria Rêgo Alves Pereira
Instituição onde será realizado o projeto: CPqAM/Fiocruz
Data de apresentação ao CEP: 10/01/2014
Registro no CAAE: 19252013.2.0000.5190
Número do Parecer PlatBr: 522.964

PARECER

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução CNS 196/96, e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP e este parecer tem validade até 05 de fevereiro de 2017.

Em caso de necessidade de renovação do Parecer, encaminhar relatório e atualização do projeto.

Recife, 13 de fevereiro de 2014.

Coordenadora do CEP/CPqAM

ANEXO II – Termo aditivo do comitê de ética em pesquisa com seres humanos



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

Fwd: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

----- Forwarded message -----

De: **Equipe Plataforma Brasil** <plataformabrasil@saude.gov.br>

Date: qua, 26 de jun de 2019 às 16:31

Subject: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

To: Val?ria Pereira Hernandes <valeriaph@gmail.com>

Caro (a) Pesquisador (a) e Assistente(s),

O projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA foi aceito para análise no CEP. Significa que o CEP concluiu a validação documental de sua última submissão, por favor verifique a situação do projeto de pesquisa e atenda a possíveis pendências documentais, se existirem. Caso contrário aguarde o parecer consubstanciado do CEP, cujo o nome pode ser consultado no campo localização atual do projeto, disponível no item detalhar.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

Siga **Ética em Pesquisa** nas Redes Sociais:

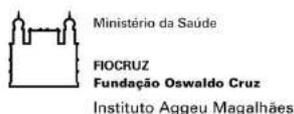
[Instagram](#)

[Facebook](#)

[Twitter](#)

[LinkedIn](#)

ANEXO III - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo porque mora em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado(a) por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como o(a) senhor(a) faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a). Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o senhor tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que serão prescritas pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. (A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,..... ,
li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

Assinatura do paciente

data

Endereço do paciente para contato

data

Assinatura do pesquisador responsável

data

Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Pereira Hernandes):
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av.
Moraes Rêgo, s/n, Recife, fone: (81) 21012631.

ANEXO IV - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente Menor de 18 anos



Termo de Assentimento Livre e Esclarecido— Grupo Paciente Menor de 18 anos

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como responsável pelo menor, o(a) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo devido ao mesmo se encontrar no grupo de pacientes menores de 18 anos. Será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a) que é responsável pelo menor. Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o paciente menor de idade tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que será prescrita pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor, o senhor deverá levar o menor ao médico do posto de saúde. O(A) senhor(a) não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que o menor realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor, o menor por quem o(a) senhor(a) é responsável e os outros membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário.

O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o consentimento do menor, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter como responsável pelo menor sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

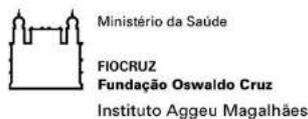
Eu,.....
, responsável pelo
 menor.....

....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

_____	_____
Assinatura do menor	data
_____	_____
Assinatura do responsável pelo menor	data
_____	_____
Endereço do responsável pelo menor	data
_____	_____
Assinatura do pesquisador responsável	data
_____	_____
Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ	data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Pereira Hernandes):
 Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes
 Rêgo, s/n, Recife, fone: (81) 21012631.

ANEXO V - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor está sendo convidado(a) a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença, e reside em região em que não é endêmica para a doença, e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Ao senhor(a) será solicitada uma única coleta de sangue de 20 ml o que equivale a duas colheres de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o(a) senhor(a) concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

Assinatura do voluntário

data

Endereço do voluntário

data

Assinatura do pesquisador responsável

data

Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira):

Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/n, Recife, fone: (81) 21012631.