

## AVALIAÇÃO DO PERFIL IMUFENOTÍPICO DE CÉLULAS T CD8 NA INFECÇÃO HUMANA POR *Leishmania* sp.

Angela Maria Comapa BARROS<sup>1</sup>

Antonia Maria Ramos FRANCO<sup>3</sup>

Ilder Breno dos Santos SILVA<sup>4</sup>

Nicolle Tayná Brandão dos SANTOS<sup>5</sup>

Gabriel Affonso Somavilla de GRANDE<sup>6</sup>

Thais Tibery ESPIR<sup>2</sup>

<sup>1, 4, 5</sup>Bolsista PIBIC/CNPq; <sup>6</sup>Bolsista PAIC/FAPEAM ;

<sup>2</sup>Orientadora Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/INPA/CSAS;

<sup>3</sup>Colaboradora Pesquisadora do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas/INPA/CSAS

### INTRODUÇÃO

O sistema imune atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares (Carvalho *et al.* 2012). A geração de uma resposta imune adequada durante processo infeccioso é o ponto crucial para direcionar a progressão ou cura da doença; ou ainda, no caso específico das leishmanioses, para um padrão assintomático da infecção. A resposta imune à *Leishmania* é iniciada no local de entrada do parasito através das células sentinelas, como macrófagos, neutrófilos e células dendríticas, onde as formas promastigotas são interiorizadas, promovendo a ativação da resposta (Gordon 2009).

Nos seres humanos há diferentes formas clínicas na infecção por *Leishmania*, que são definidas por características do parasito e da resposta imune celular do hospedeiro, que dependendo da sua eficiência, leva a cura clínica e controle da infecção (Silveira *et al.* 2009). O aumento na produção de linfócitos T CD8+ em infecções por *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* parece contribuir para a imunopatologia da doença e estão associados a um tipo de resposta imune exagerada (Ruiz 2007). Nesse trabalho, tivemos como objetivo verificar o papel dos linfócitos T CD8+ nas infecções por *Leishmania* sp. antes do início do tratamento preconizado pelo Ministério da Saúde. Detectando a participação das células CD8+ no curso clínico da infecção por *Leishmania* sp. com o acompanhamento do crescimento parasitário no meio NNN (Neal *et al.* 1904; Nicolle 1908), realizando imunofenotipagem por citometria de fluxo, além de comparar o padrão da resposta imune de pacientes infectados com o controle.

### MATERIAL E MÉTODOS

**Tipo de Estudo:** Foi realizado um estudo descritivo transversal, multicêntrico, realizado no Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do INPA e no Laboratório de Pesquisa da Fundação de Hematologia e Hemoterapia do Amazonas (HEMOAM). A presente pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética em pesquisa do INPA e aprovado sob o protocolo de número 006/2010. O crescimento parasitário e testes laboratoriais parasitológicos foram realizados no INPA e os testes imunológicos no HEMOAM.

**Casos clínicos:** Foram incluídos 11 pacientes diagnosticados com LTA e cinco indivíduos sem infecção (controle), provenientes do município de Rio Preto da Eva-AM. O diagnóstico foi baseado nos dados epidemiológicos e exames clínicos associados à positividade de um dos exames laboratoriais.

**Critérios de inclusão dos casos:** Foram incluídos na pesquisa indivíduos que apresentarem primo-infecção (LTA), maiores de 18 anos, de ambos os sexos.

**Critérios de inclusão dos controles negativos:** Foram incluídos nesse grupo indivíduos sadios de ambos os sexos, maiores de 18 anos, residentes no município de Rio Preto da Eva-AM, sem histórico de LTA e que não estejam fazendo uso de medicamentos.

**Critérios de exclusão:** Foram excluídos deste estudo indivíduos com história pregressa de LTA, mulheres grávidas, menores de 18 anos e indivíduos de ambos os sexos que estejam fazendo uso de medicamentos. Todos os indivíduos incluídos nos grupos de estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) aceitando participar do estudo.

**Amostras biológicas para Citômetro de fluxo:** Foi coletado 4 mL de sangue periférico dos pacientes e dos controles para realização dos testes imunológicos e foram inseridos nos tubos com anticoagulante EDTA. O sangue dos pacientes antes do tratamento foi colhido no momento que o mesmo procurar o serviço de saúde.

**Amostra biológica para diagnóstico de LTA:** Foi retirada uma amostra da lesão de cada paciente após escarificação e semeadas em meio NNN e após sete dias foi retirado uma alíquota e cultivada em meio RPMI mais 10% de SFB. E para o exame direto foi retirado uma amostra da linfa da borda da lesão e foi feito esfregaço em uma lâmina para ser analisado em microscópio.

**Técnica de Imunofenotipagem por citometria de fluxo:** As células (CD3 e CD8) foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados a fluorocromos que se ligam a epítomos específicos que são analisados pelo Citômetro de Fluxo FACSCalibur®.

**Leitura e análises estatísticas:** Os resultados foram analisados no software estatístico GraphPadPrism®. Utilizando teste não-paramétrico (*Mann-Whitney*). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significantes.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 são apresentados todos os códigos de IM dos pacientes que participaram da realização do projeto, totalizando 11 amostras provenientes de Rio Preto da Eva na UBS- Hamilton Cidade. A identificação das espécies não foi realizada devido à falta de tempo hábil para as análises isoenzimáticas que serão realizadas posteriormente.

As excursões foram iniciadas em Setembro de 2015 até Maio de 2016, totalizando seis pacientes provenientes da UBA- Hamilton Cidade em Rio Preto da Eva- AM, onde duas eram do sexo feminino e quatro do sexo masculino. A idade dos pacientes variou de 19 a 41 anos. Dos exames realizados, seis pacientes apresentaram positividade para o exame direto e apenas quatro amostras foram possíveis ser isolados em meio de cultura ágar sangue NNN (Novy e MacNeal 1904; Nicolle 1908). Sendo que, dois isolados contaminaram com bactéria. Com relação às atividades profissionais executadas pelos pacientes, observou-se a realização de atividades na mata, como agricultura e pesca.

Foram obtidas cinco amostras de pacientes provenientes de banco de dados da soroteca do Laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas dos anos (2014 a 2015), já que não foi possível obter a quantidade de amostras proposta no projeto em tempo viável, devido vários contratemplos ocorridos no decorrer do trabalho tais como: Falta de condução, Falta de reagentes (marcadores) para processar as amostras de sangue no HEMOAM, falta de motorista, além das mudanças climáticas, como a chuva que pode interromper o ciclo do inseto vetor flebotômico para a fase imatura, e através de inseticidas utilizados nas campanhas de controle

de insetos vetores como o *Aedes aegypti*, ocasionando a redução de outros insetos vetores, ocorrendo assim, a diminuição da incidência da leishmaniose.

As amostras sorológicas provenientes da soroteca são exemplares de pacientes que já foram atendidos e são armazenados como banco de dados, e que ainda não foram utilizadas em nenhum trabalho, pois a soroteca sempre está em renovação contínua, devido à grande dificuldade de obtenção de amostras em tempo hábil dos pacientes com *Leishmania* no município de Rio Preto da Eva. Foram utilizadas cinco amostras de sangue de pacientes doadores voluntários como controles negativos provenientes do Rio Preto da Eva, de ambos os sexos e maior de 18 anos, sem históricos de contato com o parasito de *Leishmania*.

Tabela 1. Códigos de IM dos pacientes que participaram da realização do projeto, provenientes de Rio Preto da Eva na UBS-Hamilton Cidade.

Código da amostra	Sexo	Idade (anos)	Nº de Lesão	Tempo de Infecção (Dias)	Tamanho da Lesão (CM)	Cultivo (NNN)	Exame Direto	Criopreservação (-80 °C)	Amostra Sanguínea
MHOM/BR/14/IM6128	M	19	2	210	1,5 x 1,2	+	+	0	Processada
MHOM/BR/14/IM6129	M	19	3	120	3,6 x 3,3 1,6 x 1,8	+	+	0	Processada
MHOM/BR/14/IM6134	F	46	1	30	0,6 x 0,4	+	+	0	Processada
MHOM/BR/14/IM6135	M.	20	4	30	1,1 x 1,3	+	+	Crio para cultivo Isoenzimas PCR	Processada
MHOM/BR/15/IM6144	F	38	1	33	1,2 x 0,8	+	+	0	Processada
MHOM/BR/15/IM6150	M	19	1	30	1,6 x 2,3	+	+	Crio para cultivo Isoenzimas PCR	Armazenada a -80 °C
MHOM/BR/15/IM6151	F	41	1	15	0,95x 1,3	+	+	Crio para cultivo Isoenzimas PCR	Não coletada
MHOM/BR/15/IM6152	M	31	3	15	0,95 x 1,3 0,2 x 0,60 0,9 x 0,4	Contami- nação	+	0	Não coletada
MHOM/BR/16/IM6156	F	30	1	30	1 x 1,4	Contami- nação	+	0	Processada
MHOM/BR/16/IM6157	M	19	2	120	22 x 2 1 x 1	+	+	-	Processada
MHOM/BR/16/IM6159	M	30	1	21	1,4 x 1,3	+	+	-	Processada

Legenda: Datas das amostras isoladas (IM) de pacientes provenientes da soroteca: 6128 (09/10/14), 6129 (09/10/14), 6134 (03/12/14), 6135 (05/12/14), 6144 (13/05/15); sexo: M (masculino), F (feminino).

As amostras parasitárias axênicas retiradas de cultivo de NNN, apresentaram um crescimento parasitário satisfatório, alcançando a fase logarítmica e estacionária considerada infectante. Após a ampliação, as amostras foram processadas preparando-se massa parasitária para estocagem em -80 °C, para Criopreservação (cultivo), análise de Isoenzimas e PCR.

Foram coletadas amostras de sangue dos pacientes atendidos, sendo oito delas já processadas no HEMOAM e as demais preservadas na soroteca do Laboratório de Leishmaniose para posterior análise.

Em busca por uma resposta imunológica protetora a patógenos intracelulares, seja inata ou adaptativa, em nosso estudo foi demonstrado na figura 1 queda de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes infectado com *Leishmania* sp., quando comparados com populações do controle negativo. Mas não obteve um valor estatístico significativo.

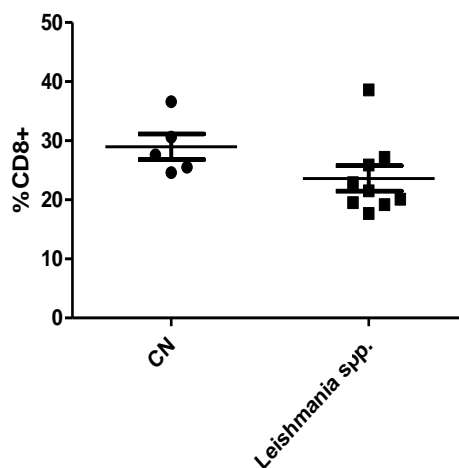


Figura 1. Porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em amostra de sangue periférico de pacientes com infecção por *Leishmania* sp. e população sem infecção (CN)

Na infecção por leishmaniose cutânea pode se manifestar de diferentes formas clínicas, podendo causar doença branda ou mais grave, isso vai depender de cada espécie de *Leishmania* e a respostas imunológicas de cada paciente infectado. Em estudos experimentais, existe um paradigma TH1/TH2 para explicar o resultado natural da doença. Clinicamente, os pacientes podem desenvolver úlceras cutâneas únicas ou múltiplas, nodulares, papulares, ou lesões acneiformes (Carvalho *et al.* 2012).

Na leishmaniose humana, o padrão de resposta imune do tipo 1 com produção IFN- $\gamma$ , TNF e IL-12, tem sido associado com o controle da infecção por ativação macrófaga e destruição parasitária (Brelazde-Castro *et al.* 2012). Por outro lado, citocinas, como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$ , são consideradas do tipo 2, favorecem a multiplicação parasitária, inibindo a produção de NO por macrófagos ativadas por IFN- $\gamma$  (Gomes Silva *et al.* 2007). Essas citocinas também são capazes de inibir a diferenciação dos linfócitos T para um perfil TH1 e TNF e sua consequente produção de IFN- $\gamma$  (Baratta-Masini *et al.* 2007).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> estão associados com a cura da doença em humanos e em modelos animais. Além de produzirem citocinas como TNF, IL-4, IFN- $\gamma$  e IL-10, esses linfócitos participam no controle da leishmaniose através de mecanismos de citotoxicidade, incluindo mecanismos de perforina e granzima e/ou Fas/FasL (Ruiz e Becker 2007). Estudos indicam ainda que as células T CD8<sup>+</sup> também podem ter propriedades regulatórias (Carvalho *et al.* 2012).

Brelaz de Castro *et al.* (2012) demonstraram em estudo com antígenos de *L. (V.) braziliensis* uma produção predominante da citocina regulatória (IL-10) e uma produção específica de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  nas amostras de pacientes antes do tratamento. Houve também uma predominância de células T CD4<sup>+</sup> e uma pequena porcentagem de células CD8<sup>+</sup>, apresentando na infecção desses pacientes um perfil misto de resposta

imunológica. Mostraram que na fase inicial ocorre um decréscimo na modulação de perfil TH1, porém as frações antigênicas são capazes de estimular uma resposta específica. Estudo realizado por (Espir *et al.* 2013) encontraram resultados para infecção por *L. (V.) guyanensis* semelhante, podendo indicar que *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* ambas do subgênero *Viannia* desencadeiam resposta imune semelhante no processo infeccioso.

Espir *et al.* (2013) demonstrou em seu estudo que na infecção por *L. (V.) guyanensis* os pacientes estimulam maior concentração de IL-4, IL-6 e IL-10 comparado aos controles, o mesmo valor p foi encontrado para IL-5, entretanto, a concentração de IL-5 foi muito menor do que os encontrados nos controles.

Na figura 2 demonstra infecção por *Leishmania* sp. caracterizada por diferentes apresentações clínicas das lesões, sugerindo que a leishmaniose cutânea pode apresentar infecção por diferentes espécies de *Leishmania*, além do tempo de infecção com variação de 15 a 210 dias. Portanto, não apresentou uniformidade das lesões e com números variáveis de 1 a 7, dos pacientes atendidos. Esses resultados foram observados frente ao trabalho realizado por (Espir *et al.* 2013) demonstraram que os pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, as lesões haviam surgido no período entre 10 a 120 dias, e com relação aos dados clínico epidemiológicos, não houve uniformidade quanto ao número de lesões nos indivíduos infectados (variando de uma a oito) e quanto ao padrão, notando-se diferentes características nas lesões (úlceras francas; impetigóide; lesão em placa; úlcera vegetante; nodular e lesão verrucosa), mesmo sendo a infecção causada pela mesma espécie do parasito.



Figura 2. Lesões de pacientes com *Leishmania* sp. A: IM 6150; B: IM 6151; C: IM 6152; D: IM 6156; E: IM 6157; F: IM 6159. Proveniente do Rio Preto da Eva – UBS-Hamilton Cidade – AM - 2015.

São cinco as espécies relacionadas à infecção no estado do Amazonas: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lansoni* e *L. (V.) guyanensis*, sendo a última a espécie mais prevalente, contribuindo com mais de 80% dos casos (Guerra *et al.* 2011).

Nesse estudo foi demonstrado que a técnica de imunofenotipagem celular realizada por citometria de fluxo é considerada de grande importância no auxílio da identificação da infecção causada *Leishmania* sp. Apresentou-se especificidade elevada, tornando o estudo mais minucioso permitindo detectar diferentes reações da célula imunológica T CD8<sup>+</sup> para anti- *Leishmania* sp. nos pacientes com leishmaniose cutânea. No entanto, por ser uma técnica ainda cara, dificultou o resultado do nosso projeto.

Atualmente, as técnicas sorológicas têm aumentado a sensibilidade e especificidade dos testes diagnósticos utilizados para LTA, particularmente para a forma cutânea; como a citometria de fluxo que vem sendo amplamente utilizada com diferentes metodologias e permite detectar anticorpos anti-*Leishmania* (Fagundes-

Silva *et al.* 2012), discriminando a forma cutânea localizada, da leishmaniose visceral e doença de Chagas (Rocha *et al.* 2006).

## CONCLUSÃO

Concluiu-se que a população de linfócito T CD8<sup>+</sup> não apresentou diferença significativa em pacientes com *Leishmania* sp., quando comparado aos controles negativos, sugerindo que o tempo de ativação pode ter influenciado nos resultados.

## REFERÊNCIAS

- Brelaz, M.C.A.; Oliveira, A.P.; Almeida, A.F.; Souza, M.A.; Medeiros, A.C.R.; Brito, M.E.F.; Pereira, V.R.A. 2012. *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. *Parasite Immunol*, 34(4): 236-239.
- Carvalho, LP.; Passos, S.; Schriefer, A.; Carvalho, EM. 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Frontiers in Immunology*, 3: 301.
- Espir, T.T. 2013. *Características da resposta imune em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana, antes e após tratamento quimioterápico com antimônio pentavalente*. Manaus: UFAM, 196p.
- Fagundes-Silva; G.A.; Vieira-Goncalves, R.; Nepomuceno, M.P.; Souza, M.A.; Favoreto, S. Jr.; Oliveira-Neto, M.P.; Da-Cruz, A.M.; Gomes Silva, A. 2012. Decrease in anti-*Leishmania* IgG3 and IgG1 after cutaneous leishmaniasis lesion healing is correlated with the time of clinical cure. *Parasite Immunol*, 34(10): 486-491.
- Gomes-Silva, A.; De Cassia; Bittar, R.; Dos Santos; Nogueira, R.; Amato, V.S.; Da Silva; Mattos, M. 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin Exp Immunol*, 149: 440-444.
- Gordon, S. 2009. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell*, 111: 927-930.
- Guerra, J.A.; Coelho, L.I.; Pereira, F.R. 2011. American tegumentary leishmaniasis and HIV-AIDS association in a tertiary care center in the Brazilian Amazon. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 524-527.
- Nicole, G.L. 1908. Culture du parasite Du Bouton d'Orient. *C.R Acad Sci.*, 146: 842-843.
- Novy, F.G.E.; MacNeal, W.J. 1904. On the cultivation of *Trypanosome brucei*. *Journal Infectious Diseases*, 1: 1-30.
- Ruiz, J.H.; Becker, I. 2007. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Immunology*, 29: 671-678.
- Silveira, F.T.; Lainson, R.; Castro Gomes, C.M.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P. 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*, 31: 423-431.