

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**Avaliação da Citotoxicidade na Evolução para a Cura Clínica da  
Leishmaniose Tegumentar Americana**

**CLARISSA FERREIRA CUNHA**

**Rio de Janeiro**

**2013**

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

**CLARISSA FERREIRA CUNHA**

**Avaliação da Citotoxicidade na Evolução para a Cura Clínica da  
Leishmaniose Tegumentar Americana**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre.

Área de Concentração: Imunologia e Patogenia

**Orientador: Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos**

**Rio de Janeiro**

**2013**

Ficha catalográfica elaborada pela  
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

C972 Cunha, Clarissa Ferreira

Avaliação da citotoxicidade na evolução para a cura clínica da  
Leishmaniose Tegumentar Americana / Clarissa Ferreira Cunha. – Rio de  
Janeiro, 2013.

xviii,115 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em  
Biologia Parasitária, 2013.

Bibliografia: f. 93-114

1. Leishmaniose Tegumentar Americana. 2. Citotoxicidade. I. Título.

CDD 616.9364

**INSTITUTO OSWALDO CRUZ**  
**Pós-Graduação em Biologia Parasitária**

Avaliação da Citotoxicidade na Evolução para a Cura Clínica da  
Leishmaniose Tegumentar Americana

AUTORA: CLARISSA FERREIRA CUNHA  
ORIENTADOR: DR. ÁLVARO LUIZ BERTHO DOS SANTOS

Banca Examinadora:

---

Dra. Alda Maria da Cruz  
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, RJ.

---

Dra. Kátia Calabrese da Silva  
Instituto Oswaldo Cruz – Fiocruz, RJ.

---

Dr. Alberto Félix Antônio da Nóbrega  
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – UFRJ, RJ.

**Rio de Janeiro**

**2013**

***Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim  
e se dedicaram na realização de meus sonhos;  
e ao meu irmão, pela grandiosa amizade.***

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos, por todos os ensinamentos, amizade, oportunidade, discussões, comemorações, confiança. Sua presença constante como orientador, professor e amigo foi a base para meu crescimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

À Raquel Ferraz, amiga de todas as horas que Deus colocou no meu caminho. Obrigada por todos os minutos de trabalho, de ensinamento, de cumplicidade, de tristeza e frustrações compartilhadas, de alegrias divididas, de incentivo... enfim, de amizade verdadeira!

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais! Vocês são meu chão, meu porto seguro. Nenhum passo teria sido possível sem a confiança de vocês. Faltam-me palavras para expressar a minha eterna gratidão.

Aos meus irmãos, Felipe e Clara, muito obrigada! Lipe, pela amizade, pela cumplicidade, pelos sonhos e problemas divididos. Clara, por, mesmo em tão pouco tempo, me alegrar, encher meu coração de saudade e me ensinar a ser uma pessoa melhor.

Ao Victor, pelo carinho, pela compreensão, pelo apoio, pela paciência, pelo amor!

À toda a minha gigante e linda família, pelo zelo de sempre! Em especial ao tio Zé, tia Sueli e tia Beta, pessoas maravilhosas sem as quais eu não teria chegado até aqui.

À todos os meus amigos, tão fundamentais em toda a minha vida! Obrigada por estarem presentes mesmo quando distantes e tornarem a minha caminhada mais fácil e feliz!

À minha turma de mestrado, em especial à Bel, Marcela e Thaysse, “meus presentinhos”, pela amizade tão querida que tornou tudo mais prazeroso.

À toda a equipe do LIP, em especial à Dra. Léa Cysne Finkelstein, pelos ensinamentos e carinho; e ao Juan Camilo Sánchez Arcila, sempre ‘salvando a minha vida’ com suas explicações e ajuda e pela amizade!

À equipe do LIPMED, em especial à Dra. Alda Maria da Cruz, pelo apoio e afeição.

Ao Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos, do Laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos, pela ajuda e disposição quando necessitei.

À toda a equipe do Centro de Referência em Leishmanioses e do Ambulatório do IPEC, pela preciosa colaboração, em especial ao Dr. Armando Schubach, Dr. Marcelo Rosandisky Lyra, Dra. Maria Inês Pimentel e Michelle Moreira.

Aos pacientes e aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.

À equipe da Pós-graduação em Biologia Parasitária e aos professores que enriqueceram minha jornada profissional.

À Plataforma de Citometria de Fluxo do PDTIS, em especial à Dra. Íris Marins Peixoto.

À Fundação Oswaldo Cruz e ao IOC, este lugar maravilhoso que aumentou minha alegria em trabalhar.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos.

*“A mais profunda busca humana é esfoçar-se pela moralidade em nossa ação.  
Nosso equilíbrio interno, inclusive da existência, depende disso. Somente a  
moralidade em nossas ações pode dar beleza e dignidade à vida.”*

**Albert Einstein**

## SUMÁRIO

Lista de Tabelas .....	xi
Lista de Figuras .....	xii
Lista de Abreviaturas .....	xiv
Resumo .....	xvii
Abstract .....	xviii
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>19</b>
1.1 Aspectos epidemiológicos.....	19
1.2 Ciclo de vida do protozoário.....	21
1.3 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar Americana .....	23
1.3.1 Leishmaniose Subclínica .....	23
1.3.2 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL) .....	23
1.3.3 Leishmaniose Recidiva Cútis (LR) .....	24
1.3.4 Leishmaniose Disseminada (Ldiss) .....	24
1.3.5 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) .....	25
1.3.6 Leishmaniose Mucosa (LM) .....	25
1.4 Diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar Americana .....	26
1.5 Imunopatogenia da leishmaniose tegumentar Americana .....	28
1.5.1 Linfócitos T CD8 <sup>+</sup> .....	31
1.5.2 Células <i>natural killer</i> (NK) .....	33
1.5.3 Células <i>natural killer</i> T (NKT) .....	35
1.5.4 Linfócitos T CD4 <sup>+</sup> citotóxicos .....	37
1.6 Citometria de fluxo aplicada à avaliação da citotoxicidade .....	41
<b>2. JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>43</b>
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	<b>44</b>
3.1 Objetivo geral .....	44
3.2 Objetivos específicos .....	44
<b>4. METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
4.1 Casuística .....	45

4.2 Coleta do material biológico .....	46
4.3 Obtenção, criopreservação e recuperação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP) .....	46
4.4 Ensaios de imunofenotipagem e degranulação de células citotóxicas .....	48
4.5 Adaptação dos ensaios de degranulação .....	49
4.6 Citometria de fluxo .....	50
4.6.1 Definição de regiões e compensação de cores .....	50
4.6.2 Análise citofluorimétrica dos ensaios <i>post-thaw</i> e <i>in vitro</i> .....	51
4.7 Análise estatística .....	52
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>55</b>
5.1 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes avaliados .....	55
5.2 Padronização do ensaio de expressão de CD107a .....	57
5.3 Distribuição das populações celulares .....	59
5.3.1 Distribuição das populações celulares T CD8 <sup>+</sup> , T CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT em pacientes de leishmaniose cutânea .....	59
5.3.2 Distribuição das populações celulares T CD8 <sup>+</sup> , T CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT em pacientes de leishmaniose mucosa .....	61
5.4 Avaliação <i>post-thaw</i> da degranulação das células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT através da expressão de CD107a .....	62
5.4.1 Avaliação <i>ex thaw</i> da degranulação das células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT em pacientes de leishmaniose cutânea .....	63
5.4.2 Avaliação <i>ex thaw</i> da degranulação das células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT em pacientes de leishmaniose mucosa .....	64
5.5 Avaliação <i>in vitro</i> da degranulação das células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT através da expressão de CD107a .....	66
5.5.1 Avaliação <i>in vitro</i> da degranulação das células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT em pacientes de leishmaniose cutânea .....	66
5.5.2 Avaliação <i>in vitro</i> da degranulação das células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> , NK e NKT em pacientes de leishmaniose mucosa .....	68
5.6 Avaliação das subpopulações de células NK .....	68
5.7 Avaliação das subpopulações de células NKT.....	69

5.7.1 Distribuição das subpopulações de células NKT .....	70
5.7.2 Perfil da expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT .....	73
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>76</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>91</b>
<b>8. REFERENCIAS .....</b>	<b>93</b>
Anexo 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) .....	115

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 4.1:</b> Combinação de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores para avaliar diferentes características celulares por citometria de fluxo nos ensaios experimentais <i>post-thaw</i> e <i>in vitro</i> .....	49
<b>Tabela 5.1:</b> Características clínico-epidemiológicas dos nove pacientes de leishmaniose cutânea incluídos no estudo .....	56
<b>Tabela 5.2:</b> Características clínico-epidemiológicas dos quatro pacientes de leishmaniose mucosa incluídos no estudo .....	57
<b>Tabela 5.3:</b> Resultados da avaliação da distribuição de subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRL) e pacientes de leishmaniose cutânea (LC) .....	72
<b>Tabela 5.4:</b> Resultados da avaliação da distribuição de subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRL) e pacientes de leishmaniose mucosa (LM) .....	72
<b>Tabela 5.5:</b> Resultados do perfil de expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRL) e pacientes de leishmaniose cutânea (LC) .....	75
<b>Tabela 5.6:</b> Resultados do perfil de expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRL) e pacientes de leishmaniose mucosa (LM) .....	75

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.1:</b> Distribuição das espécies de <i>Leishmania</i> no território brasileiro baseada em dados do ano de 2005 .....	20
<b>Figura 1.2:</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i> .....	22
<b>Figura 1.3:</b> Diferenciação dos subtipos efetores de linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (Th) .....	38
<b>Figura 1.4:</b> Representação esquemática da expressão de CD107a, assim como de CD107b e CD63, na superfície das células citotóxicas durante o processo de degranulação .....	41
<b>Figura 4.1:</b> Análise fluorimétrica de células marcadas com anticorpos monoclonais isotípicos para definição dos cursores e quadrantes .....	51
<b>Figura 4.2:</b> Etapa 1 do protocolo citofluorimétrico multiparamétrico de análise .....	53
<b>Figura 4.3:</b> Etapa 2 do protocolo citofluorimétrico multiparamétrico de análise .....	54
<b>Figura 5.1:</b> Experimentos-piloto de cinética da avaliação da expressão de CD107a pelas células CD8 <sup>+</sup> , CD4 <sup>+</sup> e CD56 <sup>+</sup> frente o estímulo de Ag-Lb de três pacientes de leishmaniose cutânea após a terapia antimonial .....	58
<b>Figura 5.2:</b> Avaliação <i>ex thaw</i> do percentual de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (A) e T CD4 <sup>+</sup> (B) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados .....	59
<b>Figura 5.3:</b> Avaliação <i>ex thaw</i> do percentual de células NK (A) e NKT (B) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados .....	60
<b>Figura 5.4:</b> Avaliação <i>ex thaw</i> do percentual de linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (A) e T CD4 <sup>+</sup> (B) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose mucosa estudados .....	61
<b>Figura 5.5:</b> Avaliação <i>ex thaw</i> do percentual de células NK (A) e NKT (B) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose mucosa estudados .....	62
<b>Figura 5.6:</b> Avaliação <i>ex thaw</i> do percentual de expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (B), células NK (C) e NKT (D) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados .....	64
<b>Figura 5.7:</b> Avaliação <i>ex thaw</i> do percentual de expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (B), células NK (C) e NKT (D) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose mucosa estudados .....	65

<b>Figura 5.8:</b> Avaliação <i>in vitro</i> do percentual de expressão de CD107 específica aos Ag-Lb pelos linfócitos T CD8 <sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4 <sup>+</sup> (B), células NK (C) e NKT (D) nos indivíduos saudáveis (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados .....	67
<b>Figura 5.9:</b> Representação da distribuição das subpopulações de células NK (NK CD56 <sup>dim</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> ) nos ensaios <i>post-thaw</i> .....	68
<b>Figura 5.10:</b> Representação da distribuição das subpopulações de células NK CD107a <sup>+</sup> (NK CD56 <sup>dim</sup> CD107a <sup>+</sup> e NK CD56 <sup>bright</sup> CD107a <sup>+</sup> ) nos ensaios <i>post-thaw</i> .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\alpha$ GalCer – alpha-galactosilceramida

$^{51}\text{Cr}$  – Cromo

7-AAD – 7-Aminoactinomicina D

AcMo – Anticorpos Monoclonais

Ag-Lb – antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*

AICD – do inglês *Activation-Induced Cell Death* (morte celular induzida por ativação)

APC – do inglês *Antigen-Presenting Cells* (células apresentadoras de antígenos)

AT – pacientes antes do início do tratamento com antimoniais pentavalentes

BG – do inglês *background* (células cultivadas sem estímulo)

CCR – do inglês *CC Chemokine Receptor* (receptor de quimiocinas CC)

CD – do inglês *Cluster of Differentiation* (grupamento de diferenciação)

CDR – do inglês *Complementarity Determining Regions* (regiões determinantes de complementariedade)

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CFSE - Carboxifluoresceína Succinimidil Éster

CMSP – Células Mononucleares de Sangue Periférico

CMTMR – {5-(and-6)-[(4-Clorometil)Benzoil]Amino}Tetrametilrodamina}

cols. – colaboradores

CTRL – grupo controle de indivíduos sadios

CXCR – do inglês *CC Chemokine Receptor* (receptores de quimiocinas CXC)

DC – Células Dendríticas

DMSO – Dimetilsulfóxido

DN – duplo-negativas

DP – duplo-positivas ADCC – do inglês *Antibody-dependent cell cytotoxicity* (citotoxicidade celular dependente de anticorpo)

DT – pacientes durante o tratamento com antimoniais pentavalentes

ELISA – do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ensaio imunoenzimático)

Fas-L – receptor Fas ligante

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FSC – do inglês *Forward Scatter* (parâmetro que avalia o tamanho celular)

GM-CSF – do inglês *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos)

HEPES – Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico

HIV – do inglês *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)

ICAM – do inglês *Intercellular Adhesion Molecule* (molécula de adesão intercelular)

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN- $\gamma$  – Interferon-gamma

IL – Interleucina

iNKT – células *Natural Killer T* invariantes

IPEC – instituto de Pesquisas Clínicas Evandro Chagas

KIR – do inglês *Killer Immunoglobulin-like Receptors*

LAMP – do inglês *Lysosomal-Associated Membrane Proteins* (proteínas de membrana associadas à lisossomos)

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa

LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada

Ldiss – Leishmaniose Disseminada

LFA – do inglês *Lymphocyte Function-Associated Antigen* (antígeno associado à função leucocitária)

LIT – Meio de cultura *Liver Infusion Tryptose*

LM – Leishmaniose Mucosa

LR – Leishmaniose Recidiva Cútis

LT – Leishmaniose Tegumentar

LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana

LV – Leishmaniose Visceral

MFI – do inglês *Mean Fluorescence Intensity* (intensidade média de fluorescência)

MHC – do inglês *Major Histocompatibility Complex* (complexo principal de histocompatibilidade)

MIP – do inglês *Macrophage Inflammatory Protein* (proteína inflamatória de macrófagos)

NK – células *Natural Killer*

NKT – células *Natural Killer T*

NNN – Meio de cultura *Neal, Novy, Nicolle*

OX40L – OX40 ligante

PAMPs – do inglês *Pathogen-Associated Molecular Patterns* (padrões moleculares associados a patógenos)

PBS – do inglês *Phosphate Buffered Saline* (tampão fosfato-salino)

PBSaz – do inglês *Phosphate Buffered Saline Sodium Azide* (tampão fosfato-salino com azida sódica)

PCR – do inglês *Polymerase Chain Reaction* (reação em cadeia da polimerase)

PDTIS – Plataforma de Citometria de Fluxo da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde

PFA – Paraformaldeído

PGE2 – Prostaglandina E2

PHA – do inglês *Phytohemagglutinin* (fitohemaglutinina)

PMA – do inglês *Phorbol Myristate Acetate* (acetato de formol miristato)

PT – pacientes após o fim do tratamento com antimoniais pentavalentes

Q – quadrante

RANTES – do inglês *Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted* (regulada por ativação expressa e secretada por células T normais)

RNS – do inglês *Reactive Nitrogen Species* (espécies reativas do nitrogênio)  
ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas do oxigênio)  
rpm – Rotações por Minuto  
SFB – Soro Fetal Bovino  
SSC – do inglês *Side Scatter* (parâmetro que avalia a granularidade celular)  
TCR – do inglês *T-Cell Receptor* (receptor de células T)  
Tfh – células T foliculares  
TGF- $\beta$  – do inglês *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de transformação do crescimento beta)  
Th – do inglês *T helper* (linfócitos T auxiliares)  
ThCTL – linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos  
TLRs – do inglês *Toll-like Receptors* (receptores do tipo *Toll*)  
TNF – do inglês *Tumor Necrosis Factor* (fator de necrose tumoral)  
Treg – células T reguladoras  
vNKT – células *Natural Killer T* variantes

## RESUMO

A evolução clínica da leishmaniose tegumentar Americana (LTA) depende da espécie de *Leishmania* infectante e da resposta imune desencadeada pelo paciente. Nesta resposta, sabe-se que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> exercem importantes funções, através da liberação de citocinas pro-inflamatórias e de sua atividade citotóxica, e têm sido relacionados tanto a um papel na proteção imunológica e regressão da lesão, quanto na manutenção da infecção e dano tecidual. Outras populações celulares, como as células *natural killer* (NK), células *natural killer-T* (NKT) e linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos também são capazes de exercer atividades similares aos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, entretanto pouco é conhecido a respeito da função citotóxica destas células na imunopatogenia da LTA. Assim, na tentativa de melhor compreender o papel da citotoxicidade na evolução para a cura clínica na LTA, o objetivo deste trabalho foi avaliar a frequência e a atividade citotóxica destas populações celulares, através de imunofenotipagem e avaliação da expressão de CD107a, em amostras obtidas de sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucosa (LM) ativa; durante e após o tratamento antimonial. As análises celulares foram realizadas após descongelamento das amostras, com o intuito de identificar as frequências de tais populações e suas atividades citotóxicas. Foram ainda realizados ensaios *in vitro*, para determinar o comportamento citotóxico destas populações durante a resposta antigênica específica. Os resultados mostraram que a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> foi baixa durante a forma ativa da LC, e, enquanto a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> tendeu a retornar aos níveis de normalidade com o tratamento e a cura clínica, a frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup> permaneceu prejudicada. A função citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e células NKT foi mais notável nos pacientes durante o tratamento, indicando que suas funções citotóxicas, em conjunto com os efeitos benéficos da terapia, parecem auxiliar no direcionamento para a cura clínica da LC. Entretanto, estas mesmas células apresentaram atividade citotóxica prejudicada quando em contato com alta carga antigênica. As células NK e NKT foram detectadas em altos níveis nos pacientes de LC e não apresentaram tendência a retornar aos níveis de normalidade com a cura recente. Ainda, a citotoxicidade exercida pelas células NK circulantes não pareceu influenciar no processo de cura da LC. Embora a amostragem dos pacientes de LM tenha sido pequena, os resultados apontam para uma baixa da frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> nos pacientes de LM, enquanto as células NK e NKT apresentaram frequências elevadas. A atividade citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e células NK foi mais acentuada nos grupos de pacientes de LM que nos indivíduos sadios; porém, intrigantemente, nenhuma das populações celulares nestes pacientes foi capaz de exercer atividade citotóxica específica em resposta aos antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Nas avaliações das subpopulações de células NK e NKT, a subpopulação NK CD56<sup>dim</sup> foi a mais prevalente e com atividade predominantemente citotóxica, independente da presença da patologia ou do tratamento. Já subpopulação NKT duplo-positiva (CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>) parece desempenhar um importante papel citotóxico no processo de cura clínica da leishmaniose cutânea. Em conjunto, estes dados apontam para uma participação efetiva dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e das células NKT (principalmente a subpopulação duplo-positiva) no processo de cura da LC, enaltecendo a importância destas células como promissores alvos de estudos terapêuticos e vacinais.

## ABSTRACT

The clinical course of American tegumentary leishmaniasis (ATL) depends on the interaction between the parasite and the immune response of patient. It is well known that CD8<sup>+</sup> T lymphocytes play a key role in this response due to their cytokine production and cytotoxic potential, being related to a role in protective immunity and lesion's regression, as well as in the maintenance of infection and tissue damage. Natural killer cells (NK), natural killer T cells (NKT) and a cytotoxic subpopulation of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes present similar functions, however little is known about the cytotoxic function of these cells in the immunopathogenesis of ATL. Thus, in order to better understand the role of cytotoxicity in the evolution to clinical cure of ATL, the aim of this study was to evaluate the frequency and cytotoxic activity of these cell populations, through immunophenotyping and evaluation of CD107a expression, in peripheral blood samples of patients with active cutaneous and mucosal leishmaniasis and both during and after treatment with antimony. Analyses were performed after cell thawing of samples, in order to identify the frequencies of these populations and their cytotoxic activities. *In vitro* assays were also carried out to determine the cytotoxic behavior of these populations during the response to specific antigen. We could observe that the frequency of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes was low in active cutaneous leishmaniasis. The frequency of CD8<sup>+</sup> T lymphocytes have returned to the normal levels with treatment and after clinical cure, while the frequency of CD4<sup>+</sup> T lymphocytes remained at lowest levels. The cytotoxic function of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and NKT cells was more remarkable in patients during treatment, indicating that cytotoxic functions, along with the beneficial effects of therapy, assist in leading to the clinical cure of LC. However, these same cells showed impaired cytotoxic activity when exposed to high antigenic load. The NK and NKT cells are present at high levels in LC patients and did not seem to return to normal levels with the recent cure. Further, the circulating NK cells cytotoxicity did not appear influence in this healing process. Although the sample of LM patients was small, the results point to a low frequency of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes, while NK and NKT cells presented high frequencies. The cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup> T lymphocytes and NK cells was more marked in the LM patients groups than in healthy individuals; but intriguingly, none of the cell populations in these patients was able to exert cytotoxic activity in response to specific *L. (V.) braziliensis* antigens. In the evaluations of subpopulations of NK and NKT cells, a CD56<sup>dim</sup> NK subpopulation was the most prevalent and shows a predominantly cytotoxic activity, regardless of the presence of disease or treatment. CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>-NKT subpopulation seems to play an important cytotoxic role in the process of clinical cure in cutaneous leishmaniasis. Together, these data point to an effective participation of CD8<sup>+</sup> T cells and NKT cells (mainly CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> NKT cells) in the healing process of the LC, highlighting the importance of these cells as promising targets for therapeutic and vaccine studies.

## 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e podem se apresentar sob a forma tegumentar ou visceral, variando em gravidade desde lesões da pele a desfigurações graves e infecção sistêmica fatal. Tais formas são determinadas de acordo com sua epidemiologia; manifestações clínicas; resposta imune do hospedeiro; espécies do protozoário e do vetor (Reithinger *et al*, 2007). São consideradas pela Organização Mundial da Saúde uma das doenças tropicais de maior importância para a saúde pública, ocupando, devido à sua forma visceral, o segundo lugar em mortalidade e quarto em morbidade entre as infecções tropicais (Bern *et al*, 2008; Kedzierski, 2011; WHO | World Health Organization).

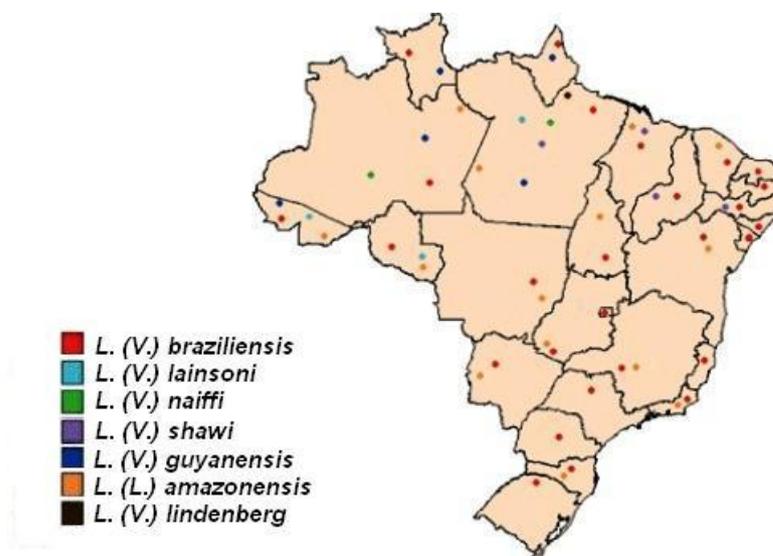
### 1.1 Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses são endêmicas em mais de 90 países, os quais apresentam uma estimativa de 0,2 a 0,4 milhões de casos de Leishmaniose Visceral (LV) e 0,5 a 1,2 milhões de casos de Leishmaniose Tegumentar (LT) por ano (Alvar *et al*, 2012). A LT é amplamente distribuída no mundo e no Continente Americano, onde é denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Esta registra casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile e Uruguai (SVS, 2010). Porém, uma maior concentração dos casos está restrita a um pequeno número de países, com cerca de 90% destes ocorrendo em partes do Afeganistão, Argélia, Irã, Arábia Saudita, Síria, Brasil, Colômbia, Peru e Bolívia (CDC, 2013). A expansão das leishmanioses e o aumento acentuado da prevalência estão relacionados a mudanças ambientais, devastação e migração de pessoas para áreas endêmicas (Patz *et al*, 2000).

No Brasil já foram descritos casos de LTA em todos os estados, sendo diagnosticados 21.844 casos no ano de 2011. As regiões Norte e Nordeste são as regiões mais endêmicas, com um registro de 16.884 casos em 2011, representando 77,29%, e a região Sudeste registrou 2.206 novos casos, correspondentes a 10,09%, sendo destes apenas 79 no Estado do Rio de Janeiro. No ano de 2012 foram registrados 24.383 casos no país; a região Sudeste registrou 1.493 casos

(equivalente a 6,12%), com 52 registrados no Estado do Rio de Janeiro (SINAN, 2013).

A doença é causada predominantemente por protozoários da espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* nas regiões do país em que a LTA é endêmica e está presente tanto em áreas de colonização antigas quanto recentes (Jones *et al*, 1987; Grimaldi & McMahan-Pratt, 1991; SVS, 2010). Atualmente já foram identificadas no Brasil, pelo menos, sete espécies patogênicas ao homem, sendo seis do subgênero *Viannia* [*L. (V.) braziliensis*; *L.(V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenberg*; e *L. (V.) shawi*] e uma do subgênero *Leishmania* [*L. (L.) amazonensis*] (SVS, 2010). Com exceção das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, que apresentam ampla distribuição no território nacional, as outras espécies são encontradas em regiões características (Figura 1.1). É possível observar três padrões epidemiológicos bem definidos no país: um silvestre, no qual a LTA é fundamentalmente uma zoonose de animais silvestres e o homem se insere acidentalmente no ciclo ao entrar em contato com áreas de vegetação primária; um ocupacional e de lazer, que está associado à devastação e à exploração de florestas para o desenvolvimento de atividades econômicas e turismo; e um perfil rural e periurbano, relacionado a processos migratórios e aglomerados urbanos próximos a matas secundárias ou residuais (SVS, 2010).



**Figura 1.1:** Distribuição das espécies de *Leishmania* no território brasileiro baseada em dados do ano de 2005. Adaptado de SVS, 2010.

No Rio de Janeiro são descritos casos desde o início do século XX (Rabello, 1913) e, atualmente, a infecção exibe um perfil rural e periurbano de transmissão,

causada principalmente pela espécie *L. (V.) braziliensis* (De Oliveira-Neto *et al*, 2000; Cupolillo *et al*, 2003). São encontrados focos da doença principalmente em regiões dos municípios do Rio de Janeiro, Paraty, Mesquita, Ilha Grande, Paracambi (dos Santos *et al*, 2005; Vieira-Gonçalves *et al*, 2008; Rangel & Lainson, 2009; SVS, 2010).

## 1.2 Ciclo de vida do protozoário

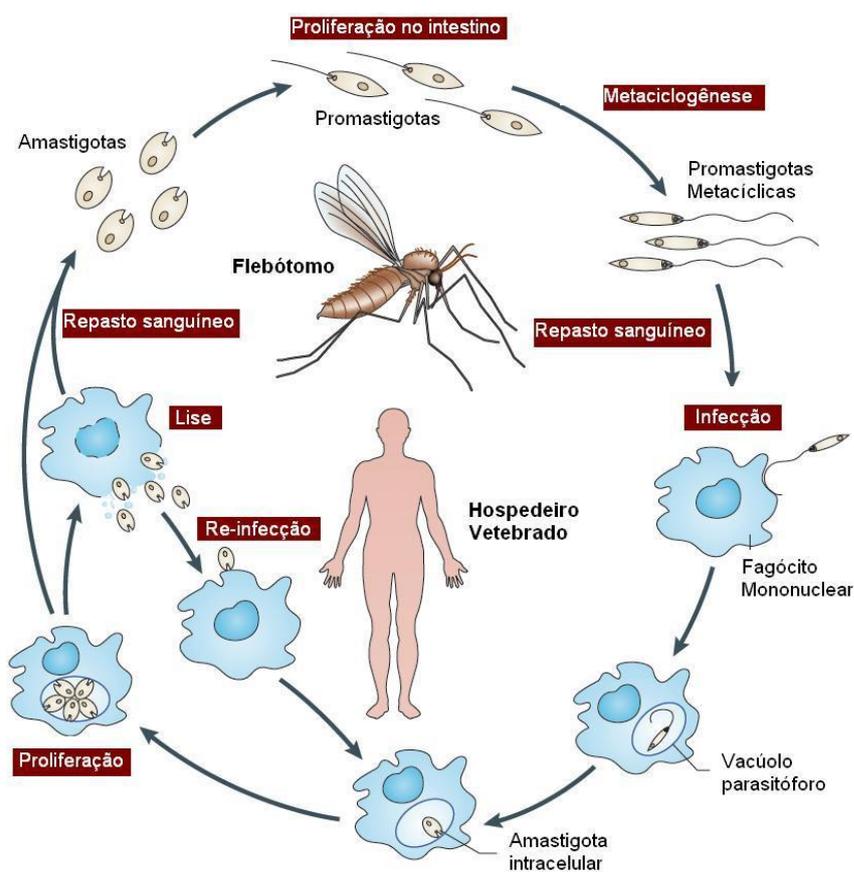
Recentemente a *Leishmania* foi redefinida taxonomicamente, com base em critérios de filogenia molecular, como pertencente ao reino Protista, supergrupo Excavata, divisão Euglenozoa, subdivisão Kinetoplastea, Trypanosomatida e gênero *Leishmania* (Rey, 2008). Sua morfologia varia de acordo com a fase do ciclo biológico e se apresenta sob duas formas evolutivas principais: amastigota e promastigota (Rey, 2008). A divisão nos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania* foi definida de acordo com a localização em que se desenvolvem no intestino do hospedeiro invertebrado (Lainson & Shaw, 1987).

O ciclo da *Leishmania* é heteroxeno, com participação de um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado. Este último inclui geralmente o homem; animais domésticos, como cães, gatos e equinos; e animais silvestres, como marsupiais, roedores, preguiças, tamanduás (Lainson & Shaw, 1987; Aguilar *et al*, 1989; Da-Cruz & Pirmez, 2005). Os hospedeiros invertebrados, ou vetores, são as fêmeas (hematófagas) de flebotomíneos, pertencentes à Ordem Diptera, Família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, que podem ser do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Sharma & Singh, 2008).

Apesar das mais de 500 espécies de flebotomíneos já identificadas, apenas cerca de 40 espécies participam do ciclo da *Leishmania* como vetores, indicando que as espécies de *Leishmania* parecem ter preferência por espécies particulares de flebotomíneos (Grimaldi & Tesh, 1993; Rangel & Lainson, 2009). A *L. (V.) braziliensis* é transmitida por espécies diferentes de flebotomíneos, principalmente *Lutzomyia intermedia*, *Lu. whitmani* e *Lu. wellcomei*, e seus grandes reservatórios potenciais são os animais domésticos (Killick-Kendrick, 1999; Miranda *et al*, 2002; Rebêlo *et al*, 2010).

O ciclo tem início quando fêmeas de flebotomíneos transmitem a forma infectante de *Leishmania* (promastigota metacíclica) ao hospedeiro vertebrado

durante o repasto sanguíneo. As promastigotas, que são formas alongadas e com flagelo livre, são então fagocitadas por macrófagos e células dendríticas (DC). No interior destas células, se localizam em vacúolos parasitóforos, onde se diferenciam em amastigotas (formas ovóides e com flagelo interiorizado) e se multiplicam por divisão binária, levando à lise celular, quando são então liberadas, permitindo a infecção de outras células. Quando um flebótomo realiza um repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere, juntamente com o sangue, macrófagos com as formas amastigotas em seu interior. Estas amastigotas se diferenciam em promastigotas no intestino do hospedeiro invertebrado, se multiplicam por divisão binária e passam por um processo de metaciclogênese, onde deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes. Nesta forma evolutiva as leishmânias perdem a capacidade de adesão ao epitélio do intestino e migram para a probóscida do inseto, onde permanecem aptas a infectar um novo hospedeiro vertebrado, reiniciando seu ciclo (Bañuls *et al*, 2007; Sharma & Singh, 2008) (Figura 1.2).



**Figura 1.2:** Ciclo de vida de *Leishmania* spp.. Adaptado de Kaye & Scott, 2011.

### **1.3 Formas clínicas da leishmaniose tegumentar Americana**

A LTA apresenta uma variedade de manifestações clínicas, alterações histopatológicas e imunológicas que caracterizam as diferentes formas desta doença: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose recidiva cutis (LR), leishmaniose disseminada (Ldiss), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) (Goto & Lauletta Lindoso, 2012). O amplo espectro de formas e de gravidade da doença são reflexos da contribuição de diferentes fatores de virulência do parasito e respostas do hospedeiro, alguns dos quais atuam em uma maneira de proteger o hospedeiro, enquanto outros exacerbam a doença (Handman, 1999). Apesar de algumas manifestações clínicas serem mais frequentemente associadas a uma determinada espécie ou subgênero, nenhuma é única para uma espécie. Além disso, uma parte substancial das infecções é assintomática (forma subclínica) (WHO, 2010).

#### **1.3.1 Leishmaniose Subclínica**

Em áreas endêmicas de leishmaniose são observados indivíduos infectados por *Leishmania* que não apresentam manifestações clínicas aparentes, sendo capazes de controlar a infecção, dispensando assim o tratamento medicamentoso (Follador *et al*, 2002; Bittar *et al*, 2007). Em áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis*, aproximadamente 10% dos indivíduos possuem teste intradérmico positivo, mas nenhuma história prévia de leishmaniose ou lesões típicas, caracterizando a forma subclínica da leishmaniose (Follador *et al*, 2002).

#### **1.3.2 Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)**

A LCL, comumente denominada apenas leishmaniose cutânea (LC), é a forma mais prevalente e pode ser causada por todas as espécies dermatrópicas de *Leishmania*. É caracterizada por lesões únicas ou escassas (no máximo 10 lesões) ulceradas na pele, com bordas bem delimitadas com margens em relevo e fundo granuloso, com frequente linfadenopatia e linfagite (De Oliveira-Neto *et al*, 2000; Reithinger *et al*, 2007; Goto & Lauletta Lindoso, 2012). A doença evolui de forma crônica e geralmente a lesão cicatriza após a terapia, mas pode cicatrizar de forma espontânea em alguns casos (Costa *et al*, 1990).

As lesões cicatrizadas são em geral lisas, finas e hipopigmentadas e a ocorrência de traumatismo na cicatriz pode conduzir a um ressurgimento da lesão leishmaniótica, levando à reativação da infecção, provavelmente devido a persistência do parasito após o tratamento clínico (Schubach *et al*, 1998; Goto & Lauletta Lindoso, 2012). A infecção primária pode ainda evoluir para a forma mucosa mesmo após a cura clínica em cerca de 2 a 5% dos casos (Marsden, 1990).

### **1.3.3 Leishmaniose Recidiva Cútis (LR)**

Leishmaniose recidiva cutis (LR) é uma forma rara de leishmaniose cutânea, com características clínicas e evolução específicas. É mais prevalente no Velho Mundo, onde é associada com a infecção por *L. (L.) tropica*, mas também foi observado no Novo Mundo, associada com infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (no Brasil) e *L. (V.) panamensis* (no Equador) (Bittencourt *et al*, 1993; Calvopina *et al*, 2006). Após um período variável de tempo, a cicatriz clinicamente curada de LC apresenta complicações pelo desenvolvimento periférico de placas infiltradas e crostosas, mimetizando clinicamente e histologicamente lúpus vulgaris (Landau *et al*, 1996; Mavilia *et al*, 2002). É considerada como uma forma hiperérgica de leishmaniose cutânea devido aos pacientes apresentarem forte resposta ao teste intradérmico com antígenos de *Leishmania* e uma reação granulomatosa bem organizada histologicamente, com parasitos escassos ou ausentes (Stefanidou *et al*, 2008). A persistência do parasita por muito tempo, mesmo após a cura clínica, é uma explicação plausível para os casos de recorrência de LR (Schubach *et al*, 1998; Ghersetich *et al*, 1999).

### **1.3.4 Leishmaniose Disseminada (Ldiss)**

A forma disseminada é uma rara manifestação da leishmaniose tegumentar que acomete cerca de 2% dos casos e é clinicamente caracterizada pela presença de múltiplas lesões pleomórficas em duas ou mais áreas não contíguas do corpo, que são provavelmente causadas por disseminação linfática ou hematogênica (Costa *et al*, 1986; Turetz *et al*, 2002). As lesões podem ser acneiformes, nodulares, papulares e ulceradas e é observado acometimento da mucosa em quase 29% dos casos (Turetz *et al*, 2002). Os pacientes apresentam inibição de mecanismos da resposta imune celular, resultando em uma resposta negativa ao teste intradérmico

com antígenos de *Leishmania* e aos testes de proliferação linfocitária, mas, após a terapia convencional, os pacientes exibem resposta imune celular devidamente restaurada (Carvalho *et al*, 1994). No Brasil, esta manifestação é atribuída à infecção por *L. (V.) braziliensis*, mas a associação com outras espécies não pode ser excluída (Turetz *et al*, 2002).

### **1.3.5 Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)**

LCD é uma manifestação clínica grave e rara da leishmaniose cutânea. É caracterizada pela presença de múltiplas lesões nodulares não-ulcerativas difundidas por quase todo o corpo (Bryceson, 1969). Imunologicamente, parece haver uma falha na resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania*, levando ao crescimento descontrolado do parasito (Convit *et al*, 1972). Deste modo, os pacientes anérgicos apresentam uma evolução crônica, teste diagnóstico intradérmico negativo devido à fraca resposta celular e resposta ineficaz ao tratamento (Carvalho *et al*, 1994; Barral *et al*, 1995). Esta forma da doença é associada com a infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* no Novo Mundo e *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo (WHO, 2010).

### **1.3.6 Leishmaniose Mucosa (LM)**

A LM pode apresentar acometimento unicamente mucoso, surgindo geralmente meses ou anos após uma lesão cutânea inicial, ou ocorrer simultaneamente com a LC, sendo usualmente denominada leishmaniose mucocutânea. É uma forma mais grave, caracterizada por múltiplas ou extensas lesões destrutivas na cavidade oral ou nasofaríngea, podendo ainda afetar laringe e traquéia, causando severa deformação facial e distúrbios respiratórios (Marsden, 1986; Amato *et al*, 2003). Tal patogênese tem sido associada a uma hiperatividade da resposta imune celular mediada por linfócitos T, com uma forte e progressiva resposta inflamatória, levando ao dano tecidual (Carvalho *et al*, 1985). Os pacientes de LM não curam espontaneamente e o tratamento é mais complicado do que na LC, devido a maiores índices de falha terapêutica e co-infecções bacterianas serem comuns (Marsden, 1986). *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie responsável pela LM no Novo Mundo, embora casos por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* e *L.*

(V.) *guyanensis* também serem descritos (Saravia *et al*, 1985; Marsden, 1986; Santrich *et al*, 1990; Barral *et al*, 1991; Guerra *et al*, 2011).

#### **1.4 Diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar Americana**

O diagnóstico da leishmaniose é baseado em critérios que consideram dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Os dados epidemiológicos são evidentemente importantes no auxílio ao diagnóstico de indivíduos que residem em área endêmica, mas também são importantes no auxílio ao diagnóstico de viajantes que não residem em área endêmica (El Hajj *et al*, 2004; Scarisbrick *et al*, 2006; Lederman *et al*, 2008). O diagnóstico clínico é realizado a partir das características clínicas (lesões leishmanióticas típicas e localização destas) apresentadas pelos pacientes, como descrito no item 1.3. Entretanto, a confirmação do diagnóstico por métodos laboratoriais é essencial e de extrema importância, tendo em vista as muitas doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA, como paracoccidiodomicose, carcinoma epidermóide, carcinoma basocelular, linfomas, rinofima, rinosporidiose, entomoforomicose, hanseníase, sífilis terciária, perfuração septal, rinite alérgica, sinusite, sarcoidose, granulomatose de Wegner e outras doenças mais raras (Reithinger *et al*, 2007; David & Craft, 2009; SVS, 2010).

O “padrão-ouro” de diagnóstico laboratorial para LTA ainda são os exames parasitológicos diretos e indiretos para demonstração do parasito (Herwaldt, 1999; SVS, 2010). Os exames diretos constituem em escarificação e biópsia de lesão; porém, a possibilidade de encontro do parasito é diminuída com o tempo de evolução, ficando a sensibilidade destes testes entre 15 e 30% apenas, principalmente devido aos frequentes casos crônicos e de LM (Schubach *et al*, 2001; SVS, 2010). Os exames indiretos constituem em isolamento do parasito em cultivo *in vitro*, onde fragmentos obtidos por biópsia da lesão são cultivados em meios apropriados (geralmente NNN ou LIT), e *in vivo*, onde o fragmento é triturado em solução salina estéril e inoculado via intradérmica em hamster (*Mesocricetus auratus*); porém, apesar de uma maior sensibilidade, este último é pouco utilizado devido à sua complexidade e custo mais elevado (SVS, 2010).

Testes imunológicos (teste intradérmico e testes sorológicos) também são comumente realizados. O teste intradérmico, denominado Intradermorreação de Montenegro, é realizado rotineiramente e fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia. Neste, uma preparação de antígenos

de *Leishmania* (a espécie utilizada varia em diferentes laboratórios e localidades) é inoculada no antebraço do indivíduo com suspeita de leishmaniose e, após 48-72h, a reação é avaliada e considerada positiva quando a área de endurecimento for igual ou maior do que 5 mm (SVS, 2010; Goto & Lindoso, 2010). Porém, este teste não diferencia se a infecção é atual ou antiga (pacientes com mais de 2 anos após cura clínica ainda apresentam teste positivo), podendo também ser positivos em indivíduos moradores de áreas endêmicas (Shaw & Lainson, 1975; Reed, 1996; Sassi *et al*, 1999; Follador *et al*, 2002); além de apresentar diferenças de positividade entre as diferentes formas clínicas. Os testes sorológicos detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes e são realizados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA). A sensibilidade destes testes também varia de acordo com a forma clínica (Guimarães *et al*, 1989, 1990) e com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (Romero *et al*, 2005; Barroso-Freitas *et al*, 2009).

Desta forma, devido à variabilidade de sensibilidade e falta de métodos devidamente padronizados, indivíduos com diagnóstico clínico sugestivo de LTA e com teste de Montenegro positivo são normalmente submetidos ao tratamento medicamentoso, mesmo sem a confirmação parasitológica (SVS, 2010). Assim, existe a necessidade do emprego de métodos diagnósticos mais eficazes, e muitos estudos vem sugerindo a utilização de métodos moleculares para este fim, pois são altamente específicos, sensíveis e rápidos, porém sua alta complexidade e custo elevado impedem sua utilização rotineira (Pirmez *et al*, 1999; de Oliveira *et al*, 2003; Schönian *et al*, 2003; Garcia *et al*, 2004; Marques *et al*, 2006; Gomes *et al*, 2008; Luz *et al*, 2009). Atualmente, existem vários alvos e diferentes métodos moleculares para a detecção de *Leishmania* e distinção das diferentes espécies, e os métodos mais utilizados são os baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR). No entanto, os protocolos de PCR precisam ser padronizados e otimizados para o uso em diferentes centros, a fim de se obter resultados comparáveis e confiáveis (Goto & Lindoso, 2010).

Em relação ao tratamento da LTA, as drogas de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ), administrados por via intramuscular ou intravenosa. O antimonial trivalente era usado inicialmente, introduzido no Brasil em 1912 por Gaspar Vianna e, desde 1945, os antimoniais pentavalentes passaram a ser utilizados para o tratamento das leishmanioses (Lima *et al*, 2007). Dois tipos de

antimoniais pentavalentes podem ser utilizados: o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio; mas este último não é comercializado no Brasil, sendo utilizado somente o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime ® Rhodia) (SVS, 2010). A dose recomendada varia de 10 a 20 mg Sb<sup>+5</sup>/kg/dia por um período mínimo de 20 dias (Berman, 1988; Herwaldt & Berman, 1992; SVS, 2010); mas estudos têm sido realizados na tentativa de diminuir a dose administrada devido o medicamento causar muitos efeitos colaterais (Oliveira-Neto *et al*, 1997, 2000; de Oliveira-Neto & Mattos, 2006a, 2006b). Os principais efeitos colaterais causados pelos antimoniais pentavalentes são: mialgias e artralguas, distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça, anorexia, fadiga, febre, reações cutâneas, alterações comportamentais e alterações cardiovasculares, hepáticas, respiratórias e neurológicas (Oliveira *et al*, 2011). Ainda, existe o problema de resistência a estes fármacos, que vem aumentando cada vez mais como resultado de décadas de uso, e em algumas áreas endêmicas sua administração já é limitada devido à falta de eficácia (Kedzierski, 2011). Por isso, outras classes de medicamentos são empregadas no tratamento de segunda escolha: como anfotericina B, pentamidinas e miltefosina (Machado *et al*, 2010; SVS, 2010). Em outros países, são utilizadas ainda outras drogas alternativas, como paromomicina, sitamaquina e azóis (Sundar & Chakravarty, 2013). Entretanto, geralmente os fármacos de segunda escolha são mais tóxicos e geram efeitos secundários mais graves (Kedzierski *et al*, 2009).

O tratamento com antimonial pentavalente é eficaz na maioria dos casos, mas esta eficácia varia de acordo com a forma clínica da leishmaniose e a espécie do parasito (Grogl *et al*, 1992; Romero *et al*, 2001). Na LTA, a cura é considerada com a cicatrização das lesões, que é caracterizada pela total reconstituição do epitélio lesionado e ausência de hiperemia ou edema (Morgado *et al*, 2010). É sabido que esta cura pode ocorrer somente sob o ponto de vista clínico, pois a persistência parasitária já foi observada mesmo anos após a cicatrização da lesão (Schubach *et al*, 1998; Mendonça *et al*, 2004).

### **1.5 Imunopatogenia da leishmaniose tegumentar Americana**

A resposta imune desencadeada na LTA se caracteriza por uma reação de hipersensibilidade tardia, que se inicia com o reconhecimento do patógeno, gerando inicialmente uma resposta imune inata e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (Carrada *et al*, 2007; Schnorr *et al*,

2012). Assim, após a infecção por *Leishmania*, a ação coordenada de células de imunidade inata e adaptativa será determinante para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora.

Diferentes tipos celulares da resposta imune inata interagem com moléculas do parasito (denominadas “PAMPs” – padrões moleculares associados a patógenos) através dos receptores do tipo *Toll* (TLRs). Estudos vêm demonstrando a importância de TLRs específicos na infecção por *Leishmania*, como TLR2 (De Veer *et al*, 2003; Becker *et al*, 2003), TLR3 (Flandin *et al*, 2006), TLR4 (Kropf *et al*, 2004a, 2004b; Ribeiro-Gomes *et al*, 2007) e TLR9 (Li *et al*, 2004). Estas interações fornecem estímulos necessários para ativar a transcrição de genes nas células do sistema inato que são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (Barton & Medzhitov, 2003). Os neutrófilos possuem um papel importante nos momentos mais iniciais da infecção e são constantemente recrutados para o sítio de inoculação dos parasitos, onde atuam na tentativa de impedir a sobrevivência destes, através de mecanismos oxidantes e dependentes de proteases, e ao interagir com monócitos, DC e linfócitos T e B, direcionando as respostas inflamatórias envolvidas na defesa do hospedeiro e na reparação tecidual (Faurischou & Borregaard, 2003; de Moura *et al*, 2005; Nathan, 2006; Nauseef, 2007). Podem ter papel tanto direto na morte de *Leishmania*, quanto indireto, através de mecanismos dependentes de TNF e superóxido que induzem macrófagos a eliminarem promastigotas fagocitadas (Novais *et al*, 2009). Ainda, a fagocitose de neutrófilos necróticos por macrófagos induz a ativação destes, através da produção de mediadores pró-inflamatórios (Savill, 2000; Afonso *et al*, 2008). No entanto, a cooperação entre macrófagos e neutrófilos pode contribuir para a susceptibilidade, uma vez que a fagocitose de neutrófilos apoptóticos gera mediadores anti-inflamatórios (como TGF- $\beta$  e PGE2), que inibem a ativação macrofágica; como visto em modelos de infecção por *L. (L.) amazonensis* (Voll *et al*, 1997; Fadok *et al*, 1998; Afonso *et al*, 2008).

Embora amastigotas possam ser rapidamente encontradas no interior de neutrófilos após a infecção, no interior de fagócitos mononucleares a *Leishmania* encontra um ambiente mais adequado para sua replicação e sobrevivência a longo prazo. DC e macrófagos dérmicos residentes apresentam amastigotas em seu interior poucas horas após a infecção e, após 24 horas, os macrófagos passam a ser a população predominantemente infectada (Ng *et al*, 2008; Peters *et al*, 2008). Os

macrófagos são as células mais importantes do sistema inato na infecção por *Leishmania*, por desempenharem um papel triplo: como células hospedeiras, como células apresentadoras de antígenos (APC) e como células efectoras (Bogdan & Röllinghoff, 1999). Os macrófagos ativados classicamente secretam IL-2 e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), capazes de eliminar os parasitos de forma eficaz; porém, em condições alternativas ou desfavoráveis, os macrófagos ativados preferencialmente ativam a via da arginase para produzir poliaminas, favorecendo assim a replicação do parasito (Iniesta *et al*, 2001; Noël *et al*, 2004; Kreider *et al*, 2007). Os macrófagos infectados atuam ainda como APC e apresentam o peptídeo (antígeno processado) ao receptor de células T (TCR) dos linfócitos Th0 CD4<sup>+</sup> através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. O TCR reconhece o complexo peptídeo-MHC II e, simultaneamente, moléculas co-estimulatórias, como B7-1/B7-2, ICAM-1 e LFA-3, no macrófago são reconhecidas por seus receptores (CD28, LFA-1 e CD2, respectivamente) na superfície dos linfócitos, promovendo então a ativação destes (Reithinger *et al*, 2007; Ruiz & Becker, 2007; Kaye & Scott, 2011)

A presença de citocinas é fundamental para os processos de ativação e controle da disseminação parasitária e estas são inicialmente produzidas por células do sistema imune inato. No entanto, após esta resposta inicial inespecífica, uma resposta imune adquirida, específica aos antígenos de *Leishmania*, determina o curso da infecção (Bogdan & Röllinghoff, 1999; Silveira *et al*, 2009).

O desenvolvimento da lesão e a evolução da doença são determinados pela natureza e magnitude da resposta imune mediada por linfócitos T. A atividade efetora mútua e a cooperação entre os linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> parecem definir o curso da doença, responsável pela imunopatogenia da LTA (Castés & Tapia, 1998). Após serem ativados, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> passam a ser responsáveis por orquestrar e direcionar a resposta imune adaptativa. Em infecções por *Leishmania* é evidenciado um perfil misto de produção de citocinas, estando uma resposta do tipo 1 (com produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-2 e IFN- $\gamma$ ) associada a um bom prognóstico e evolução para a cura, enquanto uma resposta do tipo 2 (com produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-5 e IL-10) é relacionada a uma anergia celular e progressão da doença (Scott, 1991; Pirmez *et al*, 1993; Coutinho *et al*, 1996; Santiago *et al*, 2000; Da-Cruz *et al*, 2002).

Enquanto os perfis de produção de citocinas vêm sendo mais bem definidos e estudados, o papel da citotoxicidade na leishmaniose ainda não foi elucidado, e tem sido associado tanto à defesa do organismo como à destruição tecidual (Brodskyn *et al*, 1997; Machado *et al*, 2002; Faria *et al*, 2009; Santos *et al*, 2013). A citotoxicidade é um mecanismo efetor exercido por linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, células *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT) (Ruiz & Becker, 2007). Estas células citotóxicas, quando ativadas, passam a exercer suas funções citotóxicas através de dois mecanismos principais: pela exocitose de grânulos líticos (grânulo-dependente); e pela expressão de FasL (CD95L), que induz a trimerização do receptor Fas (CD95) nas células-alvo; ambos os mecanismos necessitam de contato célula-célula e induzem a apoptose nas células-alvo através da ativação de caspases (Trapani & Smyth, 2002). Ainda, TNF e TRAIL também são capazes de induzir a apoptose através de mecanismos semelhantes aos de FasL, porém com menor eficiência (Orange & Ballas, 2006).

Embora os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT exerçam atividade citotóxica comum, os mecanismos de reconhecimento são diferentes. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> citotóxicos e as células NKT induzem apoptose da célula-alvo após o reconhecimento antigênico específico, através do MHC classe I, classe II e CD1d, respectivamente. Já as células NK são ativadas e destroem células-alvo através de mecanismos independentes de apresentação antigênica específica (Chávez-Galán *et al*, 2009).

### 1.5.1 Linfócitos T CD8<sup>+</sup>

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> reconhecem, através de seu TCR, os peptídeos que são apresentados no contexto MHC classe I. Geralmente estes peptídeos são de origem endógena, entretanto também pode ocorrer por esta via a apresentação de peptídeos exógenos através de um mecanismo de “apresentação cruzada”, como observado com antígenos de *Leishmania* (Bertholet *et al*, 2006). Após a ativação, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> se diferenciam em células efetoras e adquirem a capacidade citotóxica e de produção de citocinas, principalmente IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, mas também IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e TGF- $\beta$  (Kaech *et al*, 2002; Ruiz & Becker, 2007; Jordan & Hunter, 2010). Além destas funções, estudos recentes têm descrito um papel regulador destes linfócitos, possivelmente induzido por uma potente estimulação do TCR, que promove a produção de IL-10. Estes linfócitos ainda produzem níveis elevados de IFN- $\gamma$  e TNF e são altamente capazes de destruir

as células-alvo (Sun *et al*, 2009; Palmer *et al*, 2010; Trandem *et al*, 2011; Zhang & Bevan, 2011). Estes linfócitos T CD8<sup>+</sup> regulatórios também foram observados em pacientes infectados por *L. (V.) guyanensis*, porém o papel destes na resposta imune contra parasitos ainda é desconhecido (Bourreau *et al*, 2007).

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> participam ativamente na resposta imune na leishmaniose, e suas funções citotóxicas e de produção de citocinas têm sido associadas à cura da doença, principalmente em estudos de infecção por *L. (V.) braziliensis* (Da-Cruz *et al*, 1994, 2002, 2005; Coutinho *et al*, 1998; Bittar *et al*, 2007). Neste contexto, tem sido demonstrado um menor percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> durante a fase ativa da infecção, e este se restabelece durante o processo de cura (Da-Cruz *et al*, 2002; Ferraz, 2011). Ainda, um maior percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> apoptóticos foi observado em lesões de pacientes na fase ativa da doença quando comparados a pacientes que curaram espontaneamente (Bertho *et al*, 2000). Seu papel protetor também tem sido demonstrado em relação à sua atividade citotóxica em infecções por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, em que estes linfócitos possuem a capacidade de lisar macrófagos autólogos infectados (Da Conceição-Silva *et al*, 1994; Russo *et al*, 1999; Bousoffara *et al*, 2004). Ainda, foi evidenciado que linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes com LCD apresentam uma significativa redução da capacidade citotóxica e da produção de citocinas frente macrófagos autólogos infectados por *L. (L.) mexicana*, quando comparados com pacientes de LC (Hernández-Ruiz *et al*, 2010).

Apesar do papel citotóxico de linfócitos T CD8<sup>+</sup> ser constantemente relacionado à cura, alguns estudos indicam um papel antagônico, associando suas funções ao dano tecidual e exacerbação da doença. A presença de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK com forte expressão de TIA-1 (uma molécula associada com citotoxicidade) foi observada em lesões de pacientes de LC, sugerindo a participação destas células na patogenia da doença, podendo ser tanto na tentativa de eliminar o parasito, quanto estar contribuindo para o desenvolvimento da lesão (Machado *et al*, 2002). Linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes de LC em estágio tardio apresentam maior expressão de granzima A que pacientes em estágio inicial, e esta expressão foi positivamente correlacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório nos pacientes em estágio tardio, mas não nos pacientes em estágio inicial, sugerindo que há um recrutamento de linfócitos T CD8<sup>+</sup> com perfil citotóxico para a lesão, que é associado com a progressão da infecção (Faria *et al*, 2009). A

associação da ação citotóxica com o dano tecidual também foi observada em pacientes de LM (Brodskyn *et al*, 1997). Neste contexto, os linfócitos T CD8<sup>+</sup> parecem desempenhar papéis distintos em diferentes fases da leishmaniose e nas diferentes formas clínicas, sendo necessários mais estudos no intuito de desvendar os fatores que determinam quando esta resposta é protetora e quando contribui para a manutenção da infecção.

### **1.5.2 Células *natural killer* (NK)**

As células NK são um subtipo de linfócitos granulares caracterizados pela perda de expressão de CD3 e estão envolvidas na resposta imune em vários tipos de tumores e infecções por patógenos, limitando sua propagação e o dano tecidual subsequente (Cooper *et al*, 2001). São importantes componentes da resposta imune inata, mas interagem com a resposta imune adaptativa (Moretta *et al*, 2002). Suas funções são reguladas pela integração de sinais de receptores de ativação e receptores inibitórios que reconhecem ligantes na superfície de células-alvo potenciais. A regulação positiva de ligantes para receptores de ativação na NK (por exemplo, NKG2D) ou a regulação negativa de ligantes para receptores de inibição (por exemplo, CD94-NKG2A) já são estímulos relevantes para a ativação destas células (Lanier, 2008; Yokoyama, 2008a, 2008b). Muitos dos receptores inibitórios expressos pelas células NK, como os KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*), reconhecem moléculas de MHC classe I. Deste modo, a ausência ou alteração da expressão de MHC classe I, geralmente observadas em células infectadas, impede a ligação do sinal inibitório, resultando na ativação das células NK (Lanier, 2001, 2008; Held *et al*, 2011).

Depois de ativadas, as células NK adquirem a capacidade de exercer suas funções efetoras: 1) Produção de citocinas e quimiocinas, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF, que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta tipo 1 e ativação de macrófagos para execução de mecanismos antimicrobicidas (Bogdan, 2001; Laouar *et al*, 2005); mas também são capazes de produzir GM-CSF, IL-5, IL-13, MIP-1 e RANTES (Loza *et al*, 2002; Robertson, 2002; Dorner *et al*, 2004). Ainda, células NK adquirem capacidade de produzir IL-10 durante infecções sistêmicas, atuando como reguladores da resposta imune através da inibição de IL-12, como demonstrado em modelo experimental de infecção por *L. (L.) donovani* (agente etiológico da LV) (Maroof *et al*, 2008); 2) Expressão de ligantes co-estimulatórios (como CD40L e

OX40L) para linfócitos T ou B, fazendo uma ligação entre a imunidade inata e adaptativa. As APC estimulam células NK, que, por sua vez, fornecem sinais co-estimulatórios para os linfócitos (Blanca *et al*, 2001; Zingoni *et al*, 2004); 3) Mecanismos de citotoxicidade, dos quais o principal é via exocitose de grânulos; sendo também capazes de realizar lise de células-alvo via FasL, TNF ou TRAIL, porém com menor eficiência e mais lentamente (Orange & Ballas, 2006). Além destes mecanismos de citotoxicidade já citados anteriormente, as células NK possuem ainda a capacidade de lisar diretamente células revestidas por anticorpos, através de um mecanismo denominado citotoxicidade anticorpo-dependente (ADCC – *Antibody-dependent cell cytotoxicity*), por meio da ativação do receptor CD16 (Chan *et al*, 2012).

Fenotipicamente, as células NK são definidas por sua expressão de CD56 e CD16 e ausência de CD3 (Robertson & Ritz, 1990). As subpopulações de células NK mostram importantes diferenças em relação ao potencial citotóxico e à capacidade de produção e resposta a citocinas, podendo ser diferenciadas com base na expressão de CD16 e de CD56. A maioria das células NK sanguíneas humanas (cerca de 90%) exibem baixa expressão de CD56 (CD56<sup>dim</sup>) e alta expressão de CD16 (CD16<sup>bright</sup>); enquanto cerca de 10% das células NK apresentam alta expressão de CD56 (CD56<sup>bright</sup>) e uma baixa expressão de CD16 (CD16<sup>dim</sup>) ou ainda são CD56<sup>bright</sup> e CD16 negativas (CD16<sup>-</sup>). Os primeiros estudos funcionais revelaram que células CD56<sup>dim</sup> em repouso são os subtipos mais citotóxicos, enquanto as células CD56<sup>bright</sup> são mais potentes produtores de citocinas e menos citotóxicos (Lanier *et al*, 1986; Cooper *et al*, 2001). Esta diferença de funcionalidade entre os subtipos de células NK estimularam estudos neste enfoque, e estes vêm mostrando outras diferenças fenotípicas e funcionais significativas. As duas principais famílias de receptores que reconhecem MHC I são diferentemente distribuídas entre os subtipos: células NK CD56<sup>dim</sup> expressam elevados níveis de KIRs e baixos níveis de CD94-NKG2, enquanto as CD56<sup>bright</sup> exibem o oposto (Inngjerdingen *et al*, 2011). Os subtipos diferem também quanto à localização tecidual, o que certamente reflete nas suas funções *in vivo*. Como já citado, a grande maioria das células NK sanguíneas são CD56<sup>dim</sup>, entretanto as células NK sanguíneas CD56<sup>bright</sup> expressam importantes moléculas de *homing* para os linfonodos, como CCR7, CXCR3 e CD62L (Campbell *et al*, 2001; Cooper *et al*, 2001). De acordo com estes achados, foi mostrado que as células NK CD56<sup>bright</sup> são a principal população de células NK nos linfonodos, assim como nas tonsilas,

pulmões, mucosas e útero (Ferlazzo *et al*, 2004). Ainda, as células NK CD56<sup>bright</sup> são as responsáveis pela ADCC, devido a sua alta expressão de CD16 (Inngjerdingen *et al*, 2011).

Muitos estudos apontam para um papel protetor das células NK na leishmaniose tegumentar. Células NK de indivíduos curados ou indivíduos sadios moradores de área endêmica são capazes de uma proliferação mais acentuada após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* quando comparados com pacientes com LC ativa (Maasho *et al*, 1998). Outros experimentos *in vitro* demonstram a importância das células NK devido a sua ação citotóxica, lisando macrófagos infectados e induzindo a morte de promastigotas extracelulares; e de produção de citocinas, direcionando a resposta imune para um perfil Th1 e ativando macrófagos (Resnick *et al*, 1988; Scharon & Scott, 1993; Laskay *et al*, 1995; Diefenbach *et al*, 1998; Stenger *et al*, 1998; Aranha *et al*, 2005; Bajénoff *et al*, 2006; Lieke *et al*, 2011). Foi possível detectar a atividade citotóxica e de produção de IFN- $\gamma$  das células NK em linfonodos periféricos logo no primeiro dia de infecção por *L. (L.) major* em modelos experimentais de LC com cura espontânea (Bajénoff *et al*, 2006). Entretanto, alguns estudos sugerem que o papel citotóxico das células NK na leishmaniose tegumentar não seja protetor, contribuindo para a progressão da lesão leishmaniótica (Brodszyn *et al*, 1997; Machado *et al*, 2002).

A reunião dos conceitos expostos acima elucidada que as células NK são componentes importantes na resposta imune contra patógenos intracelulares, como a *Leishmania*, seja por sua ação citotóxica, induzindo a morte de células infectadas pela liberação de grânulos citotóxicos; pela produção de citocinas; ou por suas funções regulatórias, interagindo com DC, macrófagos, células T e células endoteliais, podendo, assim, modular respostas imunes (Vivier *et al*, 2008; Krebs *et al*, 2009; Prajeeth *et al*, 2011)

### **1.5.3 Células *natural killer* T (NKT)**

As células NKT são subtipos de linfócitos que expressam receptores de superfície característicos de linfócitos T (CD3) e de células NK (CD56 e CD16), promovendo uma interação entre o sistema imune inato e adaptativo. Apesar de apresentarem TCR, como os linfócitos T convencionais, nas células NKT estes receptores interagem com uma variedade limitada de antígenos, similarmente aos receptores de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) da imunidade

inata. Estes antígenos são de natureza lipídica ou glicolipídica e são apresentados exclusivamente pela glicoproteína CD1d, uma molécula semelhante ao MHC I, às células NKT. A CD1d é expressa predominantemente por células hematopoiéticas e mais abundantes nas APC, timócitos CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (duplo-positivos) e linfócitos B de zona marginal (Bendelac *et al*, 1995; Taniguchi *et al*, 2003; Brigl & Brenner, 2004; Godfrey *et al*, 2004; Kronenberg, 2005; Bendelac *et al*, 2007; Van Kaer, 2007). A maioria das células NKT é denominada tipo I ou invariante (iNKT) e expressam um TCR semi-invariante composto das cadeias V $\alpha$ 24J $\alpha$ 18 e V $\beta$ 11 (Porcelli *et al*, 1993; Dellabona *et al*, 1994; Lantz & Bendelac, 1994; Godfrey *et al*, 2004); o outro subtipo, denominadas tipo II ou variantes (vNKT), expressam TCR mais diversos e frequentemente possuem função oposta ou regulatória às células iNKT (Arrenberg *et al*, 2009). O termo “invariante” para definir o principal subtipo de célula NKT não é adequado, visto que seu TCR exibe um alto grau de variabilidade no *loop* do CDR3 (Lantz & Bendelac, 1994; Matsuda *et al*, 2001; Gapin, 2010). Outro parâmetro que é comumente utilizado para definir as células iNKT é sua habilidade de reconhecer e ser fortemente ativada por  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ GalCer) (Godfrey *et al*, 2004), que é um glicolípido com potentes efeitos anti-tumorais em camundongos (Kawano *et al*, 1997). As células vNKT também são restritas à apresentação antigênica por CD1d, porém não possuem TCR semi-invariante e não são capazes de reconhecer  $\alpha$ GalCer (Godfrey *et al*, 2004; Rhost *et al*, 2012). Este tipo celular expressa um repertório de TCR mais diverso, que é pouco conhecido e reconhecem uma variedade de antígenos hidrofóbicos, incluindo sulfatide, lisofosfatidilcolina e pequenas moléculas aromáticas (não-lipídicas), que não são geralmente considerados como sendo agonistas para as células iNKT (Jahng *et al*, 2004; Van Rhijn *et al*, 2004; Chang *et al*, 2008; Arrenberg *et al*, 2010; Godfrey *et al*, 2010a).

Funcionalmente, as células NKT se assemelham mais às células do sistema imune inato por exercerem suas funções efetoras rapidamente após ativação; por serem incapazes de desenvolver memória imunológica; e por apresentarem tendência à autorreatividade (Van Kaer *et al*, 2011). Apesar de as células NKT serem capazes de exercer funções citotóxicas (expressam perforina e FasL), estas são mais conhecidas por sua potente capacidade de produção de citocinas variadas (tanto do tipo Th1 quanto Th2), desempenhando principalmente papel regulador em uma ampla gama de respostas imunes (Godfrey & Kronenberg, 2004; Godfrey *et al*, 2004; Bendelac *et al*, 2007). As células NKT humanas podem ser CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> ou duplo-negativas (DN), apesar de se desenvolverem independente de sinalização de

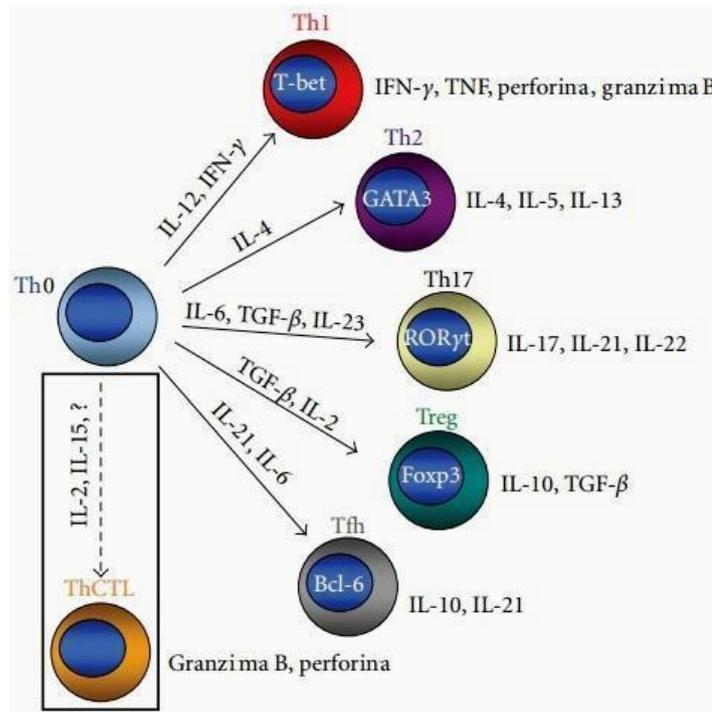
MHC I ou II. Diferenças funcionais têm sido observadas entre estes subtipos e existem evidências de que a molécula CD4 é a responsável por estas diferenças (Gumperz *et al*, 2002; Lee *et al*, 2002; Chen *et al*, 2007; Thedrez *et al*, 2007; Godfrey *et al*, 2010b). As células NKT CD4<sup>+</sup> produzem maiores níveis de IL-4, IL-13, GM-CSF e IL-2 do que as células NKT que não expressam CD4, enquanto a produção de TNF e IFN- $\gamma$  é elevada em todos os subtipos. As células NKT CD8<sup>+</sup> exibem atividade citotóxica mais potente do que as células NKT DN e CD4<sup>-</sup>, respectivamente (Gumperz *et al*, 2002; Lee *et al*, 2002; O'Reilly *et al*, 2011).

As células NKT estão envolvidas em processos imunológicos em diversas doenças, como câncer e doenças auto-imunes, rejeição a transplantes e imunidade contra agentes infecciosos, como a *Leishmania* (Bendelac *et al*, 2007). A *L. (L.) major* parece ser capaz de inibir a expressão de CD1d nas DC, diminuindo a ativação de células NKT (Donovan *et al*, 2007). Ainda assim, estas células têm sido associadas a um papel crucial nos estágios iniciais da resposta imune protetora e no direcionamento para um perfil de resposta Th1 ou Th2 em infecções por *L. (L.) major* (Ishikawa *et al*, 2000; Wiethe *et al*, 2008). Entretanto, os estudos sobre a atividade das células NKT na LTA são extremamente escassos, sendo a grande maioria em relação à LV.

#### **1.5.4 Linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos**

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são ativados após o reconhecimento de peptídeos apresentados pelo MHC II em conjunto com sinais co-estimulatórios, e passam a orquestrar a resposta imune adaptativa. Seu papel na indução e na manutenção desta resposta é considerado indireto, comandando a resposta de linfócitos B, a ativação macrófágica, a geração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de memória e CD8<sup>+</sup> efetores, e regulando as respostas inflamatórias (Zhu & Paul, 2008). Normalmente são divididos em subtipos com base no perfil de citocinas produzidas e fatores de transcrição envolvidos, induzindo assim respostas específicas: Th1 secretam principalmente IFN- $\gamma$  e são importantes contra infecções causadas por patógenos intracelulares; Th2 secretam principalmente IL-4 e IL-5 e fornecem proteção contra patógenos extracelulares; Th17 secretam principalmente IL-17 e são importantes em infecções fúngicas, na regulação da inflamação durante infecções e na autoimunidade; T reguladoras (Treg) secretam IL-10 e TGF- $\beta$  e atuam na tolerância periférica e na regulação de respostas após infecções; e T foliculares (Tfh) secretam principalmente

IL-21 e são especializadas em interagir com as células B (Weaver *et al*, 2006; Zhu & Paul, 2008; Ma *et al*, 2012) (Figura 1.3). Entretanto, em adição a estas funções auxiliares, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são capazes de exercerem papel citotóxico, com a habilidade de matar diretamente células infectadas ou alteradas (Brown, 2010) (Figura 1.3).



**Figura 1.3:** Diferenciação dos subtipos efetores de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Th). Os subtipos efetores são classificados pelo fator de transcrição dominante e pelo *milieu* de citocinas produzidas. Adaptado de Marshall & Swain, 2011.

Apesar do papel citotóxico dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> vir sendo observado há mais de três décadas tanto em humanos quanto em camundongos, tais relatos eram isolados e geralmente associados a longos períodos de cultura, tendo sido considerado por alguns autores como artefato (Wagner *et al*, 1977; Feighery & Stastny, 1979; Fleischer, 1984; Tite & Janeway, 1984; Lukacher *et al*, 1985; Maimone *et al*, 1986).

Os linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos (ThCTL) exercem sua função citotóxica efetora principalmente através da exocitose de grânulos, mas também são capazes de induzir a morte das células-alvo através de FasL (Williams & Engelhard, 1996; Namekawa *et al*, 1998; Echchakir *et al*, 2000; Yasukawa *et al*, 2000; Norris *et al*, 2001). Podem ainda produzir citocinas com perfil Th1, como IFN-γ, principalmente, TNF e IL-2 (Gagnon *et al*, 1999; Appay *et al*, 2002; Brien *et al*, 2008). Entretanto,

apesar de compartilharem esta característica com os linfócitos Th1, uma condição polarizada por citocinas com este perfil não é ideal para a geração de ThCTL, sendo melhores induzidos na presença de IL-2, IL-12 e IL-15 (Brown *et al*, 2009; Marshall & Swain, 2011)

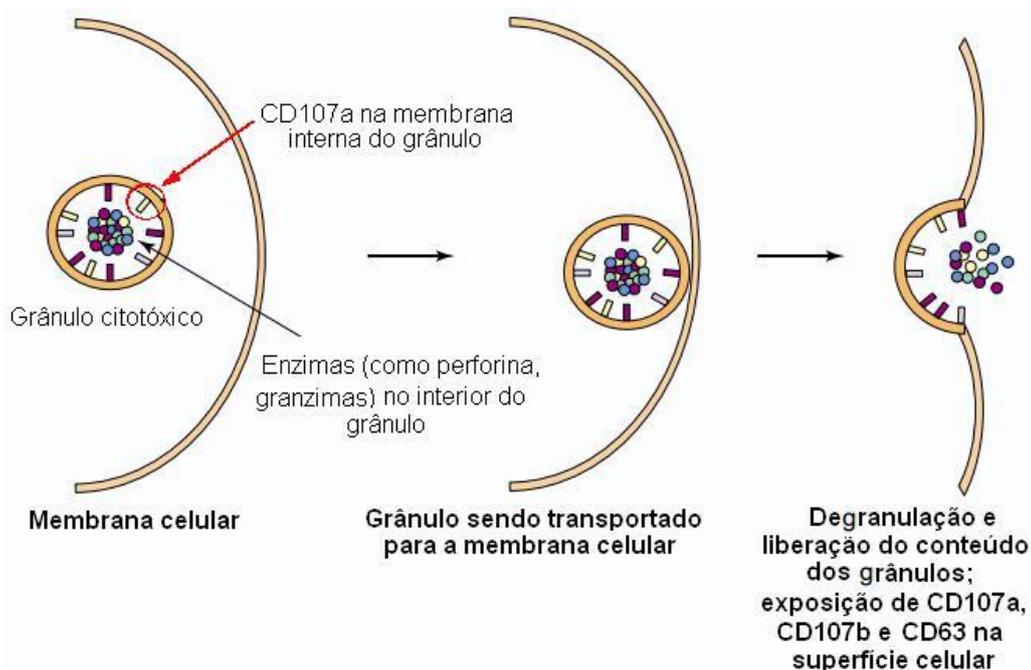
A maioria dos estudos identificando os linfócitos ThCTL tem sido nas infecções virais, sendo relatados no sangue periférico de pacientes com citomegalovírus, Epstein Barr vírus, hepatites, HIV, dengue e, mais recentemente, influenza, indicando que estas células estão presentes tanto em infecções crônicas quanto agudas (Gagnon *et al*, 1999; van Leeuwen *et al*, 2004; Zaunders *et al*, 2004; Aslan *et al*, 2006; Casazza *et al*, 2006; Haigh *et al*, 2008). Foram também descritos em tumores e em infecções por *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium tuberculosis* (Canaday *et al*, 2001; Zheng *et al*, 2007; Klucar *et al*, 2008; Quezada *et al*, 2010; Xie *et al*, 2010). Entretanto, muito pouco é conhecido sobre o papel dos linfócitos ThCTL nas infecções não-virais e os fatores que levam à geração desta população.

O principal mecanismo citotóxico efetor das populações celulares citotóxicas mencionadas (linfócitos T CD8<sup>+</sup> e ThCTL, células NK e NKT) é através da exocitose de grânulos. Por esta via, após a ativação das células citotóxicas se inicia uma cascata de sinalização intracelular que rapidamente direciona os grânulos secretórios dispersos no citoplasma para o sítio da sinapse imunológica formada com a célula-alvo e liberam seu conteúdo tóxico (Faroudi *et al*, 2003; Lopez *et al*, 2012). Estes grânulos secretórios possuem um denso núcleo onde são armazenadas proteínas que, cooperativamente, causam a morte da célula-alvo. Destas, as principais são perforinas e granzimas, mas também estão presentes granulinas e catepsinas (Page *et al*, 1998; Balaji *et al*, 2002).

A perforina é encontrada dentro dos grânulos como um monômero solúvel e é liberada pela degranulação da célula citotóxica na sinapse imunológica formada com a célula-alvo (Peters *et al*, 1991). Após liberada, ela se ancora na membrana externa da célula-alvo e inicia a polimerização na presença de cálcio (Ca<sup>2+</sup>) para formar poros transmembrana na célula-alvo com diâmetro interno de 5 a 20 nm (Sauer *et al*, 1991; Liu *et al*, 1995; Voskoboinik *et al*, 2005). Os poros formados pela perforina podem servir como condutores passivos de granzimas e granulinas através da membrana da célula-alvo e permitir uma troca iônica, o que gera um desequilíbrio

osmótico e, em consequência, a morte da célula (Liu *et al*, 1995). Porém, apesar de ser a hipótese mais aceita, existem poucas evidências experimentais para suportá-la, e os mecanismos pelos quais as granzimas entram na célula-alvo vêm sendo alvo de debates (Chávez-Galán *et al*, 2009). (Motyka *et al*, 2000) demonstraram que granzima B é capaz de entrar na célula-alvo mesmo na ausência de perforina, devido à granzima formar um complexo com o receptor manose-6-fosfato, independentemente de cátions, que é então internalizado por endocitose. Dentro da célula-alvo, granzimas e granulinas são liberadas e interagem com seu substrato para a indução de apoptose. Entretanto, (Trapani *et al*, 2003) mostraram que o receptor manose-6-fosfato não é necessário para a entrada de granzima B nas células-alvo. Outro estudo evidenciou que granzimas são capazes de aderir na superfície da célula-alvo por ligação eletrostática enquanto o poro formado por perforina induz o fluxo de  $\text{Ca}^{2+}$  do meio extracelular para o meio intracelular. Esta entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  causa ativação na célula-alvo, que, ao tentar reparar a alteração na membrana para evitar necrose, internaliza granzimas juntamente com a perforina, que são então liberadas no citoplasma da célula-alvo (Keefe *et al*, 2005); confirmando a hipótese do receptor manose-6-fosfato não ser necessário (Trapani *et al*, 2003; Keefe *et al*, 2005). Entretanto, estudos indicam que, mesmo que a perforina não seja essencial para a entrada das proteases na célula-alvo, sua presença é necessária para a citólise (Chávez-Galán *et al*, 2009).

Na superfície dos grânulos líticos são expressas proteínas de membrana associadas à lisossomos (LAMPs – *lysosomal-associated membrane proteins*), incluindo CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) e CD63 (LAMP-3). Essas moléculas são encontradas na membrana interna dos grânulos e são expostas na superfície das células citotóxicas no processo de degranulação, que é um pré-requisito para a lise das células-alvo mediada por grânulos (Peters *et al*, 1991; Betts *et al*, 2003) (Figura 1.4). Tem sido sugerido que LAMPs e catepsina B possuam a função de impedir a auto-destruição das células citotóxicas, o que pode ser relacionado a alta glicosilação destas proteínas, formando uma matriz que mantém as proteases em estado inativo (Fukuda, 1991; Kannan *et al*, 1996; Balaji *et al*, 2002; Lopez *et al*, 2012).



**Figura 1.4:** Representação esquemática da expressão de CD107a, assim como de CD107b e CD63, na superfície das células citotóxicas durante o processo de degranulação. A presença de anticorpos anti-CD107 na cultura permite a marcação destas moléculas transitoriamente expostas. Adaptado de Suni *et al*, 2005.

Assim, a expressão do CD107a tem sido utilizada como marcador de degranulação de células citotóxicas em resposta a infecções, antígenos específicos, citocinas e linhagens de células-alvo, em ensaios onde as populações respondedoras podem ser definidas fenotipicamente por citometria de fluxo (Betts *et al*, 2003; Alter *et al*, 2004; Aktas *et al*, 2009; Al-Hubeshy *et al*, 2011). O aumento da expressão de CD107a tem sido correlacionado com um aumento de secreção de citocinas e perda de perforina pelas células citotóxicas e aumento de morte de células-alvo (Alter *et al*, 2004; Aktas *et al*, 2009).

## 1.6 Citometria de fluxo aplicada à avaliação da citotoxicidade

O padrão-ouro para avaliação da citotoxicidade mediada por células (principalmente pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>) era o ensaio de liberação de cromo (<sup>51</sup>Cr), no qual células-alvo eram marcadas com cromo radioativo e, após o reconhecimento e morte destas células pelas células efetoras específicas, liberavam o cromo no meio extracelular (Brunner *et al*, 1968). Este tipo de ensaio avalia diretamente a destruição das células-alvo, através da detecção do cromo liberado, correlacionando com a função citotóxica das células efetoras. Este ensaio apresenta algumas

desvantagens por ser radioativo, pouco sensível e não fornecer nenhuma informação acerca da quantidade ou do tipo de células citotóxicas efectoras.

Com o advento da citometria de fluxo, esta se mostrou apropriada na avaliação da capacidade citotóxica das células, tornando-se a técnica de escolha para este tipo de avaliação por identificar qual a população celular seria responsável pela atividade citotóxica. Inicialmente, usando a citometria de fluxo, vários ensaios foram desenvolvidos com intuito de avaliar a função das células citotóxicas através da morte das células-alvo: alguns utilizaram corantes fluorescentes para marcar as células-alvo, como o CFSE, PKH-26, CMTMR (Ritchie *et al*, 2000; Sheehy *et al*, 2001; Fischer *et al*, 2002); outros utilizaram marcadores de morte celular, como 7-AAD ou anexina V (Lecoeur *et al*, 1997, 2001); e marcadores de caspases (Liu *et al*, 2002; Chahroudi *et al*, 2003). Porém, nenhum destes ensaios fornecia informações suficientes acerca da identidade, fenótipo e frequência das células citotóxicas que de fato estariam mediando a morte das células-alvo. Devido a isto, os ensaios baseados na marcação de proteínas líticas (como granzimas e perforinas) passaram então a ser os mais utilizados na tentativa de avaliar a citotoxicidade, pois fornecem tais informações. Através destes ensaios, torna-se possível determinar se a célula possui perfil citotóxico, porém não permite uma avaliação de sua atividade citotóxica (Appay *et al*, 2000; Sandberg *et al*, 2001).

Mais recentemente foi então descrito o ensaio citofluorimétrico de marcação do CD107a para avaliação da atividade citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Betts *et al*, 2003). Embora este ensaio não mensure diretamente a lise das células-alvo, estudos já confirmaram a associação positiva entre a expressão de CD107a pelas células citotóxicas e a lise de células-alvo, em associação com a perda de perforina (Betts *et al*, 2003; Alter *et al*, 2004; Aktas *et al*, 2009). Este ensaio promove uma ligação entre os métodos diretos e indiretos de análise de células citotóxicas efectoras, permitindo a caracterização fenotípica e funcional precisa, pois utiliza um marcador que só é expresso durante o processo de degranulação. Além de ser simples, rápido e sensível, é ainda facilmente adaptável a combinação com outros marcadores, como para avaliação da produção de citocinas e apoptose.

## 2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde uma das doenças tropicais de maior importância para a saúde pública. No Brasil, são registrados anualmente cerca de 30.000 novos casos de leishmaniose tegumentar Americana (LTA), sendo a maioria causada pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* (SVS, 2010). A LTA apresenta um amplo espectro de formas clínicas de gravidade variada, causando desde lesões localizadas a graves deformações. As manifestações clínicas se desenvolvem muito mais devido à uma forte resposta imune, do que propriamente pela ação do parasito (Handman, 1999). Sendo assim, um maior conhecimento dos fenômenos que ocorrem nas respostas imunes contra a *Leishmania* torna-se de fundamental importância para estabelecer parâmetros imunológicos associados com a patogênese, assim como com a cura e a resposta protetora na LTA.

Muitos trabalhos sugerem um importante papel citotóxico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no processo de resolução da infecção por *Leishmania* (Coutinho *et al*, 1984; da Conceição-Silva *et al*, 1994; Müller *et al*, 1994; Russo *et al*, 1999; Colmenares *et al*, 2003; Bousoffara *et al*, 2004), enquanto outros apontam para um papel na injúria tecidual (Barral-Netto *et al*, 1995; Brodskyn *et al*, 1997; Santos *et al*, 2013). Sendo assim, a fim de obter um maior entendimento acerca do papel da citotoxicidade na patogênese ou na proteção na leishmaniose tegumentar Americana, o desenho experimental deste trabalho visa avaliar a frequência e a atividade citotóxica das populações celulares capazes de exercerem tal atividade, como os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT, a partir de amostras de sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea e de leishmaniose mucosa.

Neste contexto, as informações obtidas através de uma análise fenotípica/funcional das células obtidas de pacientes de LTA em evolução para a cura podem trazer novas perspectivas para estudos em vacinas e esquemas terapêuticos mais eficientes e menos agressivos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o papel citotóxico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT na evolução para a cura clínica da leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa.

#### **3.2 Objetivos específicos**

3.2.1 Correlacionar uma possível modulação da distribuição das populações de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT com a forma ativa das leishmanioses cutânea e mucosa e com o processo de evolução para a cura clínica.

3.2.2 Correlacionar a atividade citotóxica exercida pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT com a forma ativa da leishmaniose cutânea e mucosa e com o processo de evolução para a cura clínica;

3.2.3 Avaliar o perfil citotóxico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT de em resposta a antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*, a partir de amostras de pacientes com a forma ativa das leishmanioses cutânea e mucosa; durante seus tratamentos; e após a cura clínica;

3.2.4 Correlacionar uma possível modulação da distribuição das diferentes subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) e NKT (NK CD8<sup>+</sup>, NKT CD4<sup>+</sup> e NKT DN) com a forma ativa das leishmanioses cutânea e mucosa e com o processo de evolução para a cura clínica.

3.2.5 Avaliar o perfil de distribuição e de citotoxicidade das diferentes subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) e NKT (NK CD8<sup>+</sup>, NKT CD4<sup>+</sup> e NKT DN) em resposta a antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*, a partir de amostras de pacientes com a forma ativa das leishmanioses cutânea e mucosa; durante seus tratamentos; e após a cura clínica

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 Casuística

Foram avaliados neste estudo 10 indivíduos sadios e 13 pacientes de LTA, todos adultos, com idade entre 18 e 60 anos. Os indivíduos sadios (controles – CTRL) não possuíam histórico prévio de leishmaniose e não residiam em áreas endêmicas desta doença. Os pacientes eram residentes no estado do Rio de Janeiro e foram atendidos e diagnosticados para LC ou LM no ambulatório do Centro de Referência em Leishmanioses do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas (IPEC)/ FIOCRUZ após serem feitas as devidas avaliações da história clínica e epidemiológica; Intradermorreação de Montenegro; detecção de anticorpos específicos para *L. (V.) braziliensis* através do ELISA; isolamento e caracterização do parasito; e diagnóstico diferencial com outras doenças através de exame micológico e bacteriológico. Os pacientes diagnosticados positivamente para leishmaniose foram então submetidos a um ensaio clínico de tratamento, randomizado e duplo cego, com Glucantime®. Destes pacientes de LTA, 9 eram de LC e 4 de LM, os quais foram divididos em 3 grupos:

- Pacientes antes do tratamento (AT): Pacientes de LC (n=6) e LM (n=4) sem tratamento prévio e apresentando lesões características. O diagnóstico foi confirmado por critérios clínicos, epidemiológicos e exames parasitológicos pela equipe do Centro de Referência em Leishmanioses do IPEC/ FIOCRUZ.
- Pacientes durante o tratamento (DT): Pacientes de LC (n=6) e LM (n=2) no vigésimo dia após o início do tratamento com Glucantime®. Tais pacientes apresentavam lesões ainda não totalmente cicatrizadas.
- Pacientes pós-tratamento (PT): Pacientes de LC (n=5) e LM (n=3) no octagésimo dia após o início do tratamento com Glucantime®, momento no qual as terapias já haviam sido concluídas e os pacientes foram considerados clinicamente curados de acordo com critérios definidos pela equipe médica do IPEC/ FIOCRUZ.

Através da investigação dos prontuários dos pacientes, foi possível a associação de informações epidemiológicas e clínicas, como idade e sexo, número

de lesões durante a fase ativa, tempo de evolução, local de residência dos indivíduos, resposta ao tratamento, cura clínica, reativação e re-infecção.

O critério de cura clínica foi definido por epitelização total das lesões após conclusão do esquema terapêutico (SVS, 2010). Em caso de ausência de cicatrização completa após uso do Glucantime® o tratamento foi insatisfatório, ou seja, foi considerado como “falha terapêutica”, sendo, nestes casos, necessário um esquema terapêutico alternativo ou a repetição de um ciclo da mesma terapia antimonial, o que não ocorreu neste estudo, já que todos os pacientes avaliados apresentaram cura clínica após a terapia e ausência de reativação até o octagésimo dia após o início do tratamento.

Os critérios para inclusão dos pacientes no estudo foram: idade entre dezoito e sessenta anos; ausência de comorbidade, gravidez e tratamento prévio com leishmanicidas.

O presente estudo segue a resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos. O desenho experimental e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (anexo 1) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IPEC (CEP-IPEC)/FIOCRUZ sob o número 029/2012.

## **4.2 Coleta do material biológico**

Amostras de sangue periférico foram obtidas por punção venosa em tubos heparinizados (Becton, Dickinson and Company – BD, Franklin Lakes, NJ, E.U.A.) em um volume máximo de 40 mL de sangue de cada indivíduo no IPEC, por profissionais capacitados, e enviadas ao laboratório para seguinte processamento. O tempo máximo entre a coleta do material biológico e o processamento do mesmo foi 24 horas, e durante este período, os tubos com sangue ficaram à temperatura de  $20^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  sob homogeneização (Arsec, São Paulo, SP, Brasil).

## **4.3 Obtenção, criopreservação e recuperação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)**

As CMSP foram obtidas através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1077; Sigma, St. Louis, MO, E.U.A.), como descrito a seguir:

o sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, E.U.A.), suplementado com HEPES (10mM; Sigma), 2-mercaptoetanol (1mM; Gibco), L-glutamina (1,5mM; Sigma), penicilina (200UI; Sigma) e estreptomicina (200qg/mL; Sigma). O sangue diluído foi então depositado cuidadosamente sobre o Ficoll-Hypaque, numa proporção 2:1, em tubo de 50 mL (Corning Inc., Tewksbury, MA, E.U.A.). Posteriormente, esta amostra foi submetida a uma centrifugação a 400 g por 30 minutos a 20°C, sem freio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, E.U.A.). As CMSP foram coletadas, com auxílio de pipeta Pasteur (Corning Inc.), a partir do anel de células formado na interface entre o soro e o Ficoll, sendo a seguir submetidas a três lavagens com meio RPMI suplementado, por centrifugação (10 minutos/ 250 giros/ 20°C, com freio).

Após a última lavagem, as CMSP obtidas foram ressuspensas em soro fetal bovino (SFB; Sigma) e contadas em câmara de Neubauer (Laboroptik Ltd., Lancing, GBR) com auxílio de microscópio óptico (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, E.U.A.). A viabilidade das células foi determinada através da diluição em corante Azul de Trypan (Sigma) e a concentração de células viáveis foi ajustada para  $1 \times 10^7$ /mL de solução de criopreservação, que consiste em SFB com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma). Cada 1 mL desta suspensão de células foi acondicionado em um tubo de criopreservação (criotubo; Nunc A/S, Kamstrupvej, Roskilde, DNK), que foi colocado em recipiente próprio para congelamento (5100 Cryo 1°C Freezing Container – “Mr. Frosty”; Nalgene, Rochester, NY, E.U.A.), que foi então mantido *overnight* à temperatura de -70°C. Após este tempo, os criotubos foram transferidos para containers de nitrogênio líquido, onde foram armazenados até sua utilização.

Para a realização dos ensaios experimentais, as CMSP criopreservadas foram descongeladas, no próprio criotubo, em banho-maria (VWR, Radnor, PA, E.U.A.) a 37°C, e vertidas em 10 mL de meio RPMI suplementado acrescido de 20% de SFB. Após homogeneização com auxílio de pipeta Pasteur (Corning Inc.), foram realizadas duas lavagens por centrifugação (1500 rpm/10 min/ 4°C/ com freio) e as CMSP foram ressuspensas em meio RPMI suplementado. A recuperação e viabilidade foram determinadas através da contagem em câmara de Neubauer (Laboroptik Ltd) com a utilização do corante Azul de Trypan (Sigma).

#### 4.4 Ensaios de imunofenotipagem e degranulação de células citotóxicas

As CMSP recuperadas foram submetidas a um protocolo citofluorimétrico de marcação para avaliação imunofenotípica e de degranulação em dois momentos distintos: imediatamente após o descongelamento (ensaios *post-thaw*); e após 6 horas de cultivo (ensaios *in vitro*).

Para os ensaios *post-thaw*, as CMSP recuperadas foram ajustadas para a concentração de  $5 \times 10^5$  células/100  $\mu\text{L}$  de uma solução tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0,1% de azida sódica (Merck, Frankfurter Str., Darmstadt, Alemanha) (PBSaz) e 2% de SFB e submetidas a um protocolo citofluorimétrico de marcação com os seguintes anticorpos monoclonais (AcMo): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 (BD; Beckman Coulter, BREA, CA, E.U.A.) para avaliação fenotípica; e anti-CD107a (BD), para avaliação da degranulação. Após a marcação com os AcMo, as amostras foram incubadas protegidas da luz por 20 minutos a 4°C, lavadas com PBSaz por centrifugação (2000 rpm, 5 min) e fixadas em paraformaldeído (PFA; Sigma) a 1% em PBS. As amostras fixadas foram armazenadas em geladeira (2 a 4 °C), protegidas da luz, e adquiridas em citômetro de fluxo FACS Aria II (BD) em até 24 horas.

Para os ensaios *in vitro*, as CMSP recuperadas foram ajustadas para a concentração de  $3,0 \times 10^5$  células/80  $\mu\text{L}$  de meio RPMI suplementado e cultivadas em placa de poliestireno de 96 poços de fundo “U” (Corning Inc.) sob quatro condições distintas: sem estímulo (*background* – BG); sob estímulo de antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis* (Ag-Lb), equivalente a  $10^6$  promastigotas metacíclicas/poço; sob estímulo de fitohemaglutinina (PHA; Sigma), na concentração de 5  $\mu\text{g/mL}$ ; e sob estímulo de acetato de formol miristato (PMA; Sigma) com ionomicina (Sigma), na concentração de 10 ng/mL e 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Completando um volume final de 200  $\mu\text{L}$ /poço, foram adicionados 20  $\mu\text{L}$  de soro humano AB Rh<sup>+</sup> inativado (Sigma) e AcMo anti-CD107a (BD) em todos os poços. A placa foi então incubada a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> (Panasonic Healthcare Company of North America, Wood Dale, IL, E.U.A.) por uma hora, quando foi adicionada monensina (Golgi-Stop, BD) (6  $\mu\text{g/mL}$ ) e seguidas de mais cinco horas de incubação. Após incubação total de seis horas, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm, 5 min.) em meio RPMI suplementado, ressuspensas em 100  $\mu\text{L}$  de PBSaz e marcadas com AcMo anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 (BD; Beckman Coulter). Após incubação por 20 minutos a 4°C

protegidas da luz, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm, 5min.) em PBSaz, ressuspensas em PFA a 1% e armazenadas em geladeira (2 a 8 °C), protegidas da luz, por um período máximo de 24 horas até a aquisição em citômetro de fluxo FACS Aria II (BD).

A combinação de marcadores utilizada nas análises citofluorimétricas para avaliar as características celulares está descrita na Tabela 4.1.

**Tabela 4.1:** Combinação de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores para avaliar diferentes características celulares por citometria de fluxo nos ensaios experimentais *post-thaw* e *in vitro*.

Análise Citofluorimétrica	Característica Celular
CD3 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Linfócitos T CD4 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD8 <sup>bright*</sup>	Linfócitos T CD8 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup>	Células NKT CD8 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Células NKT CD4 <sup>+</sup>
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD8 <sup>-</sup> CD4 <sup>-</sup>	Células NKT DN
CD3 <sup>+</sup> CD56 <sup>+</sup> CD8 <sup>+</sup> CD4 <sup>+</sup>	Células NKT DP
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>dim**</sup>	Células NK CD56 <sup>dim**</sup>
CD3 <sup>-</sup> CD56 <sup>bright*</sup>	Células NK CD56 <sup>bright*</sup>
CD107a	Células em degranulação

\**bright* - células que apresentam alta intensidade de fluorescência; \*\**dim* - células que apresentam baixa intensidade de fluorescência.

#### 4.5 Adaptação dos ensaios de degranulação

Antes de dar início aos experimentos de avaliação da expressão do CD107a foram realizados experimentos pilotos para otimização da metodologia. A utilização do AcMo anti-CD107a para avaliação da degranulação de populações celulares tem sido aplicada com frequência em vários estudos, e o tempo de incubação deste AcMo e os estímulos positivos apresentam variações na literatura (Kannan *et al*, 1996; Betts *et al*, 2003; Alter *et al*, 2004; Aktas *et al*, 2009). Por este motivo, foram realizados experimentos-pilotos de cinética, a fim de padronizar o tempo ideal de incubação do CD107a, diferentes concentrações de estímulos positivos (PHA e PMA+ionomicina) e utilização de monensina.

Primeiramente, as CMSP foram cultivadas nas mesmas condições descritas no item 4.4 para os ensaios *in vitro* por diferentes períodos: 1, 2, 4, 6 e 8 horas. Durante estes testes, além do tempo de cultura, também foram avaliados diferentes estímulos em diferentes concentrações: PHA a 5µg/mL e 2µg/mL; e PMA + ionomicina a 10 ng/mL + 500 µg/mL; e 2,5 µg/mL + 0,5 µg/mL. Após a escolha do período ideal de cultura das CMSP, foram realizados experimentos com ou sem adição de monensina e experimentos com ou sem fixação com PFA por até 96 horas.

#### 4.6 Citometria de fluxo

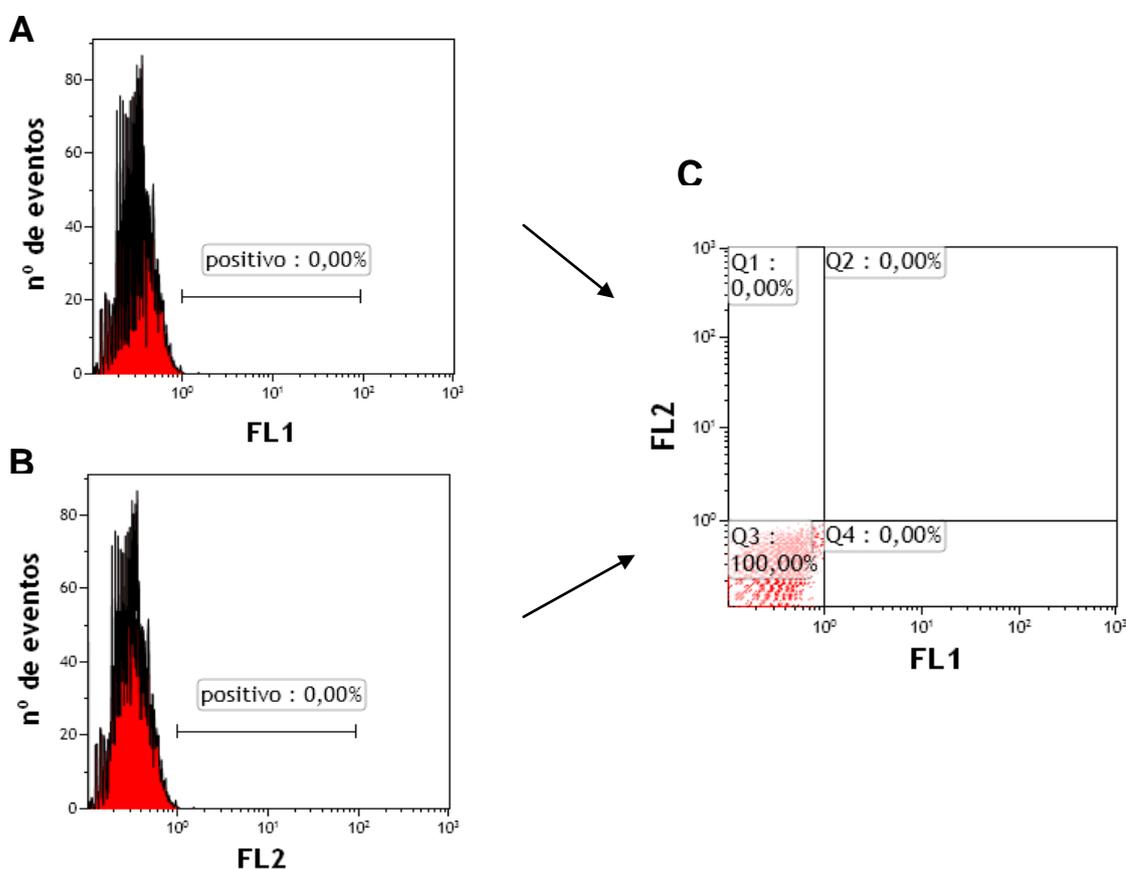
As amostras foram adquiridas em um total de 50 mil eventos no citômetro de fluxo FACS Aria II (BD), da Plataforma de Citometria de Fluxo da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), FIOCRUZ. As análises citofluorimétricas foram realizadas utilizando o programa computacional específico Kaluza 1.2 (Beckman Coulter).

##### 4.6.1 Definição de regiões e compensação de cores

Foram utilizados AcMo isotópicos anti-IgG conjugados aos mesmos fluorocromos usados nos ensaios *post-thaw* e *in vitro* como controles negativos de marcação e para o ajuste da voltagem ideal, de forma que as células negativas ficassem representadas até grandeza de  $10^0$  no histograma monoparamétrico de intensidade de fluorescência. Assim, os cursores foram desenhados com início no ponto de término do pico de fluorescência do controle negativo nos histogramas (Figura 4.1 A e B) Os quadrantes dos gráficos biparamétricos (*dot plot*) foram delimitados com base nos cursores dos histogramas (Figura 4.1 C).

Delimitados os quadrantes, foram adquiridas cinco amostras distintas, com uma marcação simples (um AcMo acoplado a um fluorocromo) em cada, para realizar a compensação de cores. Tal compensação foi baseada nos critérios de aproximação dos valores da intensidade média de fluorescência (*mean fluorescence intensity* – MFI) entre os quadrantes 1 e 3 (Q1 e Q3) no eixo “x”; e entre os quadrantes 3 e 4 (Q3 e Q4) no eixo do “y” dos *dot plots*. Portanto, as compensações foram ajustadas de modo que, no eixo “x”, a MFI observada no Q1, representando

as células positivas para o anticorpo utilizado, tivesse valor igual ou mais próximo possível da MFI do Q3, que representa as células negativas para o mesmo anticorpo. O mesmo procedimento foi feito em relação à MFI no eixo “y”, observando-se as médias de Q3 e Q4.



**Figura 4.1:** Análise fluorimétrica de células marcadas com anticorpos monoclonais isotípicos para definição dos cursores e quadrantes.

#### 4.6.2 Análise citofluorimétrica dos ensaios *post-thaw* e *in vitro*

Um protocolo citofluorimétrico multiparamétrico de análise foi criado para avaliar todas as amostras, tanto nos ensaios *post-thaw* quanto nos *in vitro*. Inicialmente, foi desenhado um *dot plot* para avaliar tamanho (*forward scatter* – FSC) vs. granularidade (*side scatter* – SSC) das células e, neste *dot plot*, os linfócitos foram selecionados por uma região de análise eletrônica (*gate*) com base nas suas características físicas (Figura 4.2 A). Para confirmar a região dos linfócitos, foi criado um histograma para avaliar a intensidade de fluorescência do fluorocromo acoplado ao anti-CD3, desenhado um *gate* selecionando as células CD3<sup>+</sup> (Figura 4.2 B) e, em seguida, um *contra-gate* no *dot plot* de FSC vs. SSC.

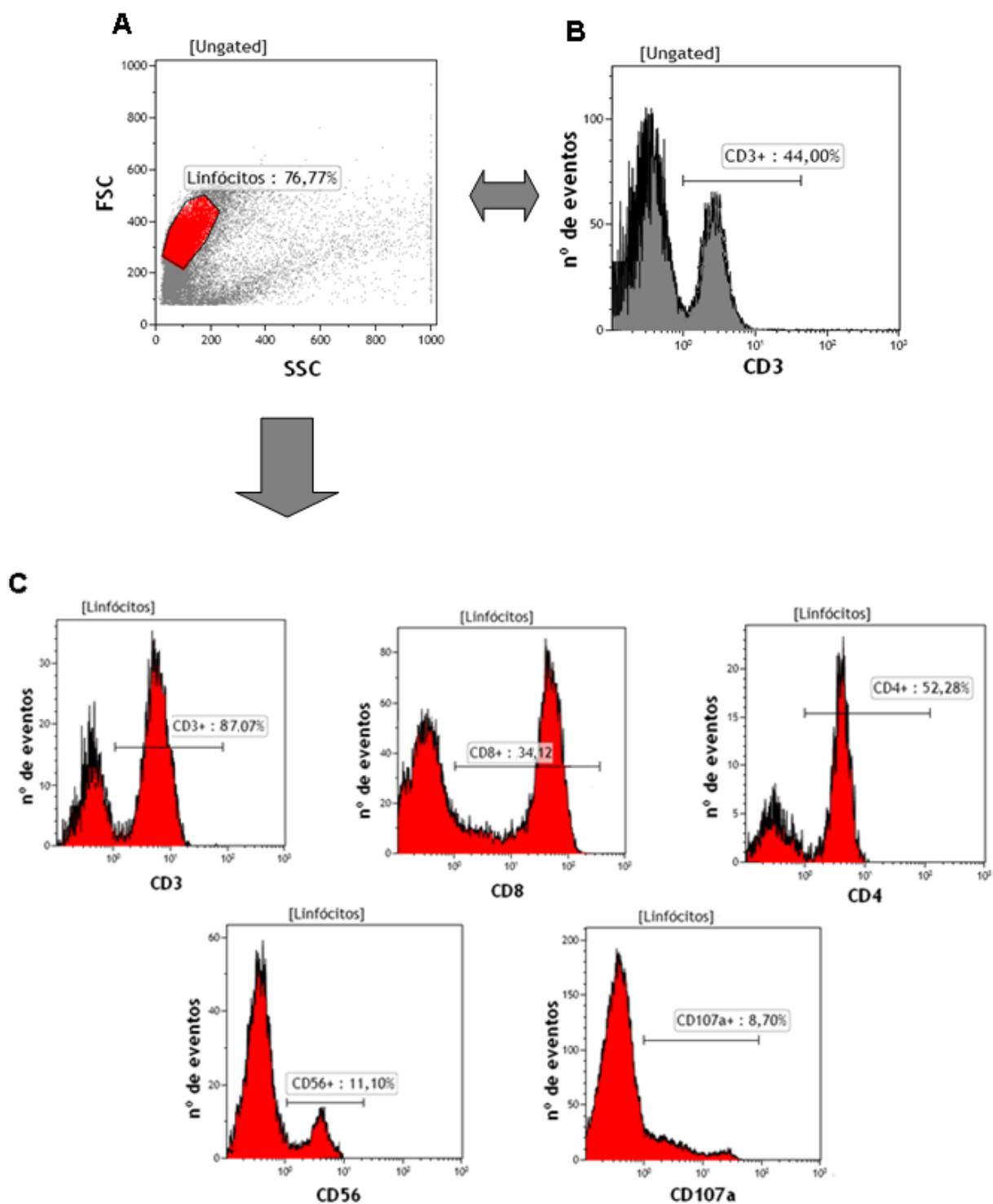
A partir do *gate* “linfócitos” (Figura 4.2 A) foram criados cinco histogramas com o objetivo de avaliar as intensidades de fluorescência dos fluorocromos acoplados aos anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 e anti-CD107a separadamente (Figura 4.2 C).

Após, foram montados *dot plots* para determinar as populações celulares de interesse (linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células NK e células NKT) com base nas marcações dos AcMo anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 e anti-CD56 (Figura 4.3 A). A partir de *gates* feitos em cada população celular de interesse, foram montados novos *dot plots* para se avaliar as células CD107a<sup>+</sup> dentro de cada população (Figura 4.3 B).

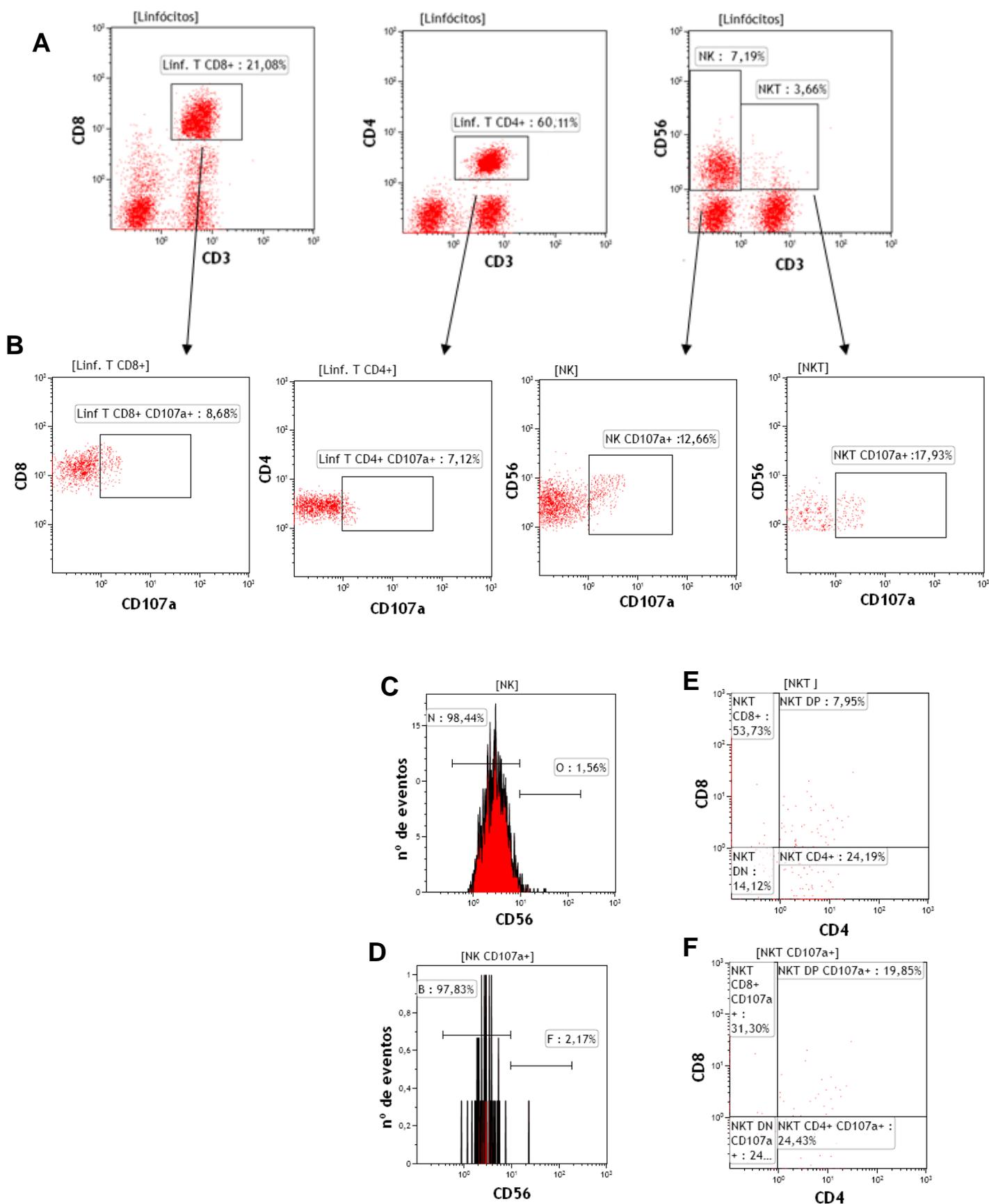
Ainda, foram avaliadas as subpopulações de células NK e NKT quanto à sua distribuição (Figura 4.3 C e E) e perfil citotóxico (Figura 4.3 D e F). A partir dos *gates* de seleção das células NK e NKT (Figura 4.3 A), foram criados gráficos para avaliar a distribuição das subpopulações destas células: as subpopulações de células NK foram determinadas quanto à diferença de expressão de CD56 (Figura 4.3 C); e as células NKT quanto à expressão de CD4 e CD8 (Figura 4.3 E). Para avaliar o perfil citotóxico destas subpopulações foram feitos *gates* nas células NK CD107a<sup>+</sup> e NKT CD107a<sup>+</sup> (Figura 4.3 B) e, a partir destes, analisados os perfis citotóxicos das subpopulações (Figura 4.3 D e F).

#### **4.7 Análise estatística**

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando o teste não paramétrico *Mann Whitney*, com intervalo de confiança de 95%. Para todas as análises foi utilizado o programa computacional específico *GraphPad Prism 5* (GraphPad Software Inc., E.U.A.).



**Figura 4.2:** Etapa 1 do protocolo citofluorimétrico multiparamétrico de análise. A região dos linfócitos foi selecionada com base em suas características físicas (**A**), confirmada através de um *contra-gate* na região de células CD3<sup>+</sup> (**B**); e, a partir desta, foram criados histogramas para avaliar as diferentes fluorescências utilizadas (**C**). FSC – *forward scatter*, SSC – *side scatter*.



**Figura 4.3:** Etapa 2 do protocolo citofluorimétrico multiparamétrico de análise. As populações celulares foram definidas com base nas marcações dos anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD8, anti-CD4 e anti-CD56 (A). A partir de cada população celular foram criados *dot plots* para avaliar as células positivas para CD107a (B). As subpopulações de NK e NKT foram avaliadas quanto ao perfil fenotípico (C e E, respectivamente) e quanto à expressão de CD107a (D e F, respectivamente).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes avaliados

Foram avaliados 9 pacientes de LC e 4 pacientes de LM residentes no estado do Rio de Janeiro. As formas clínicas foram avaliadas separadamente e os pacientes foram divididos em três grupos:

- Pacientes antes do tratamento (AT) – 6 pacientes de LC e 4 pacientes de LM;
- Pacientes durante o tratamento (DT) – 6 pacientes de LC e 2 pacientes de LM.
- Pacientes após o término do tratamento (PT) – 5 pacientes de LC e 3 de LM.

A maioria dos pacientes de LC foi do sexo masculino (66,6%), com idade média  $\pm$  desvio padrão de  $40,0 \pm 6,0$  anos e residente na cidade do Rio de Janeiro (55,5%). Destes pacientes, nenhum apresentou a forma disseminada ou evolução para a forma mucosa e todos os pacientes PT apresentaram cura clínica. A maioria dos pacientes apresentou apenas 1 lesão (66,6%) e o tempo de evolução médio de 4 meses. As principais características clínico-epidemiológicas estão representadas na Tabela 5.1. Dos pacientes de LM, todos foram do sexo masculino, com idade média  $\pm$  desvio padrão de  $50,5 \pm 4,1$  anos e apresentaram cura clínica ao término do tratamento. O tempo de evolução dos pacientes de LM foi maior, com média de 1 ano, e a região mucosa mais acometida foi a nasal. As principais características clínico-epidemiológicas estão representadas na Tabela 5.2.

O grupo controle (CTRL) foi composto por 10 indivíduos saudáveis, sem diagnóstico prévio de leishmaniose e residentes no Estado do Rio de Janeiro em áreas não endêmicas. A idade média  $\pm$  desvio padrão deste grupo foi igual a  $27,8 \pm 3,3$  anos e a maioria foi do sexo feminino (77,8%).

**Tabela 5.1:** Características clínico-epidemiológicas dos nove pacientes de leishmaniose cutânea incluídos no estudo.

<b>Característica</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	6	66,7%
Feminino	3	33,3%
<b>Local de Residência</b>		
Rio de Janeiro (Penha)	1	11,1%
Rio de Janeiro (Ilha do Governador)	1	11,1%
Rio de Janeiro (Gardênia Azul)	1	11,1%
Rio de Janeiro (Maracanã)	1	11,1%
Rio de Janeiro (Gávea)	1	11,1%
São Fidélis	2	22,2%
Seropédica	1	11,1%
Trajano de Moraes	1	11,1%
<b>Tempo de Evolução</b>		
2 meses	3	33,3%
3 meses	2	22,2%
4 meses	1	11,1%
5 meses	1	11,1%
6 meses	1	11,1%
7 meses	1	11,1%
<b>Número de Lesões</b>		
1	6	66,7%
2	1	11,1%
3	1	11,1%
7	1	11,1%
<b>Local da Lesão</b>		
Cervical	1	8,3%
Face	2	16,7%
Tórax	1	8,3%
Perna	4	33,3%
Braço	2	16,7%
Mão	2	16,7%

**Tabela 5.2:** Características clínico-epidemiológicas dos quatro pacientes de leishmaniose mucosa incluídos no estudo.

<b>Característica</b>	<b>Frequência</b>	<b>Percentual</b>
<b>Sexo</b>		
Masculino	4	100%
Feminino	0	0
<b>Local de Residência</b>		
Rio de Janeiro (Barra da Tijuca)	1	25%
Rio de Janeiro (Ilha do Governador)	1	25%
Nova Iguaçu	1	25%
São João do Meriti	1	25%
<b>Tempo de Evolução</b>		
3 meses	1	25%
12 meses	1	25%
18 meses	2	50%
<b>Local da Lesão</b>		
Mucosa Oral	1	25%
Mucosa Nasal	3	75%

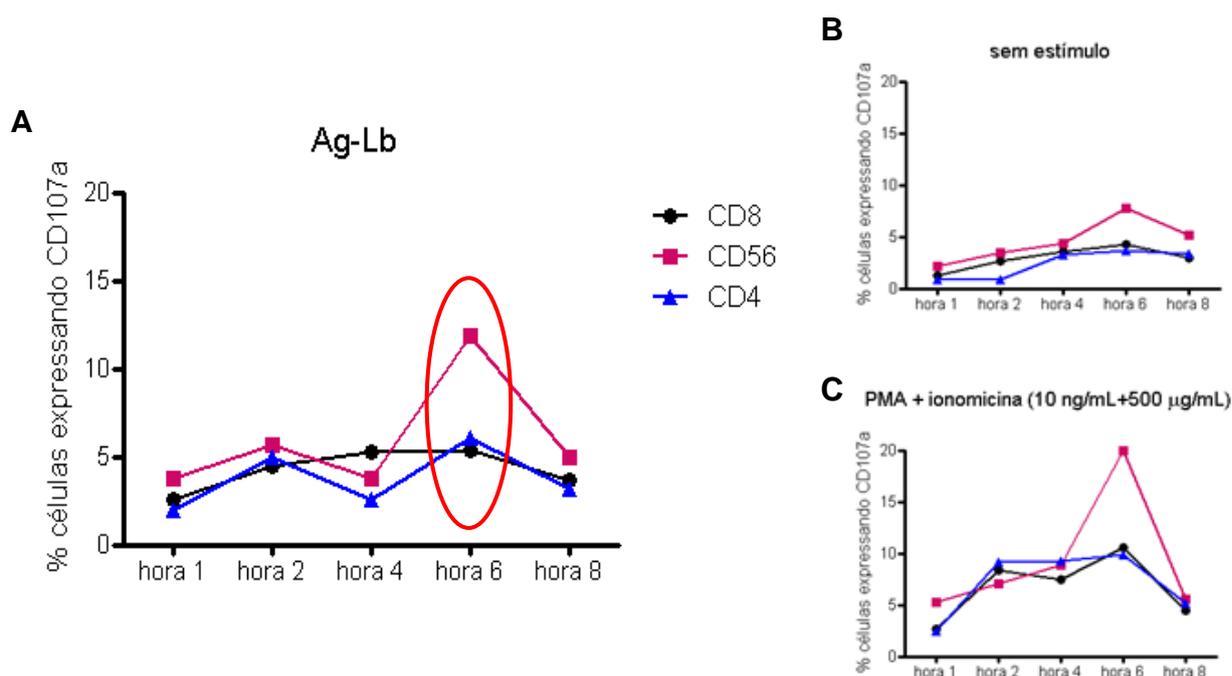
## 5.2 Padronização do ensaio de expressão de CD107a

Na avaliação do tipo e concentração do estímulo positivo que seria utilizado nos ensaios de degranulação *in vitro*, o que mais induziu as células a expressarem CD107a foi o uso simultâneo de PMA e ionomicina na concentração de 10 ng/mL e 500 µg/mL, respectivamente. Porém, as células sob este estímulo apresentaram maiores alterações morfológicas (característica observada através da avaliação dos parâmetros físicos – tamanho e granularidade – por citometria de fluxo). Assim, como o PHA na concentração de 5 µg/mL também se mostrou eficiente e gerou menos alterações morfológicas, foi optado pela utilização dos dois melhores estímulos: PMA+ionomicina a 10 ng/mL+500 µg/mL e PHA 5 µg/mL.

Observamos que a utilização da monensina nos experimentos é imprescindível, visto que a detecção de CD107a foi maior nas células cultivadas na presença de monensina comparadas àquelas cultivadas nas mesmas condições sem adição da mesma.

Nos experimentos comparativos de fixação das células foi determinada que a fixação PFA a 1% por um período de até 24 horas não alterou a detecção das fluorescências. Porém, maiores períodos resultaram em comprometimento das marcações dos AcMo acoplados a fluorocromos bi-conjugados.

Finalmente, após a realização dos experimentos piloto-cinéticos, foi possível observar que as células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup> apresentaram uma melhor expressão de CD107a após seis horas de cultivo nas diferentes condições: sem estímulo; sob estímulo de Ag-Lb; sob estímulo de PMA+ionomicina (10 ng/mL+500 µg/mL); e sob estímulo de PHA (5 µg/mL). A Figura 5.1 representa os resultados de expressão de CD107a pelas células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup> de três pacientes de LC após a terapia antimonial nas horas 1, 2, 4, 6 e 8 dos experimentos-pilotos de cinética frente o estímulo de Ag-Lb (A); sem estímulo (B); e sob estímulo de PMA+ionomicina na concentração de 10 ng/mL+500 µg/mL (C).



**Figura 5.1:** Experimentos-piloto de cinética da avaliação da expressão de CD107a pelas células CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> e CD56<sup>+</sup> de três pacientes de leishmaniose cutânea após a terapia antimonial cultivadas com antígenos particulados de *Leishmania (Viannia.) braziliensis* (Ag-Lb) (A); sem estímulo (B); e com estímulo positivo de PMA com ionomicina (C). Os símbolos representam a média das populações (n=3).

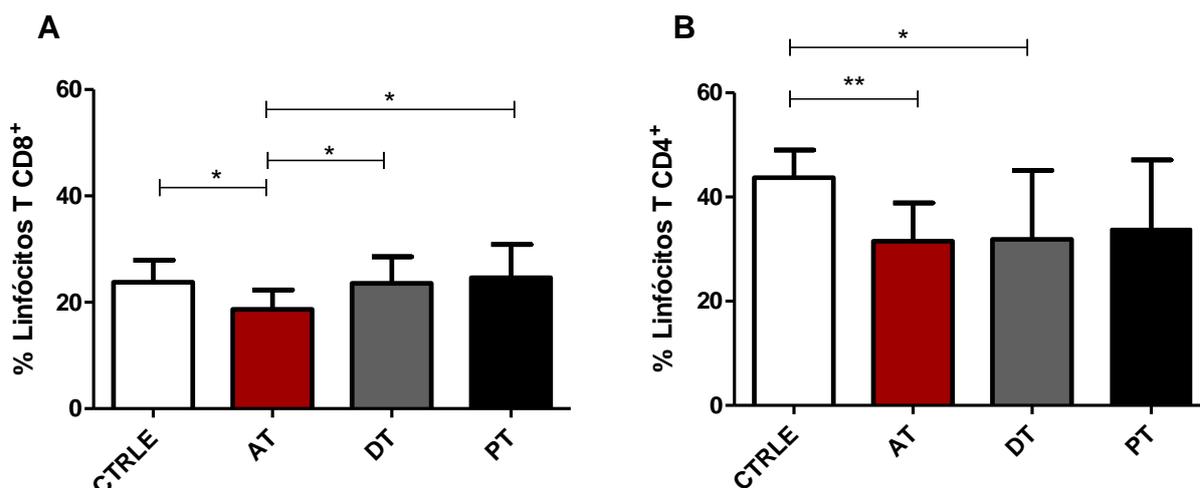
### 5.3 Distribuição das populações celulares

#### 5.3.1 Distribuição das populações celulares T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT em pacientes de leishmaniose cutânea

Nos ensaios *post-thaw* foram definidas as quatro populações celulares de interesse e determinados seus percentuais. Todos os grupos apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, seguido dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, das células NK e das células NKT.

Na comparação entre os grupos foi observado que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentaram uma menor frequência nos pacientes AT (média  $\pm$  desvio padrão = 18,6%  $\pm$  3,6%) em relação aos demais grupos ( $p < 0,05$ ). Os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentados pelos pacientes DT (23,6%  $\pm$  4,9%) e PT (24,6%  $\pm$  6,2%) foram similares aos observados nos indivíduos sadios (CTRLE – 23,7%  $\pm$  4,1%) (Figura 5.2A).

Em relação aos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, o grupo CTRLE (43,7%  $\pm$  5,2%) apresentou percentuais acentuadamente mais elevados em comparação aos grupos de pacientes, sendo esta diferença estatisticamente significativa quando comparados os pacientes AT (31,5%  $\pm$  7,3%;  $p < 0,01$ ) e aos DT (31,8%  $\pm$  13,2%;  $p < 0,05$ ). Entre os grupos de pacientes, os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram semelhantes, embora nos pacientes PT estes percentuais tenham se mostrado ligeiramente superiores (33,8%  $\pm$  13,2%) (Figura 5.2B).

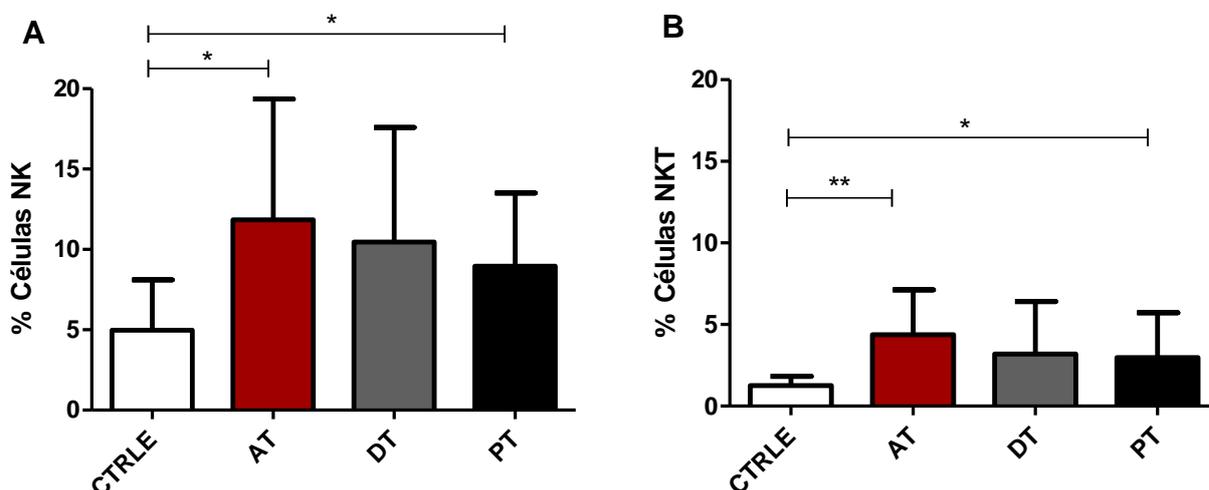


**Figura 5.2:** Avaliação *post-thaw* (após o descongelamento) do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A) e T CD4<sup>+</sup> (B) nos indivíduos sadios (CTRLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=6), DT (pacientes durante o tratamento; n=6) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=5). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . Valor de  $p$  obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Resultados apresentados em barras como média  $\pm$  desvio padrão.

As células NK e NKT apresentaram o mesmo perfil de distribuição entre os grupos, com o grupo CTRLLE apresentando menores percentuais em comparação aos grupos de pacientes (Figura 5.3 A e B). As células NK apresentaram maior média de percentual nos pacientes AT (11,8% ± 7,5%), sendo esta menor nos pacientes DT (10,4% ± 7,1%) e PT (8,9% ± 4,5%). A diferença dos percentuais de células NK entre o grupo CTRLLE e os pacientes AT e PT foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.3A).

Os menores percentuais de células NKT foram observados nos indivíduos do grupo CTRLLE (1,2% ± 0,5%) e a diferença entre este grupo e os pacientes AT (4,4% ± 2,7%), que apresentaram os maiores percentuais, foi estatisticamente significativa ( $p < 0,01$ ). Os pacientes DT e PT apresentaram percentuais semelhantes entre si (3,2 ± 3,2 e 3,0 ± 2,7, respectivamente), menores que os AT (4,4% ± 2,7%) e maiores que os CTRLLE (1,2% ± 0,5%) (PT > CTRLLE;  $p < 0,05$ ) (Figura 5.3B).

É interessante notar que os indivíduos do grupo controle apresentaram uma distribuição mais homogênea em todas as populações celulares avaliadas em comparação aos grupos de pacientes (Figuras 5.2 e 5.3). A distribuição destas populações celulares nos ensaios *in vitro* também foi avaliada, porém esta não se alterou em comparação às análises *post-thaw*.



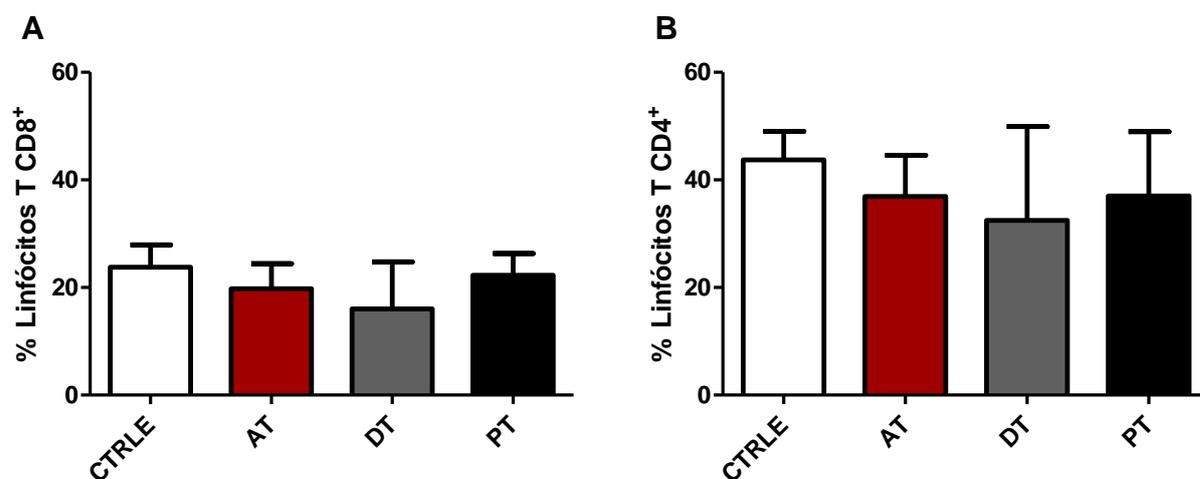
**Figura 5.3:** Avaliação *post-thaw* do percentual de células NK (A) e NKT (B) nos indivíduos saudáveis (CTRLLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=6), DT (pacientes durante o tratamento; n=6) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=5). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . Valor de  $p$  obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Resultados apresentados em barras como média ± desvio padrão.

### 5.3.2 Distribuição das populações celulares T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT em pacientes de leishmaniose mucosa

Da mesma forma que observado nos ensaios *post-thaw* com as amostras de pacientes de LC e indivíduos CTRLLE, todos os grupos de pacientes de LM apresentaram maior frequência de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, seguido dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, das células NK e das células NKT. Vale ressaltar que a amostragem nos grupos de pacientes de LM foi pequena, com o grupo de pacientes DT possuindo a menor amostragem (n=2), não sendo possível assim a comparação estatística deste grupo com os demais.

Apesar de não ter sido estatisticamente significante, a média dos percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> observada nos indivíduos do grupo CTRLLE (23,8% ± 4,1%) se mostrou ligeiramente superior quando comparada às observadas nos grupos de pacientes de LM. Embora a amostragem do grupo dos pacientes DT tenha sido limitada a apenas dois pacientes, a média dos percentuais observada nestes (16,0% ± 8,7%) foi menor do que nos pacientes AT (19,8% ± 4,6%) e PT (22,3% ± 4,0%) (Figura 5.4 A).

Na avaliação da distribuição dos linfócitos T CD4<sup>+</sup>, as proporções foram iguais às observadas nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>: o grupo CTRLLE apresentou maior média percentual (43,7% ± 5,2%) que os grupos de pacientes e, entre estes, os pacientes AT e PT apresentaram médias ligeiramente mais elevadas (36,9% ± 7,6% e 37,0% ± 12,0%, respectivamente) que os pacientes DT (32,5% ± 17,4%) (Figura 5.4 B).

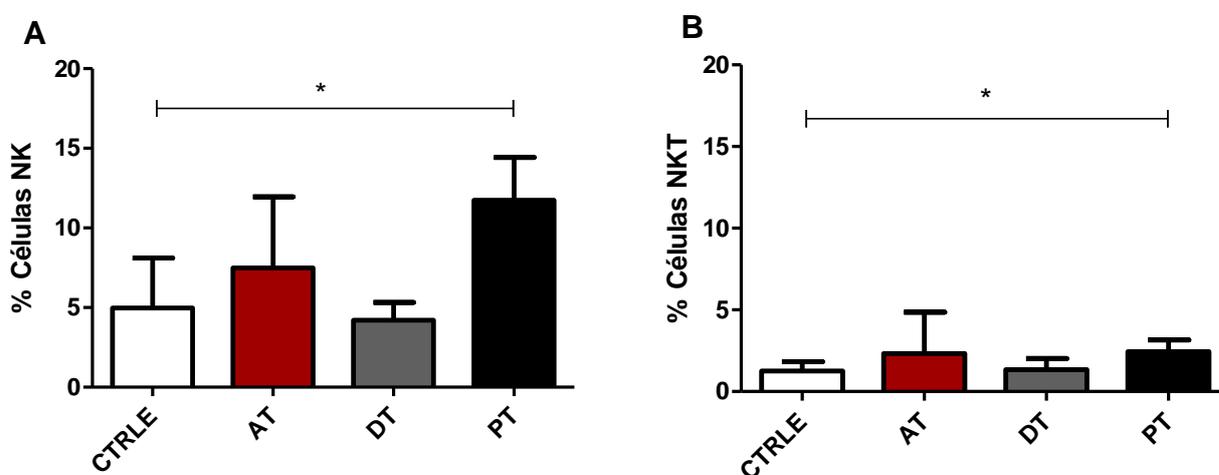


**Figura 5.4:** Avaliação *post-thaw* do percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A) e T CD4<sup>+</sup> (B) nos indivíduos saudáveis (CTRLLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose mucosa estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=4), DT (pacientes durante o tratamento; n=2) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=3). Resultados apresentados em barras como média ± desvio padrão.

As células NK foram detectadas em maiores percentuais nos pacientes de LM PT (11,7% ± 2,6) em comparação aos outros grupos estudados, os quais apresentaram diferença estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ ) em relação aos percentuais observados no grupo CTRLLE (5,0% ± 3,1%) (Figura 5.5 A). A segunda maior média percentual de células NK foi observada nos pacientes AT (7,5% ± 4,4%), seguido pelo grupo CTRLLE (5,0% ± 3,1%) e pelos pacientes DT (4,2% ± 1,1%), os quais apresentaram médias semelhantes entre si (Figura 5.5 A).

As médias percentuais de células NKT observadas nos pacientes AT (2,3% ± 2,5%) e PT (2,4% ± 0,7%) foram semelhantes entre si e superiores aos detectados nos pacientes DT (1,3% ± 0,7%), os quais apresentaram percentuais semelhantes aos observados no grupo CTRLLE (1,2% ± 0,5%). A frequência de células NKT observada nos pacientes PT (2,4% ± 0,7%) foi estatisticamente maior ( $p < 0,05$ ) que a dos indivíduos CTRLLE (1,2% ± 0,5%) (Figura 5.5 B).

A distribuição destas populações celulares nos ensaios *in vitro* também foi avaliada, porém esta não se alterou em comparação às análises *post-thaw*.



**Figura 5.5:** Avaliação *post-thaw* do percentual de células NK (A) e NKT (B) nos indivíduos sadios (CTRLLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose mucosa estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=4), DT (pacientes durante o tratamento; n=2) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=3). \* $p < 0,05$ . Valor de  $p$  obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Resultados apresentados em barras como média ± desvio padrão.

#### 5.4 Avaliação *post-thaw* da degranulação das células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT através da expressão de CD107a

A expressão de CD107a foi analisada nas células descongeladas (*post-thaw*), sendo seu percentual determinado dentro de cada população estudada. Nesta avaliação foi observado um percentual expressivamente maior de células NKT que

são CD107a<sup>+</sup> em comparação às células NK e, ainda mais notavelmente, quando esta comparação é feita com os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>. Isto foi observado tanto em pacientes de LC quanto de LM.

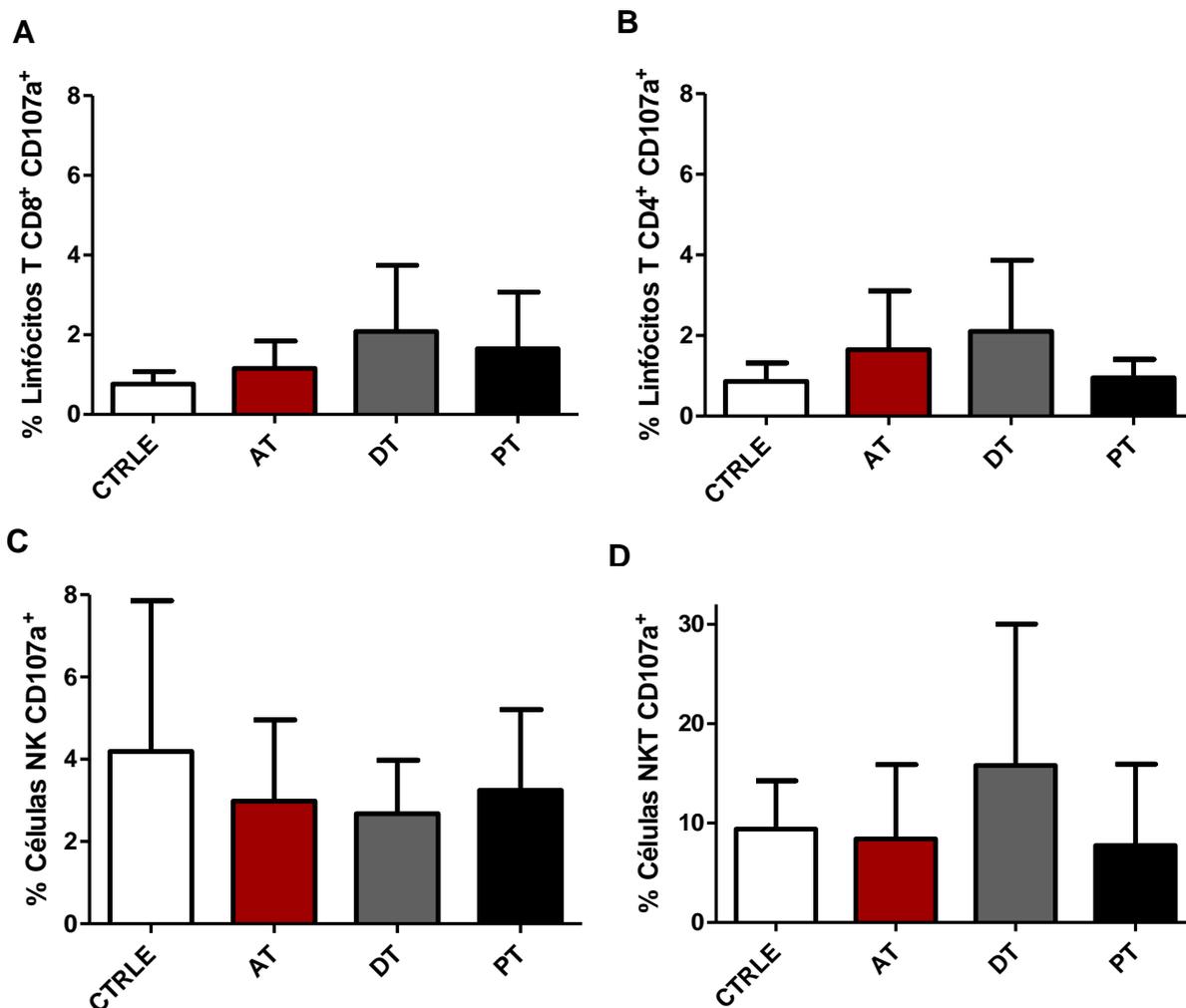
#### **5.4.1 Avaliação *post-thaw* da degranulação das células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT em pacientes de leishmaniose cutânea**

Na avaliação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> expressando CD107a, os indivíduos do grupo CTRLLE apresentaram menores percentuais (0,7% ± 0,3%) quando comparados aos grupos de pacientes. Entre estes grupos, os maiores percentuais foram observados nos pacientes DT (2,0% ± 1,6%), seguido pelos pacientes PT (1,6% ± 1,4%), que foram ligeiramente superiores aos AT (1,1% ± 0,2%) (Figura 5.6 A).

Da mesma maneira, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> exibiram menores percentuais de expressão de CD107a nos indivíduos do grupo CTRLLE (0,8% ± 0,4%) e maiores percentuais nos pacientes DT (2,1% ± 1,7%). Porém, ao contrário do observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, houve mais linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> nos pacientes AT (1,6% ± 1,4%) que nos PT (0,9% ± 0,4%) (Figura 5.6 B).

Inversamente ao observado nos linfócitos, a maior média percentual de células NK CD107a<sup>+</sup> foi detectada nos indivíduos do grupo CTRLLE (3,5% ± 3,1%). Os grupos de pacientes apresentaram médias percentuais de células NK semelhantes, sendo ligeiramente superior nos PT (3,2% ± 1,9%) em comparação aos DT (2,6% ± 1,3%) e AT (3,0% ± 1,9%) (Figura 5.6 C).

Já as células NKT apresentaram os maiores percentuais de expressão de CD107a nos pacientes DT (15,8% ± 14,2%), assim como observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup>. Os percentuais observados nos pacientes AT (8,4% ± 7,4%) e PT (7,7% ± 8,1%) foram semelhantes entre si e em relação aos CTRLLE (9,4% ± 4,8%) (Figura 5.6 D).



**Figura 5.6:** Avaliação *post-thaw* do percentual de expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (B), células NK (C) e NKT (D) nos indivíduos saudáveis (CTRLLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=6), DT (pacientes durante o tratamento; n=6) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=5). Resultados apresentados em barras como média  $\pm$  desvio padrão.

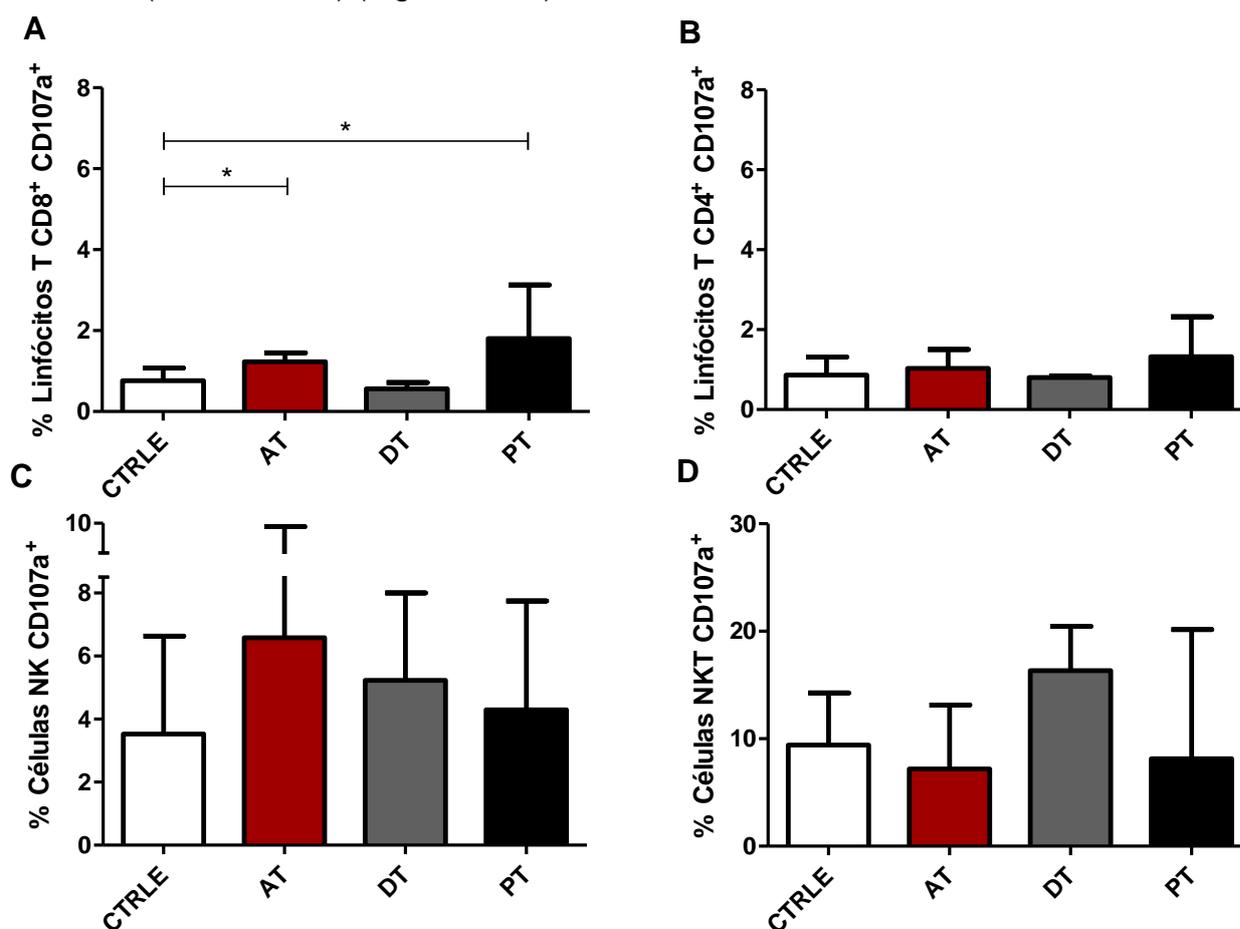
#### 5.4.2 Avaliação *post-thaw* da degranulação das células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT em pacientes de leishmaniose mucosa

A maior média percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> pôde ser observada nos pacientes PT (1,8%  $\pm$  1,3%), seguidos pelos AT (1,2%  $\pm$  0,2%). Estes grupos de pacientes apresentaram percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> significativamente maiores ( $p < 0,05$ ) que os indivíduos do grupo CTRLLE (0,7%  $\pm$  0,3%). Os pacientes DT apresentaram as menores médias de expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (0,5%  $\pm$  0,1%), que foi similar à apresentada pelos CTRLLE (0,7%  $\pm$  0,3%) (Figura 5.7 A).

Os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> foram semelhantes entre os grupos de pacientes AT (1,0% ± 0,4%) e DT (0,8% ± 0) e o grupo CTRLLE (0,8% ± 0,4%). Os pacientes PT apresentaram percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> (1,3% ± 1,0%) ligeiramente superiores aos demais grupos (Figura 5.7 B).

As células NK apresentaram maiores médias percentuais de expressão de CD107a em todos os grupos de pacientes em comparação ao grupo CTRLLE (3,5% ± 3,1%). Entre os grupos de pacientes, a maior média percentual de expressão de CD107a foi observada nos pacientes AT (6,5% ± 1,6%), sendo menor nos pacientes DT (5,2% ± 2,7%) e ainda mais nos pacientes PT (4,3% ± 3,4) (Figura 5.7 C).

As células NKT apresentaram os maiores percentuais de expressão de CD107a nos pacientes DT (16,3% ± 4,1%). Os pacientes AT e PT apresentaram médias percentuais de células NKT CD107a<sup>+</sup> semelhantes entre si (7,2% ± 3,0% e 8,1% ± 12,0%, respectivamente) e ligeiramente inferiores às observadas no grupo CTRLLE (9,4% ± 4,8%) (Figura 5.7 D).



**Figura 5.7:** Avaliação *post-thaw* do percentual de expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (B), células NK (C) e NKT (D) nos indivíduos saudáveis (CTRLLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose mucosa estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=4), DT (pacientes durante o tratamento; n=2) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=3). \**p*<0,05. Valor de *p* obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Resultados apresentados em barras como média ± desvio padrão.

## **5.5 Avaliação *in vitro* da degranulação das células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT através da expressão de CD107a**

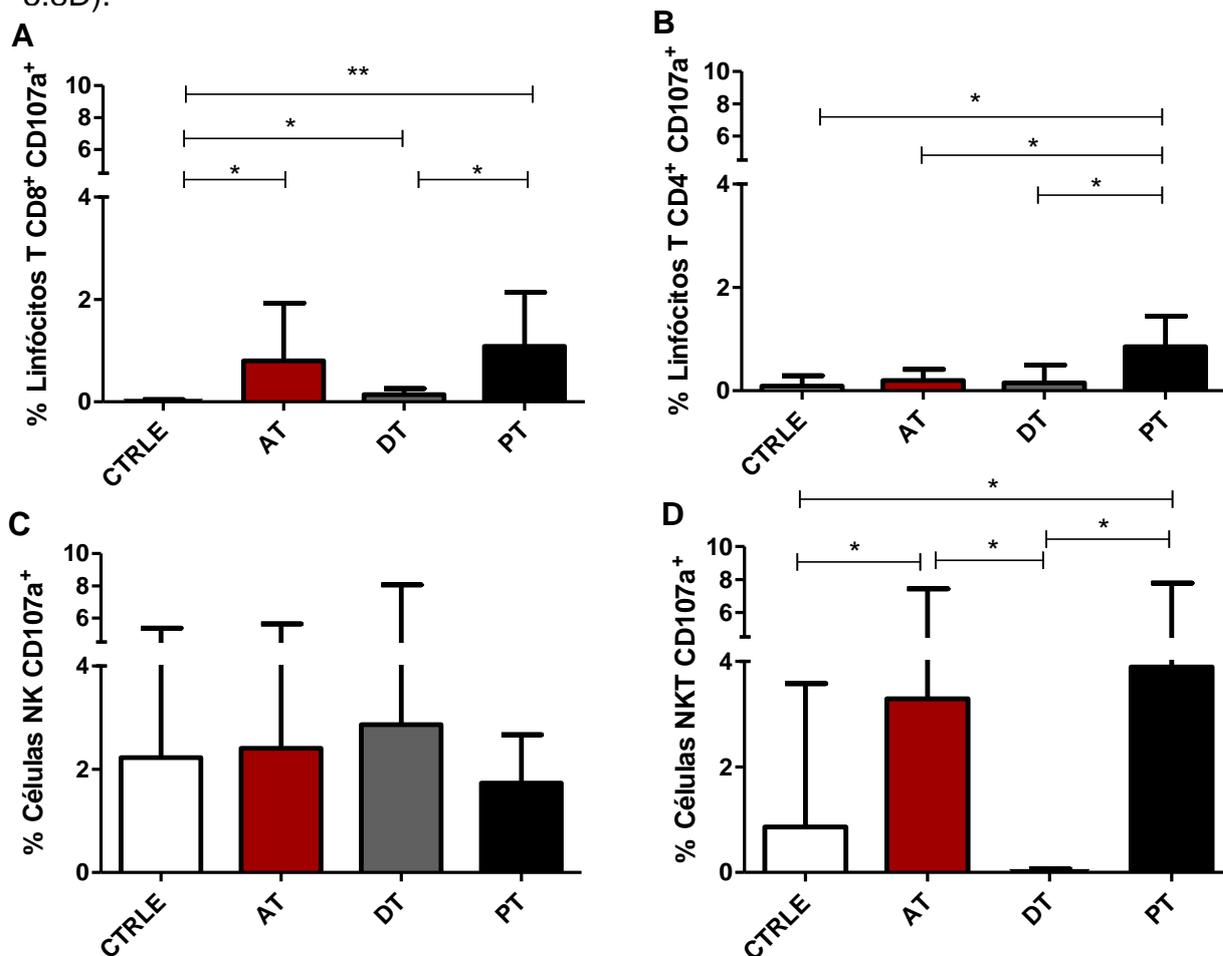
As CMSP foram cultivadas na ausência ou frente a diferentes estímulos por um período de seis horas. É esperado que as células possam apresentar uma degranulação basal, inespecífica, a qual é observada avaliando-se a expressão de CD107a nas células cultivadas na ausência de estímulos (BG). Como o objetivo do presente trabalho foi avaliar a degranulação específica aos antígenos de *L. (V.) braziliensis*, consideramos como “degranulação específica ao antígeno” os percentuais de células expressando CD107a frente ao estímulo antigênico (Ag-Lb) subtraindo destes os percentuais de células expressando CD107a detectados no BG. Nos casos em que o percentual de células expressando CD107a foi maior no BG do que frente ao estímulo antigênico específico, a degranulação foi considerada nula (igual a zero). Assim, para todos os resultados de expressão de CD107a descritos a seguir em resposta ao antígeno foi utilizada esta estratégia. Vale ressaltar que todas as células apresentaram maiores percentuais de expressão de CD107a nos ensaios *in vitro* em comparação aos ensaios *post-thaw*.

### **5.5.1 Avaliação *in vitro* da degranulação das células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT em pacientes de leishmaniose cutânea**

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> dos indivíduos do grupo CTRLLE apresentaram valores quase nulos de expressão de CD107a frente ao Ag-Lb. Entre os grupos de pacientes, tanto os linfócitos T CD8<sup>+</sup> quanto CD4<sup>+</sup> apresentaram maiores percentuais de expressão de CD107a nos pacientes PT (1,1% ± 1,0% e 0,8% ± 0,6%, respectivamente), sendo a diferença entre este grupo e os grupos CTRLLE e DT estatisticamente significativa nestas duas populações (p<0,05). Os menores percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>+</sup> expressando CD107a entre os grupos de pacientes foram observados nos pacientes DT (0,1% ± 0,1% e 0,1% ± 0,3%, respectivamente), sendo a diferença entre este grupo e o grupo CTRLLE estatisticamente significativa apenas na avaliação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (p<0,05). Os pacientes AT apresentam percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> (0,8% ± 0,1%) significativamente maiores que os indivíduos sadios (p<0,05). Enquanto os pacientes AT apresentaram percentuais ínfimos de linfócitos T CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> (0,2% ± 0,2%), os quais foram similares aos observados nos CTRLLE e nos pacientes DT (0,1% ±

0,3%) e estatisticamente inferiores aos detectados nos PT (0,8% ± 0,6%) ( $p < 0,05$ ). Os resultados expostos acima estão representados na figura Figura 5.8 A e B.

As células NK apresentaram maiores percentuais de expressão de CD107a em comparação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> frente os Ag-Lb em todos os grupos estudados (Figura 5.8 A, B e C). Uma maior média dos percentuais de células NK CD107a<sup>+</sup> foi observada nos pacientes DT (2,8% ± 5,2%) em comparação aos pacientes AT (2,4% ± 3,2%) e ao grupo CTRL (2,2% ± 3,1%) e, mais acentuadamente em comparação aos pacientes PT (1,7% ± 0,9%) (Figura 5.8 C). Ao avaliar as células NKT não foi observada expressão de CD107a nos pacientes DT em resposta ao Ag-Lb, enquanto os percentuais de expressão foram evidentes nos pacientes AT (3,3% ± 4,1%) e PT (4,0% ± 3,8%) ( $p < 0,05$ ). Os indivíduos do grupo CTRL (0,8% ± 2,7%) apresentaram média percentual estatisticamente inferior à observada nos pacientes AT (3,3% ± 4,1%) e PT (4,0% ± 3,8%) ( $p < 0,05$ ) (Figura 5.8D).



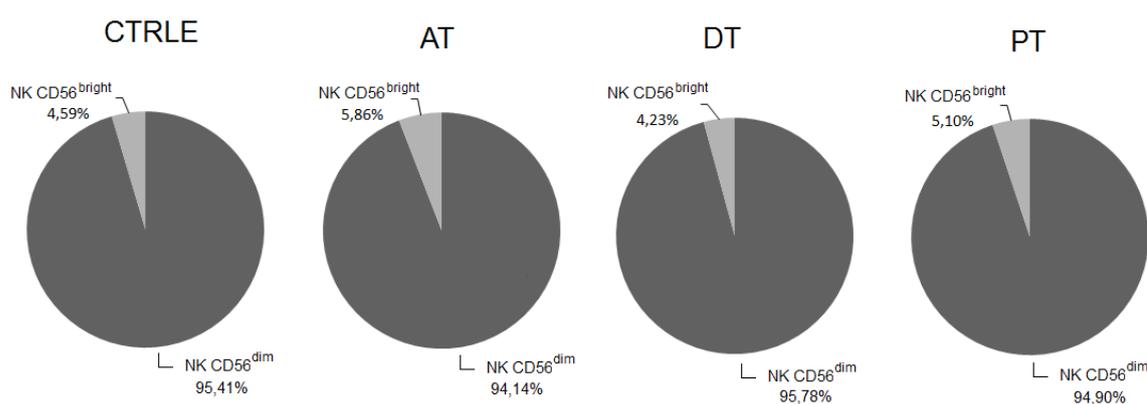
**Figura 5.8:** Avaliação *in vitro* do percentual de expressão de CD107 específica aos Ag-Lb pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> (A), linfócitos T CD4<sup>+</sup> (B), células NK (C) e NKT (D) nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=6), DT (pacientes durante o tratamento; n=6) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=5). \* $p < 0,05$  e \*\* $p < 0,01$ . Valor de  $p$  obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Resultados apresentados em barras como média ± desvio padrão.

### 5.5.2 Avaliação *in vitro* da degranulação das células T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, NK e NKT em pacientes de leishmaniose mucosa

As populações celulares estudadas praticamente não apresentaram expressão de CD107a em resposta ao Ag-Lb nos pacientes de LM. Isto foi mais evidente nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, os quais apresentaram percentuais muito próximos ou iguais a zero em todos os grupos. As células NK e NKT exibiram maiores percentuais de expressão de CD107a nos indivíduos do grupo CTRLLE (2,22% ± 0,99% e 0,86% ± 0,85%), enquanto os pacientes apresentaram percentuais muito próximos ou iguais a zero.

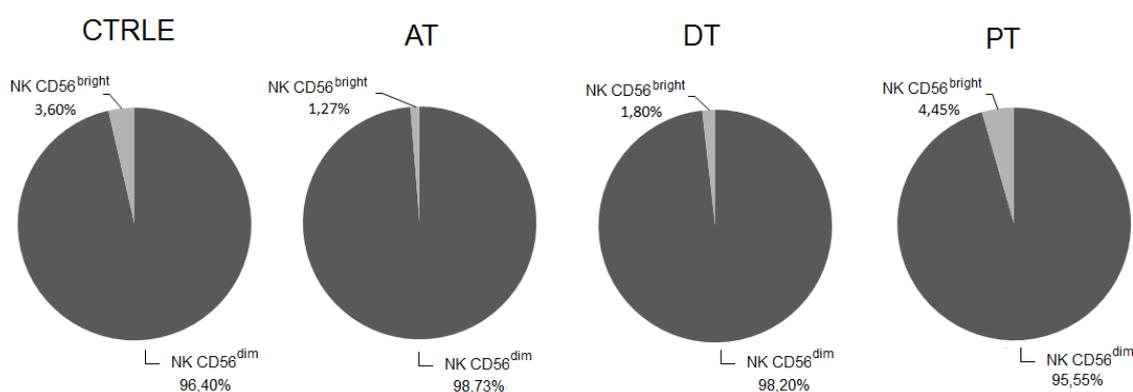
### 5.6 Avaliação das subpopulações de células NK

Com base na densidade de expressão do receptor CD56, as células NK podem ser divididas em duas subpopulações funcionalmente distintas: células NK CD56<sup>bright</sup> e NK CD56<sup>dim</sup>. Após a análise das células NK nos grupos estudados, foi possível determinar que mais de 90% das células NK são CD56<sup>dim</sup>. Este dado foi observado nas formas cutânea e mucosa, tanto nos ensaios *post-thaw* quanto nos ensaios *in vitro*, independente do estímulo. A menor proporção de células NK CD56<sup>dim</sup> observada neste estudo foi de 91,13% (± 4,03%) nos pacientes AT de LM sob estimulação antigênica com Ag-Lb. A Figura 5.10 representa os resultados de distribuição das subpopulações de células NK de indivíduos do grupo CTRLLE e de pacientes de LC, nos três grupos estudados, obtidos nos ensaios *post-thaw*.



**Figura 5.9:** Representação da distribuição das subpopulações de células NK (NK CD56<sup>dim</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>) nos ensaios *post-thaw*. Nos gráficos de setores estão representadas as médias percentuais destas subpopulações nos indivíduos saudáveis (CTRLLE; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=6), DT (pacientes durante o tratamento; n=6) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=5).

Para avaliação da degranulação destas subpopulações, foram selecionadas as células NK CD107a<sup>+</sup>, e, a partir destas, avaliados os percentuais de cada subpopulação com base na densidade de expressão do CD56. Foi observado que um percentual extraordinariamente maior de células NK CD56<sup>dim</sup> expressaram CD107a nos pacientes de LC e LM, tanto nos ensaios *post-thaw* quanto *in vitro*. A menor média percentual de células NK CD56<sup>dim</sup> CD107a<sup>+</sup> foi 91,91% ( $\pm$  4,04%), observada no grupo de pacientes DT de LM nos ensaios *in vitro* sem estímulo. A Figura 5.11 representa os resultados da distribuição das subpopulações de NK CD107a<sup>+</sup> de indivíduos do grupo CTRL e de pacientes de LC obtidos nos ensaios *post-thaw*.



**Figura 5.10:** Representação da distribuição das subpopulações de células NK CD107a<sup>+</sup> (NK CD56<sup>dim</sup>CD107a<sup>+</sup> e NK CD56<sup>bright</sup>CD107a<sup>+</sup>) nos ensaios *post-thaw*. Nos gráficos de setores estão representadas as médias percentuais destas subpopulações nos indivíduos sadios (CTRL; n=10) e nos diferentes grupos de pacientes de leishmaniose cutânea estudados: AT (pacientes antes do tratamento; n=6), DT (pacientes durante o tratamento; n=6) e PT (pacientes após o fim do tratamento; n=5).

## 5.7 Avaliação das subpopulações de células NKT

As células NKT são diferenciadas na literatura por sua expressão de CD4 e CD8, sendo identificadas três subpopulações funcionalmente distintas em humanos: NKT CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, NKT CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup> (duplo negativa – DN) e NKT CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> (Hammond *et al*, 1999; Godfrey *et al*, 2000). Deste modo, a partir da definição de células NKT nos grupos estudados, foi possível avaliar a distribuição de suas subpopulações com base nas diferenças de expressão de CD4 e CD8 nos ensaios *post-thaw* e nos ensaios *in vitro*. Interessantemente, no presente estudo pôde ser observada uma quarta subpopulação de células NKT com fenótipo CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (dupla positiva – DP).

### 5.7.1 Distribuição das subpopulações de células NKT

As proporções das subpopulações de células NKT se alteraram entre os ensaios *post-thaw* e *in vitro* tanto no grupo CTRLLE quanto nos grupos de pacientes. As tabelas 5.3 e 5.4 resumem os dados obtidos nas análises das subpopulações de células NKT dos indivíduos saudáveis, dos pacientes de LC (Tabela 5.3) e dos pacientes de LM (Tabela 5.4) nos ensaios *post-thaw* e *in vitro*.

Nos ensaios *post-thaw*, os indivíduos do grupo CTRLLE apresentaram maiores percentuais de células NKT CD8<sup>+</sup> (55,00% ± 6,09%), seguidas das NKT CD4<sup>+</sup> (21,7% ± 2,9%), NKT DN (13,31% ± 3,63%) e, com os menores percentuais, as NKT DP (3,96% ± 0,91%). Já nos ensaios *in vitro*, foi observado um leve aumento das células NKT CD8<sup>+</sup> conjuntamente com uma diminuição proporcional de células NKT DN. Sendo assim, a distribuição das subpopulações de células NKT observada nos indivíduos saudáveis, independente do estímulo, foi: CD8<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> > DN ≈ DP.

Em todos os ensaios os pacientes de LC AT apresentaram seus maiores percentuais de células NKT sendo CD8<sup>+</sup> e, os menores, NKT DP. As proporções de células NKT CD4<sup>+</sup> e DN se alteraram entre os ensaios e nas diferentes condições de cultura, mas isto não parece ser devido ao estímulo antigênico.

Os pacientes de LC DT apresentaram percentuais mais elevados de células NKT DP em comparação a todos os outros grupos estudados em todos os ensaios. Porém, ainda assim, esta subpopulação continuou sendo a observada em menor proporção mesmo nestes pacientes. Nos ensaios *post-thaw*, a distribuição das subpopulações nos pacientes de LC DT foi: CD8<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> > DN ≈ DP. Esta mesma distribuição foi observada nos ensaios *in vitro* sob o estímulo com Ag-Lb.

Os pacientes de LC PT apresentaram algumas oscilações na subpopulação CD4<sup>+</sup> nos ensaios, mas estas foram proporcionais às variações nas outras subpopulações, não parecendo ser em função do estímulo antigênico. As distribuições observadas nestes pacientes foram: CD8<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> ≈ DN > DP (ensaios *post-thaw*); CD8<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> ≈ DN > DP (ensaios *in vitro* – BG); e CD8<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> > DN > DP (ensaios *in vitro* – Ag-Lb).

Na avaliação da distribuição das subpopulações nos pacientes de LM foi observado um aumento de células NKT DN nos ensaios *in vitro*, quando comparados aos CTRLLE; ou aos mesmos pacientes nos ensaios *post-thaw*.

Os pacientes de LM AT apresentaram distribuição das subpopulações de células NKT semelhante à observada nos indivíduos do grupo CTRLLE nos ensaios *post-thaw*.  $CD8^+ > CD4^+ > DN > DP$ . Já nos ensaios *in vitro* foram observados maiores percentuais de células NKT DN ( $CD8^+ \approx DN > CD4^+ > DP$ ).

Os pacientes de LM DT apresentaram nos ensaios *post-thaw* as mesmas proporções observadas nos CTRLLE e pacientes de LM AT:  $CD8^+ > CD4^+ > DN > DP$ . Já nos ensaios *in vitro*, foram observados maiores percentuais de células NKT DN e menos células NKT  $CD8^+$  ( $CD4^+ \approx DN > CD8^+ > DP$  e  $DN > CD4^+ > CD8^+ > DP$ , no BG e sob estímulo antigênico, respectivamente).

Os pacientes de LM PT apresentaram nos ensaios *post-thaw* distribuição diferente das observadas nos outros grupos estudados. Nestes ensaios, os pacientes PT apresentaram maiores percentuais de células NKT  $CD8^+$  e, proporcionalmente, as células NKT  $CD4^+$  foram detectadas em menores números, ficando a proporção:  $NKT\ CD8^+ > DN > CD4^+ \approx DP$ . Nos ensaios *in vitro* com as células destes pacientes também foram observadas maiores proporções de células NKT DN, sendo observadas as seguintes distribuições:  $CD8^+ \approx DN \approx CD4^+ > DP$ , no BG; e  $CD8^+ > DN > CD4^+ > DP$ , sob estímulo antigênico.

**Tabela 5.3:** Resultados da avaliação da distribuição de subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRLE) e pacientes de leishmaniose cutânea (LC).

	<i>post-thaw (%)</i>	<i>in vitro (%)</i>	
		BG	Ag-Lb
<b>CTRLE</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 55,0 (±6,1) > 21,7 (±2,9) > 13,3 (±3,6) > 3,9 (±0,9)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 60,3 (±10,9) > 20,5 (±6,8) > 8,8 (±3,7) ≈ 7,3 (±2,5)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 59,2 (±11,0) > 21,4 (±6,8) > 9,3 (±4,6) > 7,6 (±3,0)
<b>AT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 61,2 (±6,7) > 18,8 (±5,8) ≈ 16,1 (±6,1) > 3,3 (±0,8)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; DN &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 38,3 (±9,6) > 30,5 (±10,8) > 26,1 (±8,1) > 3,0 (±1,9)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 45,8 (±7,8) > 23,3 (±7,9) ≈ 23,3 (±5,3) > 5,4 (±2,9)
<b>DT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 47,4 (±12,0) > 21,6 (±7,7) > 12,9 (±5,9) ≈ 14,3 (±6,0)	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 32,1 (±8,7) ≈ 28,1 (±9,1) > 16,3 (±4,7) ≈ 19,2 (±6,9)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 33,4 (±7,7) > 27,6 (±7,5) > 18,4 (±5,4) ≈ 14,1 (±4,4)
<b>PT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 63,2 (±4,4) > 14,2 (±4,3) ≈ 17,5 (±7,3) > 4,7 (±0,1)	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 38,3 (±10,7) ≈ 35,2 (±7,9) > 19,6 (±6,7) > 6,6 (±3,5)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 43,3 (±9,8) > 34,2 (±6,8) > 15,4 (±5,6) > 6,9 (±3,0)

Resultados apresentados em porcentagem como média (± desvio padrão). CTRLE: grupo controle (n=10); AT: pacientes antes do tratamento (n=6); DT: pacientes durante o tratamento (n=6); PT: pacientes após o fim do tratamento (n=5). BG: *background*; Ag-Lb: antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis*.

**Tabela 5.4:** Resultados da avaliação da distribuição de subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRLE) e pacientes de leishmaniose mucosa (LM).

	<i>post-thaw (%)</i>	<i>in vitro (%)</i>	
		BG	Ag-Lb
<b>CTRLE</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 55,0 (±6,1) > 21,7 (±2,9) > 13,3 (±3,6) > 3,9 (±0,9)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 60,3 (±10,9) > 20,5 (±6,8) > 8,8 (±3,7) ≈ 7,3 (±2,5)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 59,2 (±11,0) > 21,4 (±6,8) > 9,3 (±4,6) > 7,6 (±3,0)
<b>AT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 68,7 (±13,8) > 14,2 (±9,5) > 10,6 (±2,6) > 1,5 (±0,7)	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ DN &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 34,9 (±9,3) ≈ 35,2 (±11,0) > 23,8 (±2,6) > 4,6 (±2,8)	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ DN &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 35,8 (±10,6) ≈ 33,7 (±11,4) > 23,3 (±8,6) > 5,1 (±3,3)
<b>DT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 51,6 (±38,9) > 25,8 (±25,1) > 17,8 (±8,8) > 1,7 (±1,3)	<b>CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; CD8<sup>+</sup> &gt; DP</b> 34,2 (±25,3) ≈ 38,4 (±19,5) > 19,2 (±11,1) > 3,0 (±0,3)	<b>DN &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; CD8<sup>+</sup> &gt; DP</b> 41,6 (±17,1) > 30,3 (±23,3) > 23,5 (±9,9) > 2,2 (±1,4)
<b>PT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; DN &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DP</b> 80,0 (±5,7) > 15,6 (±4,7) > 3,1 (±1,1) ≈ 1,0 (±1,0)	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 36,5 (±6,2) ≈ 31,9 (±15,5) ≈ 27,1 (±8,4) > 4,3 (±1,9)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; DN &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 45,1 (±10,6) > 34,9 (±17,4) > 16,6 (±6,0) > 3,2 (±1,7)

Resultados apresentados em porcentagem como média (± desvio padrão). CTRLE: grupo controle (n=10); AT: pacientes antes do tratamento (n=4); DT: pacientes durante o tratamento (n=2); PT: pacientes após o fim do tratamento (n=3). BG: *background*; Ag-Lb: antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis*.

### 5.7.2 Perfil da expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT

Além da distribuição das subpopulações de NKT em CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, DN e DP, foi avaliado também o perfil de expressão CD107a por estas células. Para isto, as células NKT CD107a<sup>+</sup> foram selecionadas e avaliadas quanto à expressão de CD4 e CD8. As tabelas 5.5 e 5.6 resumem os dados obtidos nas análises do perfil da expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT dos indivíduos saudáveis, dos pacientes de LC (Tabela 5.5) e dos pacientes de LM (Tabela 5.6) nos ensaios *post-thaw* e *in vitro*.

Nos ensaios *post-thaw* pôde ser observado que no grupo CTRL quase metade das células NKT expressando CD107a foram CD4<sup>+</sup>, sendo a distribuição observada neste grupo: CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > DP CD107a<sup>+</sup> > DN CD107a<sup>+</sup>. Curiosamente, nos ensaios *in vitro*, esta distribuição se alterou consideravelmente, sendo observado um acentuado aumento nos percentuais de células NKT CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> e NKT DP CD107a<sup>+</sup>, com uma proporcional diminuição de células NKT CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>, ficando a distribuição: CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> ≈ DP CD107a<sup>+</sup> > DN CD107a<sup>+</sup>.

Nos pacientes de LC AT foi observada uma distribuição CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > DP CD107a<sup>+</sup> ≈ DN CD107a<sup>+</sup> nos ensaios *post-thaw* e nas células cultivadas sem estímulo nos ensaios *in vitro*. Porém, o estímulo antigênico pareceu induzir uma maior degranulação pelas células NKT DN nestes pacientes, resultando em uma distribuição CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> ≈ DN CD107a<sup>+</sup> > DP CD107a<sup>+</sup>.

Nos pacientes de LC DT foram observados percentuais bastante aumentados de células NKT DP CD107a<sup>+</sup> em comparação a todos os outros grupos estudados, nos ensaios *post-thaw* e, mais acentuadamente, no ensaios *in vitro*. Nos ensaios *post-thaw*, os pacientes DT apresentaram percentuais de expressão de CD107a pelas células NKT DP similares às NKT CD8<sup>+</sup>, sendo a frequência observada igual a CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> ≈ DP CD107a<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > DN CD107a<sup>+</sup>. Nos ensaios *in vitro* foi observada, concomitantemente com o aumento de NKT DP CD107a<sup>+</sup>, uma acentuada diminuição de NKT CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>; ficando a distribuição observada: DP CD107a<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> ≈ DN CD107a<sup>+</sup> > CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup>.

Nos pacientes de LC PT a frequência das subpopulações expressando CD107a observada nos ensaios *post-thaw* foi CD8<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> > CD4<sup>+</sup> CD107a<sup>+</sup> ≈ DN CD107a<sup>+</sup> > DP CD107a<sup>+</sup>. Nos ensaios *in vitro* ocorreu um pequeno aumento das células NKT DP CD107a<sup>+</sup> em relação aos ensaios *post-thaw*. Assim, nestes ensaios

*in vitro*, a distribuição observada nas células cultivadas sem estímulo (BG) foi  $CD8^+CD107a^+ > CD4^+ CD107a^+ \approx DN CD107a^+ \approx DP CD107a^+$ ; e, sob estímulo antigênico pareceu haver um aumento das células NKT DN  $CD107a^+$ , ficando a distribuição igual a:  $CD8^+ CD107a^+ > DN CD107a^+ > CD4^+ CD107a^+ \approx DP CD107a^+$ .

Os perfis de expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT dos pacientes de LM foram bastante variados em todos os ensaios. Os pacientes de LM AT apresentam nos ensaios *post-thaw* os maiores percentuais de expressão de  $CD107a^+$  pelas células NKT  $CD8^+$  e  $CD4^+$ , seguidas pelas NKT DN e, com os menores percentuais, as NKT DP. Nos ensaios *in vitro*, esta proporção é alterada, sendo as células cultivadas sem estímulo apresentando  $DN CD107a^+ > CD8^+ CD107a^+ > CD4^+ CD107a^+ > DP CD107a^+$ . Nestes ensaios, o estímulo antigênico pareceu induzir uma diminuição do percentual de células NKT DN e um aumento das NKT DP, sendo observada a seguinte distribuição:  $CD8^+ CD107a^+ > CD4^+ CD107a^+ \approx DN CD107a^+ > DP CD107a^+$ .

Os pacientes DT apresentaram nos ensaios *post-thaw*  $CD8^+ CD107a^+ > CD4^+ CD107a^+ \approx DN CD107a^+ > DP CD107a^+$ . Já nos ensaios *in vitro* foi observada uma diminuição das células NKT  $CD8^+ CD107a^+$  com um aumento proporcional de células NKT DN  $CD107a^+$ , mas esta alteração foi independente do estímulo antigênico.

Os pacientes de LM PT não apresentaram expressão de CD107a pelas células NKT DP nos ensaios *post-thaw*. Nestes ensaios, as células NKT com maiores percentuais de expressão de CD107a foram as  $CD8^+$ , seguidas pelas NKT DN e  $CD4^+$ , as quais exibiram percentuais bastante inferiores. Nos ensaios *in vitro*, os perfis de expressão de CD107a foram variados; entretanto, parece que o estímulo antigênico induziu um aumento das células NKT DP  $CD107a^+$ .

**Tabela 5.5:** Resultados do perfil de expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRL) e pacientes de leishmaniose cutânea (LC).

	<i>post-thaw</i> (%)	<i>in vitro</i> (%)	
		BG	Ag-Lb
<b>CTRL</b>	<b>CD4<sup>+</sup> &gt; CD8<sup>+</sup> &gt; DP &gt; DN</b> 47,4 (±5,4) > 24,8 (±5,6) > 18,5 (±4,4) > 7,7 (±2,2)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DP &gt; DN</b> 45,5 (±9,8) > 19,4 (±5,1) ≈ 19,8 (±4,9) > 10,6 (±3,4)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN ≈ DP</b> 55,1 (±9,6) > 19,7 (±4,9) ≈ 13,2 (±5,2) ≈ 16,7 (±4,7)
<b>AT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN ≈ DP</b> 53,5 (±12,6) > 26,7 (±11,9) > 9,3 (±4,5) ≈ 10,3 (±5,7)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN ≈ DP</b> 61,8 (±15,2) > 16,5 (±9,7) ≈ 11,6 (±7,9) ≈ 8,0 (±3,0)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN ≈ DP</b> 46,6 (±9,0) > 17,7 (±8,7) ≈ 20,4 (±4,8) ≈ 14,3 (±7,6)
<b>DT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ DP &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DN</b> 31,7 (±9,8) ≈ 34,8 (±9,1) > 25,8 (±7,2) > 4,5 (±2,9)	<b>DP &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; CD8<sup>+</sup></b> 39,0 (±10,6) > 23,0 (±9,5) ≈ 22,3 (±11,3) > 15,7 (±5,0)	<b>DP &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN ≈ CD8<sup>+</sup></b> 35,0 (±8,7) > 20,7 (±7,2) ≈ 24,8 (±14,6) ≈ 17,6 (±5,7)
<b>PT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 61,2 (±11,0) > 16,8 (±9,6) ≈ 15,4 (±7,4) > 6,4 (±4,4)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN ≈ DP</b> 57,9 (±15,2) > 13,2 (±9,3) ≈ 17,5 (±8,7) ≈ 11,3 (±6,0)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; DN &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DP</b> 42,4 (±9,3) > 24,7 (±11,7) > 16,1 (±8,2) > 16,1 (±6,8)

Resultados apresentados em porcentagem como média (± desvio padrão). CTRL: grupo controle (n=10); AT: pacientes antes do tratamento (n=6); DT: pacientes durante o tratamento (n=6); PT: pacientes após o fim do tratamento (n=5). BG: *background*; Ag-Lb: antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis*.

**Tabela 5.6:** Resultados do perfil de expressão de CD107a pelas subpopulações de células NKT nos indivíduos sadios (CTRL) e pacientes de leishmaniose mucosa (LM).

	<i>post-thaw</i> (%)	<i>in vitro</i> (%)	
		BG	Ag-Lb
<b>CTRL</b>	<b>CD4<sup>+</sup> &gt; CD8<sup>+</sup> &gt; DP &gt; DN</b> 47,4 (±5,4) > 24,7 (±5,6) > 18,5 (±4,4) > 7,7 (±2,2)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DP &gt; DN</b> 45,5 (±9,8) > 19,4 (±5,1) ≈ 19,8 (±4,9) > 10,6 (±3,4)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN ≈ DP</b> 55,1 (±9,6) > 19,7 (±4,9) ≈ 13,2 (±5,2) ≈ 16,7 (±4,79)
<b>AT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ CD4<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP</b> 43,6 (±18,4) ≈ 40,7 (±17,9) > 11,8 (±4,6) > 2,9 (±1,7)	<b>DN &gt; CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 44,1 (±9,7) > 29,9 (±12,7) > 17,2 (±11,1) > 7,4 (±5,9)	<b>CD8<sup>+</sup> ≈ CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 32,3 (±17,1) ≈ 24,7 (±11,1) ≈ 28,4 (±10,1) > 13,7 (±7,0)
<b>DT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN &gt; DP</b> 50,6 (±44,2) > 24,2 (±24,2) ≈ 23,5 (±18,4) > 1,6 (±1,6)	<b>DN &gt; CD8<sup>+</sup> ≈ CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 41,8 (±12,2) > 24,4 (±21,6) ≈ 23,9 (±23,9) > 1,4 (±1,4)	<b>DN &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ CD8<sup>+</sup> &gt; DP</b> 52,4 (±11,6) > 25,5 (±25,5) ≈ 20,0 (15,9) > 1,0 (±1,0)
<b>PT</b>	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; CD4<sup>+</sup> ≈ DN</b> 72,2 (±20,0) > 17,6 (±9,6) ≈ 14,8 (±11,1)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; DN &gt; CD4<sup>+</sup> &gt; DP</b> 57,0 (±22,0) > 27,6 (±16,1) > 13,5 (±13,5) > 1,8 (±1,8)	<b>CD8<sup>+</sup> &gt; DN &gt; DP &gt; CD4<sup>+</sup></b> 44,3 (±8,0) > 29,8 (21,4) > 18,1 (±15,9) > 7,5 (±7,5)

Resultados apresentados em porcentagem como média (± desvio padrão). CTRL: grupo controle (n=10); AT: pacientes antes do tratamento (n=4); DT: pacientes durante o tratamento (n=2); PT: pacientes após o fim do tratamento (n=3). BG: *background*; Ag-Lb: antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis*.

## 6. DISCUSSÃO

A leishmaniose tegumentar Americana é um dos principais problemas de saúde pública em muitas regiões do mundo, sendo endêmica no Brasil, onde já foram notificados casos em todos os estados (SVS, 2010). A principal espécie causadora da doença no país é a *L. (V.) braziliensis*, que, após ser transmitida ao ser humano por flebotomíneos, infecta macrófagos e células dendríticas (DC), causando lesões na pele e, em casos mais graves, nas mucosas oral e nasal. A variedade de formas clínicas e gravidade da doença são reflexos da contribuição de diferentes fatores de virulência do parasito e respostas do hospedeiro (Carvalho *et al*, 2012).

Para o tratamento da leishmaniose o Ministério da Saúde preconiza esquemas terapêuticos com antimoniais pentavalentes, que, apesar de serem considerados eficazes, possuem efeitos colaterais acentuados, necessitando assim de monitoramento e hospitalização em muitos casos. Tais fármacos vêm sendo utilizado há muitas décadas, o que tem gerado cada vez mais relatos de resistência ao medicamento (SVS, 2010; Sundar & Chakravarty, 2013). Assim, a melhor estratégia para o controle dessa doença seria o desenvolvimento de uma vacina capaz de promover uma resposta imunológica eficaz, que controle a infecção e previna o dano tecidual progressivo. Contudo, para atingirmos progressos no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle da doença, seja na formulação de vacinas ou melhorias nos fármacos, é necessário um maior entendimento da resposta imunológica associada à cura e à proteção.

O desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra patógenos intracelulares requer a ação coordenada de diversos tipos celulares das respostas imunes inata e adaptativa. Na tentativa de elucidar os mecanismos associados à cura ou progressão da infecção, muitos estudos têm sido realizados utilizando modelos experimentais em animais ou *in vitro*; entretanto, ainda não está elucidado qual o perfil de resposta imune é necessário para controlar a doença e quais as diferenças entre os pacientes que desenvolvem a leishmaniose e aqueles que a curaram espontaneamente ou sob terapia antimonial (Brelaz-de-Castro *et al*, 2012). É importante salientar que a grande maioria destes estudos tem como foco a avaliação das citocinas envolvidas nas respostas imunes nas diferentes formas

clínicas e pouco é conhecido acerca do papel das células efectoras citotóxicas na LTA (Stäger & Rafati, 2012). Alguns estudos associam o papel citotóxico dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> no controle e proteção da infecção (Coutinho *et al*, 1984; da Conceição-Silva *et al*, 1994; Müller *et al*, 1994; Russo *et al*, 1999; Colmenares *et al*, 2003; Boussoffara *et al*, 2004), enquanto outros apontam para um papel na injúria tecidual (Barral-Netto *et al*, 1995; Brodskyn *et al*, 1997; Santos *et al*, 2013).

Neste contexto, o desenho experimental deste trabalho foi idealizado a partir do interesse em preencher as lacunas do conhecimento acerca do papel da citotoxicidade na LTA, não só em relação à ação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, mas também de todas as populações capazes de exercer esta atividade, como p.ex. as células NK, NKT e linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos. Para isto, o presente trabalho envolveu dois tipos de abordagens experimentais: ensaios *post-thaw*, com intuito de identificar a frequência das populações celulares citotóxicas e a degranulação que estaria ocorrendo *in vivo*; e ensaios *in vitro*, para avaliar a degranulação destas células frente os antígenos de *Leishmania*. A citometria de fluxo foi a ferramenta de escolha para determinar a frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, linfócitos T CD4<sup>+</sup>, células NK e células NKT, e seus perfis citotóxicos, através da expressão de CD107a, em amostras de sangue periférico obtidas de pacientes de LC e LM.

É importante ressaltar que a maioria dos pacientes apresenta uma resposta satisfatória à terapia antimonial, principalmente aqueles com a forma cutânea. Isto nos leva a especular que, nos indivíduos que curam, mesmo através de mecanismos não esclarecidos, esta terapia promove uma mudança benéfica na resposta do hospedeiro ao parasita, seja na destruição direta deste ou auxiliando na capacidade do hospedeiro de combatê-lo (De Oliveira-Neto *et al*, 2000; Brelaz-de-Castro *et al*, 2012). Ainda, em estudos de perfis de produção de citocinas, foi observado que pacientes após o tratamento antimonial exibiram perfis semelhantes aos apresentados por indivíduos que curaram espontaneamente (Brelaz-de-Castro *et al*, 2012). Deste modo, o perfil imunológico observado nos pacientes após o tratamento pode ser associado como um perfil de resposta eficaz. Sendo assim, na tentativa de identificar as características da resposta imune associada ao processo de cura clínica, os pacientes foram avaliados com a doença ativa e em dois momentos distintos do tratamento: durante a terapia antimonial e após o término da mesma.

A partir dos ensaios *post-thaw*, pôde ser observado que os linfócitos T CD4<sup>+</sup> são a população mais abundante, seguida pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, pelas células NK

e NKT em todos os grupos de pacientes e no grupo controle. Isto mostra que, apesar dos percentuais de cada população variar entre os grupos, este perfil de distribuição se mantém independente da presença da doença ou da fase do tratamento. Esta manutenção de uma maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em comparação aos linfócitos T CD8<sup>+</sup> também foi observada por outros autores em análises *ex vivo* de células de pacientes de LC antes e após o tratamento e de indivíduos sadios (Botelho *et al*, 2009; Brelaz-de-Castro *et al*, 2012). Entretanto, uma mudança na proporção destas células já foi observada em estudos de linfócitos reativos a antígenos de *Leishmania*, sendo observada nos pacientes com a doença ativa uma maior proporção de linfócitos T CD4<sup>+</sup> reativos, enquanto nos pacientes após o tratamento os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> se igualaram ou chegaram a ultrapassar os de linfócitos T CD4<sup>+</sup> (Da-Cruz *et al*, 1994, 2002; Coutinho *et al*, 1996; Toledo *et al*, 2001).

Avaliando-se a frequência dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> circulantes dos pacientes de LC, foram observados menores percentuais nos pacientes AT quando aos outros grupos estudados, o que pode estar relacionado ao processo infeccioso que ocorre nesta fase clínica da doença. Este resultado está de acordo com experimentos anteriores do nosso laboratório e de outros grupos, e pode estar relacionado à indução de apoptose nestes linfócitos (Ferraz, 2011), assim como a um recrutamento preferencial destes para o local da lesão (Mendes-Aguiar *et al*, 2009; Santos *et al*, 2013). A apoptose de linfócitos T CD8<sup>+</sup> durante a fase ativa da leishmaniose cutânea também foi observada em lesões de pacientes, indicando que a doença ativa estaria relacionada a uma depleção destes linfócitos (Bertho *et al*, 2000). Com o tratamento e após a cura clínica foi observado que os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes de LC tenderam a voltar aos níveis de normalidade (CTRL). Uma reconstituição aos níveis normais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em pacientes de LC após o tratamento antimonial também foi observada por Ferraz (2011).

Similarmente ao observado com os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> também foram detectados em menor número nos pacientes de LC com a doença ativa, o que também pode estar associado ao processo infeccioso com recrutamento destes para a lesão (Mendes-Aguiar *et al*, 2009; Santos *et al*, 2013). Os níveis de linfócitos T CD4<sup>+</sup> nos pacientes de LC durante e após o tratamento pareceram estar ligeiramente elevados; porém, como a diferença do percentual médio entre estes e

os pacientes antes do tratamento foi pequena, não é possível conjecturar se estes níveis tendem a retornar aos padrões de normalidade.

Maiores percentuais de células NK e NKT foram observados em todos os grupos de pacientes de LC em relação ao grupo CTRL. Os percentuais médios nestas populações pareceram diminuir com o tratamento e após a cura clínica recente, sendo possível que retornem aos níveis de normalidade após um maior tempo de cura.

É sabido que as células NK apresentam um aumento rápido e transitório nos momentos iniciais da leishmaniose cutânea, mas seus percentuais reduzem em número após alguns dias. Em estudos de modelos murinos infectados por *L. (L.) major*, as células NK participam da imunidade inicial nos três primeiros dias, tendo depois seus percentuais reduzidos (Laskay *et al*, 1993; Scharon & Scott, 1993). Em modelos de infecção por *L. (L.) major* e *L. (L.) aethiopica* foi observada uma significativa diminuição no número de células NK devido a uma inibição da proliferação destas ao interagirem com promastigotas de *Leishmania* (Lieke *et al*, 2008, 2011). Menores percentuais na fase ativa da leishmaniose também foram observados em outras formas clínicas de leishmaniose. Maasho e cols. (1998) observaram menores percentuais de células NK em pacientes com LC ativa em áreas de transmissão de *L. (L.) aethiopica* em relação aos indivíduos sadios, e estes percentuais aumentaram e retornaram aos níveis de normalidade com a cura clínica. Resultados similares a estes foram observados também na LV (Cenini *et al*, 1993). Ainda, na LCD causada por *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) amazonensis* foi observado um grande influxo de células NK para lesões de pacientes com LCD ativa, o que poderia estar relacionado aos menores percentuais destas observados no sangue periférico (Salaiza-Suazo *et al*, 1999; Pereira *et al*, 2009). Assim, com base nestes dados descritos na literatura, era esperada a detecção de menores percentuais de células NK nos pacientes de LC ativa, o que não foi observado no presente trabalho. Contudo, talvez na LC causada por *L. (V.) braziliensis* o maior número de células NK no sangue periférico esteja associado ao processo infeccioso, com a diminuição relacionada ao processo de cicatrização da lesão e cura clínica; apontando para um papel não protetor destas células, como já sugerido por outros autores (Barral-Netto *et al*, 1995; Machado *et al*, 2002).

Estudos sobre a distribuição das células NKT na LTA são extremamente escassos, não tendo sido documentado na literatura se estas células alteram seus

percentuais com a doença, com o tratamento antimonial ou com a cura clínica. Em concordância com os dados encontrados no presente estudo, maiores percentuais de células NKT foram observados em infecções por outros protozoários, como *Plasmodium vivax* e *P. falciparum* e *Trypanosoma cruzi* (Gonzalez-Asequinolaza *et al*, 2000; Vitelli-Avelar *et al*, 2006).

Além da avaliação da distribuição de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT, o intuito deste trabalho foi também analisar seus papéis citotóxicos na leishmaniose. Tendo em vista as metodologias atualmente disponíveis para análise da citotoxicidade, a escolha da utilização de um marcador para a molécula CD107a e sua avaliação por citometria de fluxo foi devido à aspiração de uma avaliação fenotípica e funcional precisa. Deste modo, foi possível caracterizar os perfis de distribuição e de degranulação das populações de interesse.

Embora esta seja uma metodologia rápida e sensível, alguns pontos são importantes para a obtenção ótima dos resultados. As moléculas de CD107a são geralmente residentes de membranas lisossomais, mas podem ser detectadas na superfície de algumas células do sangue periférico, como em plaquetas ativadas (Silverstein & Febbraio, 1992; Eskelinen *et al*, 2003). Ainda, por quase todas as células apresentarem estas moléculas no interior de membranas lisossomais, em casos de permeabilização da membrana (como em processos de morte celular) as células podem passar a expressar estas moléculas na superfície. Deste modo, uma estratégia de *gates* bem definida é extremamente importante neste tipo de análise (Betts & Koup, 2004). Nos ensaios de detecção de CD107a *in vitro* é extremamente importante e essencial a utilização de um inibidor de transporte protéico com monensina durante o período de cultivo, a fim de impedir que o anticorpo anti-CD107a seja reinternalizado e que o fluorocromo seja degradado pelo pH ácido do meio (Mollenhauer *et al*, 1990).

Contudo, a detecção de CD107a na membrana externa das células viáveis só é possível durante o processo de degranulação. Para que este processo ocorra, é necessária a ativação das células. Deste modo, é provável que as células em degranulação já tenham sido ativadas e estejam atuando em resposta a algum estímulo.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> apresentaram maiores percentuais de expressão de CD107a, ou seja, maiores percentuais de células em degranulação, em todos os grupos de pacientes de LC em relação ao CTRL. Estes percentuais

foram mais elevados nos pacientes durante o tratamento, tendendo a diminuir com a cura clínica. É possível que esta maior atividade citotóxica dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> nos pacientes durante o tratamento antimonial seja devido a uma maior ativação destes linfócitos nesta etapa. Assim, esta atividade pode estar relacionada ao processo de cura clínica, sendo observada uma diminuição nos PT. Mendonça e cols. (1986) observaram maiores índices de proliferação linfocitária frente antígenos de *L. (V.) braziliensis* em pacientes durante o tratamento antimonial em comparação aos pacientes com a doença ativa, relacionando esta proliferação acentuada de linfócitos específicos aos antígenos à destruição dos parasitos e progressão para a cura, juntamente com os efeitos benéficos da terapia. Ainda, (Toledo *et al*, 2001) sugeriram que o alto índice de proliferação de linfócitos específicos aos antígenos de *Leishmania* nos pacientes durante a terapia estaria relacionado à persistência *in vivo* do parasito e, no decorrer da evolução para a cura, o estímulo antigênico diminui, juntamente com a resposta imunológica. Assim, esta maior responsividade dos linfócitos observada nos pacientes de LC durante a terapia por outros autores pode estar relacionada a uma maior ativação destes e, conseqüentemente, a uma maior atividade citotóxica, o que foi observado no presente estudo neste grupo de pacientes. A maior ativação, proliferação e atividade citotóxica observadas neste trabalho e por outros grupos de pesquisa nos pacientes durante o tratamento antimonial provavelmente se devem também aos efeitos da terapia, que, em conjunto, levam à cura clínica. Como os antimoniais são leishmanicidas, provavelmente estão atuando na destruição dos parasitos e, devido a isso, pode estar havendo uma maior liberação de antígenos circulantes, o que aumentaria a ativação e a resposta celular (Coutinho *et al*, 1996).

O percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> em degranulação após o tratamento parece retornar aos níveis de normalidade (grupo CTRL). Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes PT apresentaram percentuais de degranulação ligeiramente inferiores em comparação aos pacientes DT, mas ainda parecem ser mais elevados que os observados nos AT e nos CTRL. Porém, como o grupo dos PT foi um grupo de cura recente, é possível que os níveis de degranulação destes linfócitos retomem os níveis de normalidade após um tempo de cura maior.

Inversamente ao observado nos linfócitos, as células NK apresentaram menor média percentual em degranulação em todos os grupos de pacientes de LC em relação ao grupo CTRL, sendo os menores percentuais de células NK

degranulando nos pacientes DT. Estes resultados condizem com uma inibição funcional destas células nas leishmanioses documentada na literatura. Na LV foi observada uma supressão da atividade citotóxica destas células nos pacientes com a doença ativa (Manna *et al*, 1993), além de resistência nas DC à lise por células NK, por um mecanismo de aumento de expressão de HLA-E, que é um ligante do receptor inibitório CD94/NKG2A das células NK (Campos-Martín *et al*, 2006). Em estudos com *L. (L.) aethiopica* e *L. (L.) major* foi demonstrado haver não só uma supressão da atividade citotóxica, como também da proliferação das células NK devido ao contato com ligantes da *Leishmania* (Lieke *et al*, 2008, 2011). Apesar de no presente estudo não ter sido observada uma menor frequência de células NK, que estaria associada à supressão da proliferação destas, foi possível notar uma menor degranulação, que pode estar associada à inibição da capacidade citotóxica já relatada.

As células NKT em degranulação se apresentaram em maiores percentuais nos pacientes DT, como observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>; e os percentuais observados nos AT e PT foram similares aos CTRL. Esta maior atividade citotóxica nos pacientes DT também pode estar relacionada a uma maior ativação destas durante o tratamento pela persistência do parasito em conjunto com os efeitos benéficos da terapia antimonial. Vale notar que as células NKT apresentam maiores percentuais de expressão de CD107a em comparação às outras populações estudadas, ressaltando um maior comprometimento desta população celular com a função citotóxica.

Poucos são os estudos de células NKT nas leishmanioses, sendo a maior parte destes em relação a seu reconhecimento antigênico e produção de citocinas na LV (Stanley *et al*, 2008; Rai *et al*, 2011; Robert-Gangneux *et al*, 2012). O conhecimento que se tem na leishmaniose cutânea é centrado no papel das células NKT como produtora de citocinas, atuando no direcionamento de uma resposta inflamatória tipo I ou em uma imunoregulação pela produção de citocinas Th2 através de suas interações com DC (Ishikawa *et al*, 2000; Wiethe *et al*, 2008; Joyee *et al*, 2010). Entretanto, pouco é conhecido acerca do papel citotóxico das células NKT nesta patologia. São fortes os indícios de que estas células desempenhem funções importantes nas leishmanioses, já que estas são capazes de reconhecer o LPG de *Leishmania* e interagir diretamente com DC (Amprey *et al*, 2004, 200; Wiethe *et al*, 2008). É sabido que DC são capazes de regular seus receptores CD1d

positivamente (Campos-Martín *et al*, 2006) ou negativamente (Donovan *et al*, 2007), aumentando ou diminuindo assim a capacidade de reconhecimento antigênico pelas células NKT.

Os experimentos *in vitro* foram realizados para avaliar a influência dos antígenos de *L. (V.) braziliensis* no comportamento das células, com intuito de simular a resposta antigênica específica que ocorre *in vivo*. É sabido que as células de sangue periférico apresentam uma degranulação basal, inespecífica, que é tipicamente baixa (Kannan *et al*, 1996). Por este motivo, como a finalidade do presente trabalho foi avaliar somente a resposta específica aos antígenos de *Leishmania*, os valores da expressão de CD107a detectados nas células cultivadas sem estímulo foram subtraídos dos valores obtidos das células cultivadas frente aos antígenos específicos.

Indivíduos sadios praticamente não apresentaram degranulação específica aos Ag-Lb pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, provavelmente pelo fato destes indivíduos nunca terem entrado em contato com antígenos de *Leishmania*. Assim, como células da imunidade adaptativa, estas não foram capazes de serem ativadas e degranularem por não terem tido reconhecimento antigênico prévio. Este resultado confirma o caráter específico da degranulação analisada no presente estudo.

Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> de pacientes de LC AT e PT apresentaram degranulação específica aos Ag-Lb, sendo maiores os percentuais nos pacientes PT. Esta degranulação específica provavelmente está relacionada ao reconhecimento antigênico ter ocorrido previamente *in vivo* e, após novo contato com os antígenos *in vitro*, estes linfócitos são ativados e degranulam em resposta ao antígeno.

No entanto, os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> em degranulação de pacientes de LC DT foram significativamente inferiores aos apresentados pelos pacientes AT e PT. Interessantemente, nos ensaios *post-thaw* os linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes DT foram os que apresentaram os maiores percentuais de degranulação em comparação aos outros grupos estudados. Uma possibilidade para estar havendo esta menor resposta específica aos Ag-Lb por estes linfócitos dos pacientes DT nos experimentos *in vitro* é a possível ocorrência de um processo de morte celular induzida por ativação (*activation-induced cell death* – AICD) (Brunner *et al*, 1995; Kabelitz *et al*, 1995; Green *et al*, 2003), com consequente comprometimento da funcionalidade. Os linfócitos T CD8<sup>+</sup> dos pacientes DT se apresentaram com maior atividade citotóxica, estando provavelmente mais ativados,

e, ao entrarem em contato permanente com os Ag-Lb *in vitro*, podem ter sofrido AICD. Um estudo com amostras de sangue periférico de pacientes de LC durante a terapia antimonial demonstrou um elevado percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> efetores em apoptose após estímulo com antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*, sugerindo a ocorrência de AICD nesta subpopulação (Ferraz, 2011).

Curiosamente, diferente do que foi observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, os percentuais de degranulação dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> foram baixos nos pacientes AT, tanto quanto nos DT, sendo somente expressivos nos PT. Talvez esta menor resposta específica possa estar também associada a uma possível ocorrência de AICD. Porém, como também foi observada nos pacientes AT, tal associação somente se justifica se estes linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos forem mais susceptíveis à AICD. Entretanto, existe outra possibilidade, visto que os mecanismos que regulam a citotoxicidade nos linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> são diferentes: enquanto os linfócitos T CD8<sup>+</sup> já expressam RNAm para perforina transcrito e parecem mantê-lo durante seus processos migratórios, os linfócitos T CD4<sup>+</sup> necessitam de ativação de seu TCR para induzirem a expressão de perforina (Liu *et al*, 2005; Niiya *et al*, 2005; Pipkin *et al*, 2010). Deste modo, é possível que os linfócitos T CD8<sup>+</sup> sejam primados para um desenvolvimento imediato da função citotóxica quando em um estado *naïve*, enquanto mais estímulos e um maior tempo após estimulação são necessários para converter os linfócitos T CD4<sup>+</sup> em citotóxicos (Marshall & Swain, 2011). Adicionalmente, é sabido que um ambiente polarizado para uma resposta Th1 não é ideal para a geração de linfócitos T CD4<sup>+</sup> citotóxicos (Pipkin *et al*, 2007), sendo estes linfócitos melhor induzidos sob uma condição Th0 (Brown *et al*, 2009). Sendo assim, talvez os Ag-Lb, o período e as condições de cultura não tenham sido suficientes para ativar e fazer com que estes linfócitos degranulassem. A degranulação específica em resposta ao Ag-Lb observada nos pacientes PT pode ter sido resultado da presença de uma condição homeostásica (com predominância de um ambiente Th0) e melhores condições funcionais destes linfócitos de reagirem aos estímulos, devido à cura clínica da patologia e menor contato destes com os antígenos *in vivo*.

O percentual médio de células NK em degranulação foi maior do que o de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> em todos os grupos estudados. Porém, nesta população celular, o Ag-Lb teve influência tanto sobre as células dos pacientes quanto sobre as dos CTRL. As células NK são células da imunidade inata e, embora reconheçam

ligantes específicos, não possuem especificidade antigênica (Kos & Engleman, 1996). Sendo assim, tanto as células NK dos indivíduos saudáveis quanto dos pacientes foram capazes de exercer sua atividade citotóxica quando em contato com os Ag-Lb.

Em relação às células NKT, foi possível observar degranulação específica ao Ag-Lb nas células NKT do grupo CTRL, mas esta foi acentuadamente inferior à observada nos pacientes de LC AT e PT. Estas células apresentam características dos sistemas imunes inato e adaptativo e, apesar de normalmente reconhecerem antígenos processados e apresentados pela molécula CD1d (Bendelac *et al*, 1995), podem também ser ativadas por TLRs da imunidade inata (Kinjo *et al*, 2005). Assim, espera-se que estas células possam apresentar uma ativação e atividade citotóxica tanto pelo reconhecimento de padrões moleculares associados à patógenos, quanto pelo reconhecimento de antígenos glicolipídicos específicos. Talvez por este motivo, tanto as células NKT de indivíduos saudáveis quanto de pacientes apresentaram degranulação frente ao estímulo com Ag-Lb, sendo esta menor no grupo CTRL.

Interessantemente, o perfil de degranulação das células NKT dos pacientes de LC foi muito semelhante ao observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup>: pacientes AT e PT apresentando maiores percentuais de degranulação específica aos Ag-Lb nos ensaios *in vitro*; e uma ausência desta degranulação específica nos pacientes DT. Vale ressaltar ainda que, similar ao observado nos linfócitos T CD8<sup>+</sup> nos ensaios *post-thaw*, as células NKT dos pacientes DT foram as que apresentaram maiores percentuais de degranulação em comparação aos outros grupos de pacientes e ao grupo CTRL. Neste contexto, uma possível ocorrência de AICD também nesta população celular pode estar levando a um comprometimento de sua funcionalidade no grupo de pacientes DT. Em concordância com esta hipótese, ocorrência de AICD de células NKT já foi descrita em modelos murinos (Eberl & MacDonald, 1998; Leite-de-Moraes *et al*, 2000; Fujii *et al*, 2003)

Em relação aos pacientes de LM, estes apresentaram consideráveis diferenças de distribuição e atividade citotóxica das populações celulares estudadas em relação aos pacientes de LC. Todavia, é apropriado enfatizar que a amostragem dos grupos de pacientes de LM foi menor que dos pacientes de LC, principalmente no grupo DT. Neste grupo, como a amostragem foi de apenas dois pacientes, não foi possível a comparação estatística com os outros grupos.

Diferentemente dos pacientes de LC, os pacientes de LM apresentaram as menores frequências de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> nos pacientes DT, e não nos

pacientes AT. Porém, como já destacado, este grupo de pacientes teve uma amostragem muito pequena. Uma menor média de percentual nos pacientes DT foi observada em todas as células. Contudo, a distribuição de linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup> em relação aos pacientes AT e PT e aos indivíduos CTRLLE se manteve similar ao observado na LC. As células NK e NKT se apresentaram mais elevadas nos pacientes AT em comparação aos indivíduos CTRLLE e, apesar de nos pacientes DT ter sido observada média similar aos CTRLLE, seus percentuais voltaram a ser mais elevados nos pacientes PT; diferente do observado nos pacientes de LC. Em relação ao perfil de degranulação das células dos pacientes de LM nos ensaios *post-thaw*, foi possível observar que o perfil de degranulação dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup> nos indivíduos do grupo CTRLLE e nos pacientes AT e PT foram semelhantes ao observado nos pacientes de LC; porém o grupo de pacientes DT apresentou resultado inverso, com as menores médias entre todos os grupos estudados. As células NKT apresentaram perfis de degranulação semelhante ao observado nos pacientes de LC; enquanto as células NK apresentaram um perfil de degranulação distinto, com os pacientes AT e DT com maiores percentuais de degranulação do que os CTRLLE, e estes percentuais tendendo a retornar aos níveis de normalidade com a cura clínica. Em conjunto, estes dados apontam para a necessidade de uma amostragem maior, visto ainda que houve um maior contraste de resultados em relação ao grupo de pacientes DT, que foi o grupo com menor número de indivíduos. Desta forma, não foi possível conjecturar se estas diferenças imunológicas encontradas entre os pacientes de LC e LM, principalmente no grupo de pacientes DT, são reais ou devidos à amostragem reduzida.

Os resultados dos pacientes de LM encontrados nos ensaios *in vitro* foram mais intrigantes. A forma mucosa da leishmaniose é caracterizada por uma hiperatividade da resposta imune celular, onde os pacientes apresentam teste de Montenegro mais reativo e maiores índices de citotoxicidade por linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK do que os pacientes de LC (Carvalho *et al*, 1985; Brodskyn *et al*, 1997; Ribeiro-de-Jesus *et al*, 1998). Assim, era esperado observar maiores percentuais de degranulação em resposta aos antígenos de *Leishmania* nos pacientes de LM estudados. No entanto, no presente estudo, foram observados percentuais baixíssimos ou nulos de degranulação específica aos Ag-Lb por todas as populações celulares estudadas dos pacientes de LM em todas as fases avaliadas. Estes resultados indicam haver uma depressão da resposta efetora, o que não é característico da forma mucosa, mas sim da forma difusa da doença. Pacientes com

a forma difusa apresentam comprometimento da atividade citotóxica de linfócitos T CD8<sup>+</sup> frente a macrófagos infectados com *L. (L.) mexicana*, o que foi associado a um microambiente supressor e à persistência antigênica devido aos longos períodos de evolução da doença nestes pacientes (Hernández-Ruiz *et al*, 2010). Talvez esta possa ser uma explicação para a falta de resposta citotóxica específica aos antígenos de *Leishmania* pelos pacientes de LM, já que estes relataram períodos mais longos de evolução clínica (Tabela 5.2). Ainda, talvez possa estar havendo *in vivo* uma maior disseminação dos antígenos de *Leishmania* em comparação aos pacientes de LC, acentuando a persistência parasitária, que levaria a um mecanismo de “exaustão” celular. Contudo, como já enfatizado, se torna ainda necessário uma maior amostragem para que seja possível uma melhor discussão destes resultados.

Além da avaliação da distribuição das populações celulares de interesse (linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup>, células NK e NKT) e sua atividade citotóxica, foram analisadas também algumas subpopulações singulares e pouco pesquisadas. Geralmente as células NK e NKT são estudadas como sendo uma população homogênea, mas estudos comprovam que estas populações são divididas em subpopulações fenotípica e funcionalmente distintas. Nos seres humanos, as subpopulações de células NK são distinguidas com base na densidade de expressão de CD56, sendo assim divididas em CD56<sup>dim</sup> e CD56<sup>bright</sup> (Lanier *et al*, 1986; Cooper *et al*, 2001). Após a análise das células NK e de sua expressão de CD56 foi possível determinar que mais de 90% das células NK expressaram CD56<sup>dim</sup>. Estes resultados estão de acordo com o descrito na literatura (Lanier *et al*, 1986; Cooper *et al*, 2001) e foram observados em todos os grupos estudados (indivíduos sadios e pacientes de LC e LM), tanto nos ensaios *post-thaw* quanto nos ensaios *in vitro*, independente do estímulo utilizado. Isto evidencia que a proporção das subpopulações de células NK não se altera com a presença da patologia ou com o tratamento, demonstrando haver a manutenção de uma distribuição fisiológica nos pacientes. Em relação à atividade citotóxica destas subpopulações, nossos resultados também se mostraram de acordo com a literatura, sendo a subpopulação CD56<sup>dim</sup> a mais citotóxica (Lanier *et al*, 1986). Em todos os grupos estudados e ensaios realizados foi possível observar que mais de 90% das células NK que expressaram CD107a eram CD56<sup>dim</sup>, evidenciando que a presença da patologia não altera o perfil citotóxico destas subpopulações.

Já as subpopulações de células NKT foram bastante variáveis entre os grupos estudados e ensaios realizados. Células NKT humanas são divididas em três subpopulações de acordo com seus perfis de expressão de CD8 e CD4: CD8<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>), CD8<sup>-</sup>CD4<sup>+</sup> (CD4<sup>+</sup>) e CD8<sup>-</sup>CD4<sup>-</sup> (duplo-negativas – DN) (Hammond *et al*, 1999; Gadola *et al*, 2002; Gumperz *et al*, 2002; Takahashi *et al*, 2002). Contudo, no presente estudo, foi possível observar uma porcentagem significativa de células NKT com perfil CD8<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, ou seja, duplo-positivas (DP). Células NKT DP em proporções consideráveis já foram observadas por outros autores em indivíduos saudáveis (Zloza & Al-Harhi, 2006; Montoya *et al*, 2007; O'Reilly *et al*, 2011) e, apesar de serem geralmente ignoradas devido a seus baixos percentuais, estas parecem sim consistir em uma subpopulação singular de células NKT.

Os indivíduos saudáveis e todos os grupos de pacientes de LC apresentaram os maiores percentuais de células NKT sendo CD8<sup>+</sup> em todos os ensaios realizados. A distribuição das subpopulações de células NKT descrita na literatura é bastante variável; no entanto, maiores proporções de células NKT CD8<sup>+</sup> já foram observadas também por outros autores em indivíduos saudáveis e em pacientes com outras patologias (Gumperz *et al*, 2002; Carvalho *et al*, 2010). Dados da distribuição destas subpopulações na LTA ainda não foram documentados.

Entre as variações das proporções de subpopulações de células NKT, alguns resultados são particularmente interessantes de serem ressaltados. Os indivíduos saudáveis exibiram proporções ligeiramente inferiores de células NKT DN nos ensaios *in vitro* (em comparação aos ensaios *post-thaw*), com um proporcional aumento de NKT CD8<sup>+</sup> e DP, e quase nenhuma alteração nas células NKT CD4<sup>+</sup>. Isto indica que não foram os antígenos específicos que induziram este aumento de células NKT DN, mas sim as condições de cultura.

Diferentemente, em todos os grupos de pacientes de LC foi possível observar uma expansão de células NKT CD4<sup>+</sup> (p<0,05), com proporcional diminuição de NKT CD8<sup>+</sup>, nos ensaios *in vitro* em comparação aos ensaios *post-thaw*, indicando um aumento não-específico aos antígenos, que provavelmente foi resultante das condições de cultura. De acordo com estes resultados observados nos grupos de pacientes de LC, já foi descrito que as células NKT CD4<sup>+</sup> possuem capacidade de se expandirem mais rapidamente do que as outras subpopulações em condições favoráveis (O'Reilly *et al*, 2011). O resultado mais interessante entre as subpopulações de células NKT de pacientes de LC foi a detecção de proporções

nitidamente mais elevadas de células NKT DP nos pacientes DT em todos os ensaios, em comparação com os outros grupos estudados. Apesar desta população ser frequentemente ignorada, estes resultados indicam que ela possa ter alguma função no processo de cura da LC.

Nos pacientes de LM, o perfil de distribuição das subpopulações de células NKT nos ensaios *post-thaw* foi semelhante entre o grupo CTRL e os pacientes DT; enquanto os pacientes AT e, mais acentuadamente, os PT apresentaram maiores proporções de células NKT CD8<sup>+</sup>, com menores proporções de células NKT DN. Nos ensaios *in vitro*, foi possível observar uma diminuição da proporção de células NKT CD8<sup>+</sup> e aumento das NKT CD4<sup>+</sup> e DN em todos os grupos de pacientes de LM, indicando que esta expansão está relacionada às condições de cultura, e não é induzida pelos antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Curiosamente, nos pacientes de LM não foram observadas maiores proporções de células NKT DP no grupo DT, como visto nos pacientes de LC.

A atividade citotóxica destas subpopulações de células NKT também foi avaliada. Dentre as células NKT que expressaram CD107a, foram então analisadas as subpopulações com base nos perfis de expressão de CD8 e CD4. Nos ensaios *post-thaw*, os indivíduos sadios apresentaram perfis de degranulação das subpopulações de células NKT diferentes dos grupos de pacientes de LC e LM. Na avaliação destes ensaios, foi possível observar que os indivíduos sadios apresentaram as células NKT CD4<sup>+</sup> como a população mais citotóxica, seguidas pelas NKT CD8<sup>+</sup>, DP e DN. Estes resultados vão em oposição ao descrito na literatura, onde as células NKT CD8<sup>+</sup> são as mais citotóxicas, seguidas pelas NKT DN e, por último, pelas NKT CD4<sup>+</sup> (Gumperz *et al*, 2002; Lee *et al*, 2002; Takahashi *et al*, 2002; Ho *et al*, 2004; Seino & Taniguchi, 2005; Lin *et al*, 2006; Montoya *et al*, 2007; O'Reilly *et al*, 2011). Entretanto, nos ensaios *in vitro*, o perfil de degranulação das subpopulações de células NKT dos indivíduos sadios foi alterado, com a subpopulação NKT CD8<sup>+</sup> passando a ser a mais citotóxica, corroborando com os achados da literatura. Porém, as células NKT CD4<sup>+</sup> foram mais citotóxicas que as NKT DN nos ensaios *in vitro*, não confirmando os dados da literatura. Adicionalmente, a subpopulação NKT DP também foi avaliada, o que geralmente não é feito nos trabalhos descritos na literatura, e esta população se mostrou com atividade citotóxica semelhante às células NKT CD4<sup>+</sup> nos ensaios *in vitro*, ou seja, menos citotóxicas que as células NKT CD8<sup>+</sup> e mais que as NKT DN.

Todos os pacientes de LC apresentaram as células NKT CD8<sup>+</sup> como a subpopulação mais citotóxica, sendo interessantemente observado nos pacientes DT percentuais de degranulação semelhante entre as células NKT CD8<sup>+</sup> e DP. Nestes pacientes DT, as células NKT DP passaram a ser a população mais citotóxica nos ensaio *in vitro*, em todas as condições de cultura, e as células NKT CD8<sup>+</sup> apresentaram diminuição acentuada de degranulação nestes ensaios. Assim, além das células NKT DP se apresentarem em maiores proporções nos pacientes DT em comparação aos outros grupos de pacientes e CTRL, esta é a subpopulação mais comprometida com a citotoxicidade nos pacientes DT. Estes resultados indicam uma importante função citotóxica específica das células NKT DP no processo de evolução para a cura clínica da LC.

Diferente ao observado nos pacientes de LC DT, nos pacientes AT e PT os percentuais de células NKT DP em degranulação foram quase sempre os mais baixos em comparação às outras subpopulações em todos os ensaios. Nos pacientes de LC AT, os Ag-Lb parecem induzir uma diminuição da degranulação pelas células NKT CD8<sup>+</sup>, com proporcional aumento da degranulação pelas células NKT DN e DP. Já nos pacientes PT, estes antígenos parecem induzir uma maior degranulação pelas células NKT CD4<sup>+</sup>.

Em oposição aos resultados obtidos com os pacientes de LC DT, nos pacientes de LM DT os percentuais de células NKT DP em degranulação foram os mais baixos, tanto nos ensaios *post-thaw* quanto *in vitro*, em comparação às outras subpopulações de células NKT. Nesta forma clínica da leishmaniose, as células NKT DP não parecem ter uma função tão importante quanto na LC, visto que seus percentuais e sua atividade citotóxica pouco se alteram em comparação aos indivíduos saudáveis e aos outros grupos de pacientes. Nestes pacientes de LM DT foram observados maiores percentuais de células NKT DN em degranulação nos ensaios *post-thaw* em comparação aos outros grupos de pacientes; e estes percentuais aumentam nos ensaios *in vitro*. Aumento da degranulação por células NKT DN nos ensaios *in vitro* também foi observado nos pacientes AT e PT. Deste modo, talvez na forma mucosa as células NKT DN tenham uma função citotóxica relevante no processo de cura clínica.

## 7. CONCLUSÕES

- Independente da presença da leishmaniose (cutânea ou mucosa), do tratamento ou da cura, a proporção entre as populações celulares avaliadas não se alterou, sendo sempre maiores os percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, seguidos pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, pelas células NK e pelas células NKT.
- A diminuição da frequência de linfócitos T CD8<sup>+</sup> observada nos pacientes de leishmaniose cutânea ativa e sua recuperação aos níveis de normalidade com o tratamento e a cura clínica apontam para um papel-chave destes linfócitos na resolução da infecção.
- Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e células NKT apresentaram maior atividade citotóxica nos pacientes de leishmaniose cutânea durante o tratamento, indicando que suas funções citotóxicas, em conjunto com os efeitos benéficos da terapia, auxiliam no direcionamento à cura clínica.
- Apesar desta maior atividade citotóxica pelos linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e células NKT observada nos pacientes de leishmaniose cutânea durante o tratamento, estas mesmas células apresentaram sua função citotóxica prejudicada quando em contato com alta carga antigênica.
- Embora as células NKT sejam encontradas em baixos percentuais no sangue periférico, estas se mostraram ser a população celular mais comprometida com a função citotóxica em todos os grupos estudados.
- Uma subpopulação de célula NKT com perfil fenotípico CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>, ou seja, duplo-positiva, foi descrita e seu papel citotóxico parece estar envolvido no processo de cura da leishmaniose cutânea.
- Embora as células NK tenham sido detectadas em percentuais mais elevados nos grupos de pacientes de leishmaniose cutânea, estas células apresentaram uma inibição da atividade citotóxica nestes grupos, sugerindo que a citotoxicidade exercida pelas células NK circulantes não influencia na imunopatogenia e/ou no processo de cura da leishmaniose cutânea. Ainda, na presença dos antígenos de *Leishmania*, estas células apresentaram o mesmo perfil de degranulação nos

pacientes e indivíduos saudáveis, evidenciando seu comportamento citotóxico não específico.

- Os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, T CD4<sup>+</sup> e células NK dos pacientes de LM apresentaram atividade citotóxica mais elevada que os indivíduos saudáveis; porém, curiosamente, nenhuma das populações celulares estudadas foi capaz de exercer atividade citotóxica específica em resposta aos antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Devido ao fato da amostragem destes grupos de pacientes ter sido pequena, a avaliação e a conclusão destes resultados foram prejudicadas.

- Em conjunto, estes dados apontam para uma participação efetiva dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> e das células NKT (principalmente da subpopulação duplo-positiva) no processo de cura da leishmaniose cutânea, enaltecendo a importância destas células como promissores alvos de estudos terapêuticos e vacinais.

## 8. REFERÊNCIAS

- Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, Clarêncio J, De Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M & Brodskyn CI (2008) Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J. Leukoc. Biol.* **84**: 389–396
- Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G & De Vargas Z (1989) Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **84**: 19–28
- Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G & Deniz G (2009) Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell. Immunol.* **254**: 149–154
- Al-Hubeshy ZB, Coleman A, Nelson M & Goodier MR (2011) A rapid method for assessment of natural killer cell function after multiple receptor crosslinking. *J. Immunol. Methods* **366**: 52–59
- Alter G, Malenfant JM & Altfeld M (2004) CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *Journal of Immunological Methods* **294**: 15–22
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J & Den Boer M (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* **7**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3365071/> [Accessed November 13, 2012]
- Amato VS, De Andrade HF & Duarte MIS (2003) Mucosal leishmaniasis: *in situ* characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* **85**: 39–49
- Amprey JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Illarionov PA, Besra GS, Porcelli SA & Späth GF (2004) A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* **200**: 895–904
- Appay V, Nixon DF, Donahoe SM, Gillespie GM, Dong T, King A, Ogg GS, Spiegel HM, Conlon C, Spina CA, Havlir DV, Richman DD, Waters A, Easterbrook P, McMichael AJ & Rowland-Jones SL (2000) HIV-specific CD8(+) T cells produce antiviral cytokines but are impaired in cytolytic function. *J. Exp. Med.* **192**: 63–75
- Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, Easterbrook P, Grey P, Smith D, McMichael AJ, Cooper DA, Rowland-Jones SL & Kelleher AD (2002) Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J. Immunol.* **168**: 5954–5958
- Aranha FCS, Ribeiro U Jr, Basse P, Corbett CEP & Laurenti MD (2005) Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigote and macrophage infection. *Scand. J. Immunol.* **62**: 334–341
- Arrenberg P, Halder R, Dai Y, Maricic I & Kumar V (2010) Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 10984–10989
- Arrenberg P, Halder R & Kumar V (2009) Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J. Cell. Physiol.* **218**: 246–250

- Aslan N, Yurdaydin C, Wiegand J, Greten T, Ciner A, Meyer MF, Heiken H, Kuhlmann B, Kaiser T, Bozkaya H, Tillmann HL, Bozdayi AM, Manns MP & Wedemeyer H (2006) Cytotoxic CD4 T cells in viral hepatitis. *J. Viral Hepat.* **13**: 505–514
- Bajénoff M, Breart B, Huang AYC, Qi H, Cazareth J, Braud VM, Germain RN & Glaichenhaus N (2006) Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J. Exp. Med.* **203**: 619–631
- Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M & Henkart PA (2002) Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J. Exp. Med.* **196**: 493–503
- Bañuls A-L, Hide M & Prugnolle F (2007) *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* **64**: 1–109
- Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M & Carvalho EM (1995) Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int. J. Dermatol.* **34**: 474–479
- Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, Almeida R, Badaro R, Barral-Netto M & Carvalho EM (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **44**: 536–546
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM & Reed SG (1995) Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **17**: 21–28
- Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL, Nascimento LD, Marzochi MCA & Marzochi KBF (2009) Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **103**: 383–389
- Barton GM & Medzhitov R (2003) Toll-like receptor signaling pathways. *Science* **300**: 1524–1525
- Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, González A, Maldonado C & Isibasi A (2003) *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol. Biochem. Parasitol.* **130**: 65–74
- Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR & Brutkiewicz RR (1995) CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science* **268**: 863–865
- Bendelac A, Savage PB & Teyton L (2007) The biology of NKT cells. *Annu. Rev. Immunol.* **25**: 297–336
- Berman JD (1988) Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Infect. Dis.* **10**: 560–586
- Bern C, Maguire JH & Alvar J (2008) Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* **2**: e313
- Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM & Coutinho SG (2000) Detection of early apoptosis and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **33**: 317–325
- Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, Houde M, Desjardins M, Sher A & Sacks D (2006) *Leishmania* antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-

- independent pathway *in vitro* and *in vivo*. *J. Immunol.* **177**: 3525–3533
- Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M & Koup RA (2003) Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J. Immunol. Methods* **281**: 65–78
- Betts MR & Koup RA (2004) Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol.* **75**: 497–512
- Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG & Da-Cruz AM (2007) T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**: 625–630
- Bittencourt AL, Costa JM, Carvalho EM & Barral A (1993) Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* **32**: 802–805
- Blanca IR, Bere EW, Young HA & Ortaldo JR (2001) Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. *J. Immunol.* **167**: 6132–6139
- Bogdan C (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nat. Immunol.* **2**: 907–916
- Bogdan C & Rölinghoff M (1999) How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol. Today (Regul. Ed.)* **15**: 22–28
- Botelho ACC, Mayrink W & Oliveira RC (2009) Alterations in phenotypic profiles of peripheral blood cells from patients with human American cutaneous leishmaniasis following treatment with an antimonial drug and a vaccine. *Acta Trop.* **112**: 143–148
- Bourreau E, Ronet C, Couppié P, Sainte-Marie D, Tacchini-Cottier F & Launois P (2007) IL-10 producing CD8+ T cells in human infection with *Leishmania guyanensis*. *Microbes Infect.* **9**: 1034–1041
- Bousoffara T, Louzir H, Ben Salah A & Dellagi K (2004) Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of *Leishmania*-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* **189**: 1265–1273
- Brasil, 2010 Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar Americana, 3rd Ed.
- Brelaz-de-Castro MCA, De Almeida AF, De Oliveira AP, De Assis-Souza M, Da Rocha LF & Pereira VRA (2012) Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell. Immunol.* **279**: 180–186
- Brien JD, Uhrlaub JL & Nikolich-Zugich J (2008) West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct antiviral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *J. Immunol.* **181**: 8568–8575
- Brigl M & Brenner MB (2004) CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 817–890
- Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E & Barral-Netto M (1997) Parasite-driven *in vitro* human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.* **159**: 4467–4473
- Brown DM (2010) Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell. Immunol.* **262**: 89–95
- Brown DM, Kamperschroer C, Dilzer AM, Roberts DM & Swain SL (2009) IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell. Immunol.* **257**: 69–79

- Brunner KT, Mael J, Cerottini JC & Chapuis B (1968) Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on 51-Cr-labelled allogeneic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology* **14**: 181–196
- Brunner T, Mogil RJ, LaFace D, Yoo NJ, Mahboubi A, Echeverri F, Martin SJ, Force WR, Lynch DH & Ware CF (1995) Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* **373**: 441–444
- Bryceson AD (1969) Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **63**: 708–737
- Calvopina M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S & Hashiguchi Y (2006) Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int. J. Dermatol.* **45**: 116–120
- Campbell JJ, Murphy KE, Kunkel EJ, Brightling CE, Soler D, Shen Z, Boisvert J, Greenberg HB, Vierra MA, Goodman SB, Genovese MC, Wardlaw AJ, Butcher EC & Wu L (2001) CCR7 expression and memory T cell diversity in humans. *J. Immunol.* **166**: 877–884
- Campos-Martín Y, Colmenares M, Gozalbo-López B, López-Núñez M, Savage PB & Martínez-Naves E (2006) Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *J. Immunol.* **176**: 6172–6179
- Canaday DH, Wilkinson RJ, Li Q, Harding CV, Silver RF & Boom WH (2001) CD4(+) and CD8(+) T cells kill intracellular *Mycobacterium tuberculosis* by a perforin and Fas/Fas ligand-independent mechanism. *J. Immunol.* **167**: 2734–2742
- Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz A, Sanchez B, Gutiérrez-Kobeh L, Aguirre M & Becker I (2007) Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.* **29**: 117–126
- Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A & Marsden P (1994) Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* **56**: 315–325
- Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S & Rocha H (1985) Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.* **135**: 4144–4148
- Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT & Kallas EG (2010) Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS ONE* **5**:
- Carvalho LP, Passos S, Schriefer A & Carvalho EM (2012) Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* **3**: 301
- Casazza JP, Betts MR, Price DA, Precopio ML, Ruff LE, Brenchley JM, Hill BJ, Roederer M, Douek DC & Koup RA (2006) Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+ T lymphocytes with cellular maturation. *J. Exp. Med.* **203**: 2865–2877
- Castés M & Tapia FJ (1998) [Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]. *Acta Cient. Venez.* **49**: 42–56
- CDC -Centers for Disease Control and Prevention (2013) CDC - Leishmaniasis.

Available at: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/> [Accessed November 13, 2012]

Cenini P, Berhe N, Hailu A, McGinnes K & Frommel D (1993) Mononuclear cell subpopulations and cytokine levels in human visceral leishmaniasis before and after chemotherapy. *J. Infect. Dis.* **168**: 986–993

Chahroudi A, Silvestri G & Feinberg MB (2003) Measuring T cell-mediated cytotoxicity using fluorogenic caspase substrates. *Methods* **31**: 120–126

Chan WK, Kung Sutherland M, Li Y, Zalevsky J, Schell S & Leung W (2012) Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity overcomes NK cell resistance in MLL-rearranged leukemia expressing inhibitory KIR ligands but not activating ligands. *Clin. Cancer Res.* **18**: 6296–6305

Chang DH, Deng H, Matthews P, Krasovsky J, Ragupathi G, Spisek R, Mazumder A, Vesole DH, Jagannath S & Dhodapkar MV (2008) Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. *Blood* **112**: 1308–1316

Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R & Lascurain R (2009) Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell. Mol. Immunol.* **6**: 15–25

Chen X, Wang X, Besra GS & Gumperz JE (2007) Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by CD4. *J. Leukoc. Biol.* **82**: 1455–1465

Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L & McMahon-Pratt D (2003) Perforin and Gamma Interferon Are Critical CD8+ T-Cell-Mediated Responses in Vaccine-Induced Immunity against *Leishmania amazonensis* Infection. *Infect Immun* **71**: 3172–3182

Da Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA & Romero P (1994) *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *Eur. J. Immunol.* **24**: 2813–2817

Convit J, Pinardi ME & Rondón AJ (1972) Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **66**: 603–610

Cooper MA, Fehniger TA & Caligiuri MA (2001) The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol.* **22**: 633–640

Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, Rosa AC, Cuba CC, Magalhães AV & Barreto AC (1986) Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg* **89**: 319–323

Costa JM, Vale KC, França F, Saldanha AC, Da Silva JO, Lago EL, Marsden PD, Magalhães AV, E Silva CM & Serra Neto A (1990) [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania Viannia braziliensis* in cutaneous lesions]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **23**: 205–208

Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA & De-Luca P (1998) Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**: 139–142

Coutinho SG, Louis JA, Mauel J & Engers HD (1984) Induction by specific T lymphocytes of intracellular destruction of *Leishmania major* in infected murine macrophages. *Parasite Immunol.* **6**: 157–169

- Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL, Soong L & McMahon-Pratt D (1996) T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp. Parasitol.* **84**: 144–155
- Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, De Oliveira-Neto MP, De Brito MEF, Falqueto A, De Farias Naiff M & Grimaldi G Jr (2003) Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 3126–3132
- Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP & Coutinho SG (2005) Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br. J. Dermatol.* **153**: 537–543
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB & Coutinho SG (2002) T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **9**: 251–256
- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL & Coutinho SG (1994) *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* **62**: 2614–2618
- Da-Cruz AM & Pirmez C (2005) Leishmaniose Tegumentar Americana. In *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias* Rio de Janeiro - Guanabara Koogan: Coura, JR
- David CV & Craft N (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* **22**: 491–502
- Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M & Lanzavecchia A (1994) An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J. Exp. Med.* **180**: 1171–1176
- Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, Rölinghoff M, Gresser I & Bogdan C (1998) Type 1 interferon (IFNalpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity* **8**: 77–87
- Donovan MJ, Jayakumar A & McDowell MA (2007) Inhibition of groups 1 and 2 CD1 molecules on human dendritic cells by *Leishmania* species. *Parasite Immunol.* **29**: 515–524
- Dorner BG, Smith HRC, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman DL, Pingel JT, Kroczek RA & Yokoyama WM (2004) Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **172**: 3119–3131
- Eberl G & MacDonald HR (1998) Rapid death and regeneration of NKT cells in anti-CD3epsilon- or IL-12-treated mice: a major role for bone marrow in NKT cell homeostasis. *Immunity* **9**: 345–353
- Echchakir H, Bagot M, Dorothée G, Martinvalet D, Le Gouvello S, Bousmell L, Chouaib S, Bensussan A & Mami-Chouaib F (2000) Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J. Invest. Dermatol.* **115**: 74–80
- El Hajj L, Thellier M, Carrière J, Bricaire F, Danis M & Caumes E (2004) Localized cutaneous leishmaniasis imported into Paris: a review of 39 cases. *Int. J. Dermatol.*

**43:** 120–125

Eskelinen E-L, Tanaka Y & Saftig P (2003) At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* **13:** 137–145

Fadok VA, McDonald PP, Bratton DL & Henson PM (1998) Regulation of macrophage cytokine production by phagocytosis of apoptotic and post-apoptotic cells. *Biochem. Soc. Trans.* **26:** 653–656

Faria DR, Souza PEA, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR & Dutra WO (2009) Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **31:** 432–439

Faroudi M, Utzny C, Salio M, Cerundolo V, Guiraud M, Müller S & Valitutti S (2003) Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100:** 14145–14150

Faurschou M & Borregaard N (2003) Neutrophil granules and secretory vesicles in inflammation. *Microbes Infect.* **5:** 1317–1327

Feighery C & Stastny P (1979) HLA-D region-associated determinants serve as targets for human cell-mediated lysis. *J. Exp. Med.* **149:** 485–494

Ferlazzo G, Thomas D, Lin S-L, Goodman K, Morandi B, Muller WA, Moretta A & Münz C (2004) The abundant NK cells in human secondary lymphoid tissues require activation to express killer cell Ig-like receptors and become cytolytic. *J. Immunol.* **172:** 1455–1462

Ferraz R (2011) Apoptose e perfil do repertório da cadeia variável beta do receptor de células T em linfócitos T CD8+ de pacientes com leishmaniose cutânea [Dissertação de Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária - Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ].

Fischer K, Andreesen R & Mackensen A (2002) An improved flow cytometric assay for the determination of cytotoxic T lymphocyte activity. *J. Immunol. Methods* **259:** 159–169

Flandin J-F, Chano F & Descoteaux A (2006) RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages. *Eur. J. Immunol.* **36:** 411–420

Fleischer B (1984) Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4+ T lymphocytes in culture. *Nature* **308:** 365–367

Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP & Carvalho EM (2002) Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin. Infect. Dis.* **34:** E54–58

Fujii H, Seki S, Nakatani K, Ikeda K, Ikemoto M, Nakajima Y, Arakawa T & Kaneda K (2003) Localization of lymphocyte apoptosis in murine lymphoid tissues after stimulation of natural killer T cells with alpha-galactosylceramide. *Arch. Histol. Cytol.* **66:** 397–406

Fukuda M (1991) Lysosomal membrane glycoproteins. Structure, biosynthesis, and intracellular trafficking. *J. Biol. Chem.* **266:** 21327–21330

Gadola SD, Dulphy N, Salio M & Cerundolo V (2002) Valpha24-JalphaQ-independent, CD1d-restricted recognition of alpha-galactosylceramide by human CD4(+) and CD8alpha(+) T lymphocytes. *J. Immunol.* **168:** 5514–5520

- Gagnon SJ, Ennis FA & Rothman AL (1999) Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J. Virol.* **73**: 3623–3629
- Gapin L (2010) iNKT cell autoreactivity: what is ‘self’ and how is it recognized? *Nat. Rev. Immunol.* **10**: 272–277
- Garcia L, Kindt A, Bermudez H, Llanos-Cuentas A, De Doncker S, Arevalo J, Wilber Quispe Tintaya K & Dujardin J-C (2004) Culture-independent species typing of neotropical *Leishmania* for clinical validation of a PCR-based assay targeting heat shock protein 70 genes. *J. Clin. Microbiol.* **42**: 2294–2297
- Ghersetich I, Menchini G, Teofoli P & Lotti T (1999) Immune response to *Leishmania* infection in human skin. *Clin. Dermatol.* **17**: 333–338
- Godfrey DI, Hammond KJ, Poulton LD, Smyth MJ & Baxter AG (2000) NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* **21**: 573–583
- Godfrey DI & Kronenberg M (2004) Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J. Clin. Invest.* **114**: 1379–1388
- Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ & Van Kaer L (2004) NKT cells: what’s in a name? *Nat. Rev. Immunol.* **4**: 231–237
- Godfrey DI, Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, McCluskey J & Rossjohn J (2010a) Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin. Immunol.* **22**: 61–67
- Godfrey DI, Stankovic S & Baxter AG (2010b) Raising the NKT cell family. *Nat. Immunol.* **11**: 197–206
- Gomes AHS, Armelin IM, Menon SZ & Pereira-Chiocola VL (2008) *Leishmania (V.) braziliensis*: detection by PCR in biopsies from patients with cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* **119**: 319–324
- Gonzalez-Aseguinolaza G, De Oliveira C, Tomaska M, Hong S, Bruna-Romero O, Nakayama T, Taniguchi M, Bendelac A, Van Kaer L, Koezuka Y & Tsuji M (2000) alpha -galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**: 8461–8466
- Goto H & Lauletta Lindoso JA (2012) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **26**: 293–307
- Goto H & Lindoso JAL (2010) Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**: 419–433
- Green DR, Droin N & Pinkoski M (2003) Activation-induced cell death in T cells. *Immunol. Rev.* **193**: 70–81
- Grimaldi G Jr & McMahan-Pratt D (1991) Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *Prog Clin Parasitol* **2**: 73–118
- Grimaldi G Jr & Tesh RB (1993) Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**: 230–250
- Grogl M, Thomason TN & Franke ED (1992) Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **47**: 117–126
- Guerra JA de O, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI de ARC, Gama P, Moura A, Amato V, Barbosa M das GV & Ferreira LC de L (2011) Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in

- the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis* **5**: e980
- Guimarães MC, Celeste BJ & Franco EL (1990) Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull. World Health Organ.* **68**: 39–43
- Guimarães MC, Celeste BJ, Franco EL, Cucé LC & Belda W Jr (1989) Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull. World Health Organ.* **67**: 643–648
- Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T & Brenner MB (2002) Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J. Exp. Med.* **195**: 625–636
- Haigh TA, Lin X, Jia H, Hui EP, Chan ATC, Rickinson AB & Taylor GS (2008) EBV latent membrane proteins (LMPs) 1 and 2 as immunotherapeutic targets: LMP-specific CD4+ cytotoxic T cell recognition of EBV-transformed B cell lines. *J. Immunol.* **180**: 1643–1654
- Hammond KJ, Pelikan SB, Crowe NY, Randle-Barrett E, Nakayama T, Taniguchi M, Smyth MJ, Van Driel IR, Scollay R, Baxter AG & Godfrey DI (1999) NKT cells are phenotypically and functionally diverse. *Eur. J. Immunol.* **29**: 3768–3781
- Handman E (1999) Cell biology of *Leishmania*. *Adv. Parasitol.* **44**: 1–39
- Held W, Kijima M, Angelov G & Bessoles S (2011) The function of natural killer cells: education, reminders and some good memories. *Curr. Opin. Immunol.* **23**: 228–233
- Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, Zentella A & Becker I (2010) CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e871
- Herwaldt BL (1999) Leishmaniasis. *Lancet* **354**: 1191–1199
- Herwaldt BL & Berman JD (1992) Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **46**: 296–306
- Ho L-P, Urban BC, Jones L, Ogg GS & McMichael AJ (2004) CD4(-)CD8alphaalpha subset of CD1d-restricted NKT cells controls T cell expansion. *J. Immunol.* **172**: 7350–7358
- Iniesta V, Gómez-Nieto LC & Corraliza I (2001) The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J. Exp. Med.* **193**: 777–784
- Inngjerdigen M, Kveberg L, Naper C & Vaage JT (2011) Natural killer cell subsets in man and rodents. *Tissue Antigens* **78**: 81–88
- Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, Nakayama T, Sakai T, Maekawa Y, Nakano Y, Zhang M, Zhang T, Nishitani M, Takashima M & Himeno K (2000) CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int. Immunol.* **12**: 1267–1274
- Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC & Kumar V (2004) Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J. Exp. Med.* **199**: 947–957
- Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, Reed SG, Netto

- EM, Tada MS & Franca TF (1987) Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis.* **156**: 73–83
- Jordan KA & Hunter CA (2010) Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp. Parasitol.* **126**: 318–325
- Joyee AG, Uzonna J & Yang X (2010) Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 alpha+ dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection. *J. Immunol.* **184**: 2095–2106
- Kabelitz D, Pohl T & Pechhold K (1995) T cell apoptosis triggered via the CD3/T cell receptor complex and alternative activation pathways. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **200**: 1–14
- Kaech SM, Wherry EJ & Ahmed R (2002) Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 251–262
- Van Kaer L (2007) NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 354–364
- Van Kaer L, Parekh VV & Wu L (2011) Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res.* **343**: 43–55
- Kannan K, Stewart RM, Bounds W, Carlsson SR, Fukuda M, Betzing KW & Holcombe RF (1996) Lysosome-associated membrane proteins h-LAMP1 (CD107a) and h-LAMP2 (CD107b) are activation-dependent cell surface glycoproteins in human peripheral blood mononuclear cells which mediate cell adhesion to vascular endothelium. *Cell. Immunol.* **171**: 10–19
- Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, Ueno H, Nakagawa R, Sato H, Kondo E, Koseki H & Taniguchi M (1997) CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science* **278**: 1626–1629
- Kaye P & Scott P (2011) Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat. Rev. Microbiol.* **9**: 604–615
- Kedzierski L (2011) Leishmaniasis. *Hum Vaccin* **7**: 1204–1214
- Kedzierski L, Sakthianandeswaren A, Curtis JM, Andrews PC, Junk PC & Kedzierska K (2009) Leishmaniasis: current treatment and prospects for new drugs and vaccines. *Curr. Med. Chem.* **16**: 599–614
- Keefe D, Shi L, Feske S, Massol R, Navarro F, Kirchhausen T & Lieberman J (2005) Perforin triggers a plasma membrane-repair response that facilitates CTL induction of apoptosis. *Immunity* **23**: 249–262
- Killick-Kendrick R (1999) The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin. Dermatol.* **17**: 279–289
- Kinjo Y, Wu D, Kim G, Xing G-W, Poles MA, Ho DD, Tsuji M, Kawahara K, Wong C-H & Kronenberg M (2005) Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells. *Nature* **434**: 520–525
- Klucar P, Barnes PF, Kong Y, Samten B, Tvinnereim A, Spallek R, Nepom GT, Singh M & Shams H (2008) Characterization of effector functions of human peptide-specific CD4+ T-cell clones for an intracellular pathogen. *Hum. Immunol.* **69**: 475–483
- Kos FJ & Engleman EG (1996) Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol. Today* **17**: 174–176
- Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, Janssen E & Hoebe

- K (2009) NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood* **113**: 6593–6602
- Kreider T, Anthony RM, Urban JF Jr & Gause WC (2007) Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr. Opin. Immunol.* **19**: 448–453
- Kronenberg M (2005) Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* **23**: 877–900
- Kropf P, Freudenberg MA, Modolell M, Price HP, Herath S, Antoniazzi S, Galanos C, Smith DF & Müller I (2004a) Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **72**: 1920–1928
- Kropf P, Freudenberg N, Kalis C, Modolell M, Herath S, Galanos C, Freudenberg M & Müller I (2004b) Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNcr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. *J. Leukoc. Biol.* **76**: 48–57
- Lainson R & Shaw J (1987) Evolution, classification and geographical distribution. In *The Leishmaniases in Biology and Medicine* pp 1–120. Londres - Academic Press: Peters, W.; Killick-Kendrick, R.
- Landau M, Srebrnik A & Brenner S (1996) Leishmaniasis recidivans mimicking lupus vulgaris. *Int. J. Dermatol.* **35**: 572–573
- Lanier LL (2001) On guard--activating NK cell receptors. *Nat. Immunol.* **2**: 23–27
- Lanier LL (2008) Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat. Immunol.* **9**: 495–502
- Lanier LL, Le AM, Civin CI, Loken MR & Phillips JH (1986) The relationship of CD16 (Leu-11) and Leu-19 (NKH-1) antigen expression on human peripheral blood NK cells and cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **136**: 4480–4486
- Lantz O & Bendelac A (1994) An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J. Exp. Med.* **180**: 1097–1106
- Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L & Flavell RA (2005) Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat. Immunol.* **6**: 600–607
- Laskay T, Röllinghoff M & Solbach W (1993) Natural killer cells participate in the early defense against *Leishmania major* infection in mice. *Eur. J. Immunol.* **23**: 2237–2241
- Laskay T, Diefenbach A, Röllinghoff M & Solbach W (1995) Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur. J. Immunol.* **25**: 2220–2227
- Lecoeur H, Février M, Garcia S, Rivière Y & Gougeon ML (2001) A novel flow cytometric assay for quantitation and multiparametric characterization of cell-mediated cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **253**: 177–187
- Lecoeur H, Ledru E, Prévost MC & Gougeon ML (1997) Strategies for phenotyping apoptotic peripheral human lymphocytes comparing ISNT, annexin-V and 7-AAD cytofluorometric staining methods. *J. Immunol. Methods* **209**: 111–123
- Lederman ER, Weld LH, Elyazar IRF, Von Sonnenburg F, Loutan L, Schwartz E & Keystone JS (2008) Dermatologic conditions of the ill returned traveler: an analysis

- from the GeoSentinel Surveillance Network. *Int. J. Infect. Dis.* **12**: 593–602
- Lee PT, Benlagha K, Teyton L & Bendelac A (2002) Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J. Exp. Med.* **195**: 637–641
- Van Leeuwen EMM, Remmerswaal EBM, Vossen MTM, Rowshani AT, Wertheim-van Dillen PME, Van Lier RAW & Ten Berge IJM (2004) Emergence of a CD4+CD28-granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J. Immunol.* **173**: 1834–1841
- Leite-de-Moraes MC, Herbelin A, Gouarin C, Koezuka Y, Schneider E & Dy M (2000) Fas/Fas ligand interactions promote activation-induced cell death of NK T lymphocytes. *J. Immunol.* **165**: 4367–4371
- Li Y, Ishii K, Hisaeda H, Hamano S, Zhang M, Nakanishi K, Yoshimoto T, Hemmi H, Takeda K, Akira S, Iwakura Y & Himeno K (2004) IL-18 gene therapy develops Th1-type immune responses in *Leishmania major*-infected BALB/c mice: is the effect mediated by the CpG signaling TLR9? *Gene Ther.* **11**: 941–948
- Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L & Akuffo H (2008) *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* **153**: 221–230
- Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, Schmetz C, Berg L & Akuffo H (2011) The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology*: 1–12
- Lima EB, Porto C, Motta JOC da & Sampaio RNR (2007) Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An Bras Dermatol* **82**: 111–124
- Lin H, Nieda M, Hutton JF, Rozenkov V & Nicol AJ (2006) Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations. *J. Leukoc. Biol.* **80**: 164–173
- Liu CC, Walsh CM & Young JD (1995) Perforin: structure and function. *Immunol. Today* **16**: 194–201
- Liu L, Chahroudi A, Silvestri G, Wernett ME, Kaiser WJ, Safrit JT, Komoriya A, Altman JD, Packard BZ & Feinberg MB (2002) Visualization and quantification of T cell-mediated cytotoxicity using cell-permeable fluorogenic caspase substrates. *Nat. Med.* **8**: 185–189
- Liu X, Taylor BJ, Sun G & Bosselut R (2005) Analyzing expression of perforin, Runx3, and Thpok genes during positive selection reveals activation of CD8-differentiation programs by MHC II-signaled thymocytes. *J. Immunol.* **175**: 4465–4474
- Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I & Trapani JA (2012) Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol.* **33**: 406–412
- Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E & Perussia B (2002) Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood* **99**: 1273–1281
- Lukacher AE, Morrison LA, Braciale VL, Malissen B & Braciale TJ (1985) Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restricted, influenza virus-specific T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* **162**: 171–187
- Luz ZMP, Silva AR da, Silva F de O, Caligiorne RB, Oliveira E & Rabello A (2009) Lesion aspirate culture for the diagnosis and isolation of *Leishmania spp.* from

- patients with cutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **104**: 62–66
- Ma CS, Deenick EK, Batten M & Tangye SG (2012) The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* **209**: 1241–1253
- Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A & Akuffo H (1998) Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect. Immun.* **66**: 2698–2704
- Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C & Carvalho EM (2002) Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* **12**: 449–451
- Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, Sousa RS, Talhari A, Penna G & Carvalho EM (2010) Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis* **4**: e912
- Maimone MM, Morrison LA, Braciale VL & Braciale TJ (1986) Features of target cell lysis by class I and class II MHC-restricted cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol.* **137**: 3639–3643
- Manna PP, Bharadwaj D, Bhattacharya S, Chakrabarti G, Basu D, Mallik KK & Bandyopadhyay S (1993) Impairment of natural killer cell activity in Indian kala-azar: restoration of activity by interleukin 2 but not by alpha or gamma interferon. *Infect. Immun.* **61**: 3565–3569
- Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S & Kaye PM (2008) Posttranscriptional regulation of Il10 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* **29**: 295–305
- Marques MJ, Volpini AC, Machado-Coelho GLL, Machado-Pinto J, Da Costa CA, Mayrink W, Genaro O & Romanha AJ (2006) Comparison of polymerase chain reaction with other laboratory methods for the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis: diagnosis of cutaneous leishmaniasis by polymerase chain reaction. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **54**: 37–43
- Marsden PD (1986) Mucosal leishmaniasis ('espundia' Escomel, 1911). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **80**: 859–876
- Marsden PD (1990) Mucocutaneous leishmaniasis. *BMJ* **301**: 656–657
- Marshall NB & Swain SL (2011) Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011**: 954602
- Matsuda JL, Gapin L, Fazilleau N, Warren K, Naidenko OV & Kronenberg M (2001) Natural killer T cells reactive to a single glycolipid exhibit a highly diverse T cell receptor beta repertoire and small clone size. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**: 12636–12641
- Mavilia L, Rossi R, Massi D, Difonzo EM, Campolmi P & Cappugi P (2002) Leishmaniasis recidiva cutis: an unusual two steps recurrence. *Int. J. Dermatol.* **41**: 506–507
- Mendes-Aguiar C de O, Gomes-Silva A, Nunes E Jr, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto M de P, Bertho AL & Da-Cruz AM (2009) The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by *Leishmania* antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* **157**: 377–384
- Mendonça MG, De Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML & Abath FGC

- (2004) Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J. Infect. Dis.* **189**: 1018–1023
- Mendonça SC, Coutinho SG, Amendoeira RR, Marzochi MC & Pirmez C (1986) Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. *Clin. Exp. Immunol.* **64**: 269–276
- Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, Fernandes O, Barral-Netto M & Barral A (2002) Frequency of Infection of *Lutzomyia Phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **97**: 185–188
- Mollenhauer HH, Morré DJ & Rowe LD (1990) Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochim. Biophys. Acta* **1031**: 225–246
- Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, Rugeles MT, Atkinson MA, Landay AL & Wilson SB (2007) Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* **122**: 1–14
- Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R & Moretta L (2002) What is a natural killer cell? *Nat. Immunol.* **3**: 6–8
- Morgado FN, Schubach A, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho RB, Valete-Rosalino CM, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, Palmeiro MR & Conceição-Silva F (2010) Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **32**: 285–295
- Motyka B, Korbitt G, Pinkoski MJ, Heibin JA, Caputo A, Hobman M, Barry M, Shostak I, Sawchuk T, Holmes CF, Gaudie J & Bleackley RC (2000) Mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor is a death receptor for granzyme B during cytotoxic T cell-induced apoptosis. *Cell* **103**: 491–500
- De Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C & De Oliveira CI (2005) Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* **73**: 5827–5834
- Müller I, Kropf P, Louis JA & Milon G (1994) Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*. *Infect. Immun.* **62**: 2575–2581
- Namekawa T, Wagner UG, Goronzy JJ & Weyand CM (1998) Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. *Arthritis Rheum.* **41**: 2108–2116
- Nathan C (2006) Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**: 173–182
- Nauseef WM (2007) How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunol. Rev.* **219**: 88–102
- Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, Iparraguirre A, Cavanagh LL, Triccas JA, Beverley SM, Scott P & Weninger W (2008) Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.* **4**: e1000222
- Niiya H, Sakai I, Lei J, Azuma T, Uchida N, Yakushijin Y, Hato T, Fujita S &

- Yasukawa M (2005) Differential regulation of perforin expression in human CD4+ and CD8+ cytotoxic T lymphocytes. *Exp. Hematol.* **33**: 811–818
- Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P & Beschin A (2004) Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.* **20**: 126–133
- Norris PJ, Sumaroka M, Brander C, Moffett HF, Boswell SL, Nguyen T, Sykulev Y, Walker BD & Rosenberg ES (2001) Multiple effector functions mediated by human immunodeficiency virus-specific CD4(+) T-cell clones. *J. Virol.* **75**: 9771–9779
- Novais FO, Santiago RC, Báfica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A & De Oliveira CI (2009) Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J. Immunol.* **183**: 8088–8098
- O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, Feighery C, Porcelli SA & Doherty DG (2011) Distinct and Overlapping Effector Functions of Expanded Human CD4+, CD8 $\alpha$ + and CD4-CD8 $\alpha$ - Invariant Natural Killer T Cells. *PLoS One* **6**: Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3236218/> [Accessed January 11, 2013]
- De Oliveira CI, Báfica A, Oliveira F, Favali CBF, Correa T, Freitas LAR, Nascimento E, Costa JM & Barral A (2003) Clinical utility of polymerase chain reaction-based detection of *Leishmania* in the diagnosis of American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.* **37**: e149–153
- Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC & Andrade CA (2011) Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* **118**: 87–96
- De Oliveira-Neto MP & Mattos M da S (2006a) An alternative antimonial schedule to be used in cutaneous leishmaniasis when high doses of antimony are undesirable. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**: 323–326
- De Oliveira-Neto MP & Mattos M da S (2006b) Successful therapeutic response of resistant cases of mucocutaneous leishmaniasis to a very low dose of antimony. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **39**: 376–378
- De Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, Gonçalves-Costa SC, Brahín LR, Menezes CR & Pirmez C (2000) American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int. J. Dermatol.* **39**: 506–514
- Oliveira-Neto MP, Mattos M, Pirmez C, Fernandes O, Gonçalves-Costa SC, Souza CF & Grimaldi G Jr (2000) Mucosal leishmaniasis ('espundia') responsive to low dose of N-methyl glucamine (Glucantime) in Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **42**: 321–325
- Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC & Pirmez C (1997) Treatment of American cutaneous leishmaniasis: a comparison between low dosage (5 mg/kg/day) and high dosage (20 mg/kg/day) antimony regimens. *Pathol. Biol.* **45**: 496–499
- Orange JS & Ballas ZK (2006) Natural killer cells in human health and disease. *Clin. Immunol.* **118**: 1–10
- Page LJ, Darmon AJ, Uellner R & Griffiths GM (1998) L is for lytic granules: lysosomes that kill. *Biochim. Biophys. Acta* **1401**: 146–156

- Palmer EM, Holbrook BC, Arimilli S, Parks GD & Alexander-Miller MA (2010) IFN $\gamma$ -producing, virus-specific CD8<sup>+</sup> effector cells acquire the ability to produce IL-10 as a result of entry into the infected lung environment. *Virology* **404**: 225–230
- Patz JA, Graczyk TK, Geller N & Vittor AY (2000) Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* **30**: 1395–1405
- Pereira LIA, Dorta ML, Pereira AJCS, Bastos RP, Oliveira MAP, Pinto SA, Galdino H Jr, Mayrink W, Barcelos W, Toledo VPCP, Lima GMCA & Ribeiro-Dias F (2009) Increase of NK cells and proinflammatory monocytes are associated with the clinical improvement of diffuse cutaneous leishmaniasis after immunochemotherapy with BCG/*Leishmania* antigens. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**: 378–383
- Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN & Sacks D (2008) In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* **321**: 970–974
- Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, Slot JW & Geuze HJ (1991) Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J. Exp. Med.* **173**: 1099–1109
- Pipkin ME, Ljutic B, Cruz-Guilloty F, Nouzova M, Rao A, Zúñiga-Pflücker JC & Lichtenheld MG (2007) Chromosome transfer activates and delineates a locus control region for perforin. *Immunity* **26**: 29–41
- Pipkin ME, Rao A & Lichtenheld MG (2010) The transcriptional control of the perforin locus. *Immunol. Rev.* **235**: 55–72
- Pirmez C, Da Silva Trajano V, Paes-Oliveira Neto M, da-Cruz AM, Gonçalves-da-Costa SC, Catanho M, Degraive W & Fernandes O (1999) Use of PCR in diagnosis of human american tegumentary leishmaniasis in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 1819–1823
- Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceição-Silva F & Modlin RL (1993) Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* **91**: 1390–1395
- Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB & Balk SP (1993) Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>  $\alpha/\beta$  T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR  $\alpha$  chain. *J. Exp. Med.* **178**: 1–16
- Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U & Bogdan C (2011) *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect. Immun.* **79**: 2699–2708
- Quezada SA, Simpson TR, Peggs KS, Merghoub T, Vider J, Fan X, Blasberg R, Yagita H, Muranski P, Antony PA, Restifo NP & Allison JP (2010) Tumor-reactive CD4<sup>+</sup> T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. *J. Exp. Med.* **207**: 637–650
- Rabello E (1913) Caso de Leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol* **2**:
- Rai AK, Thakur CP, Seth T & Mitra DK (2011) Early activated Th-1 type and dominantly diverse natural killer T (CD3<sup>+</sup>CD161<sup>+</sup>V $\alpha$ 24<sup>-</sup>) cells in bone marrow among visceral leishmaniasis patients. *Int. J. Parasitol.* **41**: 1069–1077
- Rangel EF & Lainson R (2009) Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias*

do Instituto Oswaldo Cruz **104**: 937–954

Rebêlo JMM, Assunção Júnior AN, Silva O & Moraes JLP (2010) Occurrence of sand flies (Diptera, Psychodidae) in leishmaniasis foci in an ecotourism area around the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* **26**: 195–198

Reed SG (1996) Diagnosis of leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* **14**: 471–478

Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B & Brooker S (2007) Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **7**: 581–596

Resnick M, Roguel N, Bercovier H, Enk C, Frankenburg S & Kedar E (1988) Lysis of murine macrophages infected with intracellular pathogens by interleukin 2-activated killer (LAK) cells in vitro. *Cell. Immunol.* **113**: 214–219

Rey L (2008) Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais 4<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan

Van Rhijn I, Young DC, Im JS, Levery SB, Illarionov PA, Besra GS, Porcelli SA, Gumperz J, Cheng T-Y & Moody DB (2004) CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 13578–13583

Rhost S, Sedimbi S, Kadri N & Cardell SL (2012) Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease. *Scand. J. Immunol.* **76**: 246–255

Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O & Carvalho EM (1998) Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **31**: 143–148

Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MCA, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G & DosReis GA (2007) Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J. Immunol.* **179**: 3988–3994

Ritchie DS, Hermans IF, Lumsden JM, Scanga CB, Roberts JM, Yang J, Kemp RA & Ronchese F (2000) Dendritic cell elimination as an assay of cytotoxic T lymphocyte activity *in vivo*. *J. Immunol. Methods* **246**: 109–117

Robert-Gangneux F, Drogoul A-S, Rostan O, Piquet-Pellorce C, Cayon J, Lisbonne M, Herbelin A, Gascan H, Guiguen C, Samson M & Gangneux J-P (2012) Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. *PLoS ONE* **7**: e33413

Robertson MJ (2002) Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J. Leukoc. Biol.* **71**: 173–183

Robertson MJ & Ritz J (1990) Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood* **76**: 2421–2438

Romero GA, Guerra MV, Paes MG & Macêdo VO (2001) Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**: 456–465

Romero GAS, De la Glória Orge Orge M, De Farias Guerra MV, Paes MG, De Oliveira Macêdo V & De Carvalho EM (2005) Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* or *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Brazil. *Acta Trop.* **93**: 49–56

Ruiz JH & Becker I (2007) CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite*

*Immunol.* **29**: 671–678

Russo DM, Chakrabarti P & Higgins AY (1999) *Leishmania*: naive human T cells sensitized with promastigote antigen and IL-12 develop into potent Th1 and CD8(+) cytotoxic effectors. *Exp. Parasitol.* **93**: 161–170

Salaiza-Suazo N, Volkow P, Tamayo R, Moll H, Gillitzer R, Pérez-Torres A, Pérez-Montfort R, Domínguez JD, Velasco-Castrejón O, Crippa M & Becker I (1999) Treatment of two patients with diffuse cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* modifies the immunohistological profile but not the disease outcome. *Trop. Med. Int. Health* **4**: 801–811

Sandberg JK, Fast NM & Nixon DF (2001) Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* **167**: 181–187

Santiago MA, Luca PM, Bertho AL, Azeredo-Coutinho RB & Coutinho SG (2000) Detection of intracytoplasmic cytokines by flow cytometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **95**: 401–402

Santos C da S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, De Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M & Brodskyn CI (2013) CD8(+) Granzyme B(+)-Mediated Tissue Injury Versus CD4(+)IFN $\gamma$ (+)-Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.*

Dos Santos GPL, Sanavria A, Marzochi MC de A, Dos Santos EGOB, Silva VL, Pacheco R da S, Mouta-Confort E, Espíndola CB, De Souza MB, Ponte CS, Da Conceição NF & De Andrade MV (2005) [Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District, Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **38**: 161–166

Santrich C, Segura I, Arias AL & Saravia NG (1990) Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **42**: 51–55

Saravia NG, Holguín AF, McMahon-Pratt D & D'Alessandro A (1985) Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **34**: 714–720

Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A & Dellagi K (1999) Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin. Exp. Immunol.* **116**: 127–132

Sauer H, Pratsch L, Tschopp J, Bhakdi S & Peters R (1991) Functional size of complement and perforin pores compared by confocal laser scanning microscopy and fluorescence microphotolysis. *Biochim. Biophys. Acta* **1063**: 137–146

Savill J (2000) Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press. Res.* **23**: 173–174

Scarisbrick JJ, Chiodini PL, Watson J, Moody A, Armstrong M, Lockwood D, Bryceson A & Vega-López F (2006) Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. *Travel Med Infect Dis* **4**: 14–21

Scharton TM & Scott P (1993) Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J. Exp. Med.* **178**: 567–577

Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, Glesby MJ &

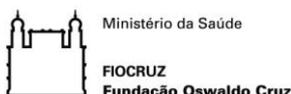
- Carvalho EM (2012) IFN- $\gamma$  Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1947
- Schönian G, Nasereddin A, Dinse N, Schweynoch C, Schallig HDFH, Presber W & Jaffe CL (2003) PCR diagnosis and characterization of *Leishmania* in local and imported clinical samples. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **47**: 349–358
- Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, De Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Araújo ML, Souza WJ, Haddad F, Perez M de A, Pacheco RS, Momen H, Coutinho SG, De Almeida Marzochi MC, Marzochi KB & Da Costa SC (2001) Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**: 987–996
- Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G Jr & Fernandes O (1998) Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J. Infect. Dis.* **178**: 911–914
- Scott P (1991) IFN- $\gamma$  modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. *J. Immunol.* **147**: 3149–3155
- Seino K-I & Taniguchi M (2005) Functionally distinct NKT cell subsets and subtypes. *J. Exp. Med.* **202**: 1623–1626
- Sharma U & Singh S (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* **45**: 255–272
- Shaw JJ & Lainson R (1975) Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **69**: 323–335
- Sheehy ME, McDermott AB, Furlan SN, Klenerman P & Nixon DF (2001) A novel technique for the fluorometric assessment of T lymphocyte antigen specific lysis. *J. Immunol. Methods* **249**: 99–110
- Silveira FT, Lainson R, De Castro Gomes CM, Laurenti MD & Corbett CEP (2009) Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* **31**: 423–431
- Silverstein RL & Febbraio M (1992) Identification of lysosome-associated membrane protein-2 as an activation-dependent platelet surface glycoprotein. *Blood* **80**: 1470–1475
- SINAN S de I de A de N, Ministério da Saúde (2012) SINAN. Available at: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb> [Accessed January 26, 2013]
- Stäger S & Rafati S (2012) CD8(+) T cells in *leishmania* infections: friends or foes? *Front Immunol* **3**: 5
- Stanley AC, Zhou Y, Amante FH, Randall LM, Haque A, Pellicci DG, Hill GR, Smyth MJ, Godfrey DI & Engwerda CR (2008) Activation of invariant NKT cells exacerbates experimental visceral leishmaniasis. *PLoS Pathog.* **4**: e1000028
- Stefanidou MP, Antoniou M, Koutsopoulos AV, Neofytou YT, Krasagakis K, Krüger-Krasagakis S, Tselentis Y & Tosca AD (2008) A rare case of leishmaniasis recidiva cutis evolving for 31 years caused by *Leishmania tropica*. *Int. J. Dermatol.* **47**: 588–589
- Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, Ganz T,

- Thoma-Uszynski S, Melián A, Bogdan C, Porcelli SA, Bloom BR, Krensky AM & Modlin RL (1998) An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* **282**: 121–125
- Sun J, Madan R, Karp CL & Braciale TJ (2009) Effector T cells control lung inflammation during acute influenza virus infection by producing IL-10. *Nat. Med.* **15**: 277–284
- Sundar S & Chakravarty J (2013) Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother* **14**: 53–63
- Suni MA, Maino VC & Maecker HT (2005) Ex vivo analysis of T-cell function. *Curr. Opin. Immunol.* **17**: 434–440
- SVS S de V em S, Ministério da Saúde (2010) Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Available at: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2\\_lta\\_2ed.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf) [Accessed November 13, 2012]
- Takahashi T, Chiba S, Nieda M, Azuma T, Ishihara S, Shibata Y, Juji T & Hirai H (2002) Cutting edge: analysis of human V alpha 24+CD8+ NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells. *J. Immunol.* **168**: 3140–3144
- Taniguchi M, Seino K-I & Nakayama T (2003) The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **4**: 1164–1165
- Thedrez A, De Lalla C, Allain S, Zaccagnino L, Sidobre S, Garavaglia C, Borsellino G, Dellabona P, Bonneville M, Scotet E & Casorati G (2007) CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4+ invariant NKT cells. *Blood* **110**: 251–258
- Tite JP & Janeway CA Jr (1984) Cloned helper T cells can kill B lymphoma cells in the presence of specific antigen: Ia restriction and cognate vs. noncognate interactions in cytotoxicity. *Eur. J. Immunol.* **14**: 878–886
- Toledo VP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MA, Costa CA, Genaro O, Pinto JA & Afonso LC (2001) Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **96**: 89–98
- Trandem K, Zhao J, Fleming E & Perlman S (2011) Highly activated cytotoxic CD8 T cells express protective IL-10 at the peak of coronavirus-induced encephalitis. *J. Immunol.* **186**: 3642–3652
- Trapani JA & Smyth MJ (2002) Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* **2**: 735–747
- Trapani JA, Sutton VR, Thia KYT, Li YQ, Froelich CJ, Jans DA, Sandrin MS & Browne KA (2003) A clathrin/dynamin- and mannose-6-phosphate receptor-independent pathway for granzyme B-induced cell death. *J. Cell Biol.* **160**: 223–233
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr & Carvalho EM (2002) Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J. Infect. Dis.* **186**: 1829–1834
- De Veer MJ, Curtis JM, Baldwin TM, DiDonato JA, Sexton A, McConville MJ, Handman E & Schofield L (2003) MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and Toll-like receptor 2 signaling. *Eur. J. Immunol.* **33**: 2822–2831

- Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJS, Oliveira MP, Rutowitsch MS & Da-Cruz AM (2008) Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int. J. Dermatol.* **47**: 926–932
- Vitelli-Avelar DM, Sathler-Avelar R, Massara RL, Borges JD, Lage PS, Lana M, Teixeira-Carvalho A, Dias JCP, Elói-Santos SM & Martins-Filho OA (2006) Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin. Exp. Immunol.* **145**: 81–92
- Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T & Ugolini S (2008) Functions of natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**: 503–510
- Voll RE, Herrmann M, Roth EA, Stach C, Kalden JR & Girkontaite I (1997) Immunosuppressive effects of apoptotic cells. *Nature* **390**: 350–351
- Voskoboinik I, Thia M-C, Fletcher J, Ciccone A, Browne K, Smyth MJ & Trapani JA (2005) Calcium-dependent plasma membrane binding and cell lysis by perforin are mediated through its C2 domain: A critical role for aspartate residues 429, 435, 483, and 485 but not 491. *J. Biol. Chem.* **280**: 8426–8434
- Wagner H, Starzinski-Powitz A, Jung H & Röllinghoff M (1977) Induction of I region-restricted hapten-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol.* **119**: 1365–1368
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M & Murphy KM (2006) Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* **24**: 677–688
- WHO (2010) Control of leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee. Available at: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_949\\_eng.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf)
- WHO | World Health Organization WHO Available at: <http://www.who.int/en/> [Accessed November 16, 2012]
- Wieth C, Debus A, Mohrs M, Steinkasserer A, Lutz M & Gessner A (2008) Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* **180**: 4371–4381
- Williams NS & Engelhard VH (1996) Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin- rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J. Immunol.* **156**: 153–159
- Xie Y, Akpınarlı A, Maris C, Hipkiss EL, Lane M, Kwon E-KM, Muranski P, Restifo NP & Antony PA (2010) Naive tumor-specific CD4(+) T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma. *J. Exp. Med.* **207**: 651–667
- Yasukawa M, Ohminami H, Arai J, Kasahara Y, Ishida Y & Fujita S (2000) Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans. *Blood* **95**: 2352–2355
- Yokoyama WM (2008a) Mistaken notions about natural killer cells. *Nat. Immunol.* **9**: 481–485
- Yokoyama WM (2008b) Inhibitory receptors signal activation. *Immunity* **29**: 515–517
- Zaunders JJ, Dyer WB, Wang B, Munier ML, Miranda-Saksena M, Newton R, Moore J, Mackay CR, Cooper DA, Saksena NK & Kelleher AD (2004) Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. *Blood* **103**: 2238–2247

- Zhang N & Bevan MJ (2011) CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* **35**: 161–168
- Zheng CF, Ma LL, Jones GJ, Gill MJ, Krensky AM, Kubes P & Mody CH (2007) Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. *Blood* **109**: 2049–2057
- Zhu J & Paul WE (2008) CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**: 1557–1569
- Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A & Lanier LL (2004) Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J. Immunol.* **173**: 3716–3724
- Zloza A & Al-Harhi L (2006) Multiple populations of T lymphocytes are distinguished by the level of CD4 and CD8 coexpression and require individual consideration. *J. Leukoc. Biol.* **79**: 4–6

## ANEXO I



---

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Voluntário

---

INSTITUIÇÃO: Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ, Lab. Imunoparasitologia, Pav. Leônidas Deane, sala 408-A, Av Brasil 4365, Manguinhos. Rio de Janeiro, RJ.

TÍTULO DO PROJETO: Perfil Funcional de Células CD8+ na Imunopatogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana

Pesquisador Responsável: Álvaro Luiz Bertho dos Santos, Doutor, Biomédico, Pesquisador Titular - Em caso de dúvida entre em contato pelo tel. 3865.8126 cel. 21 91590719

Executores do Projeto: Raquel Ferraz  
Clarissa Cunha

Nome do Voluntário: \_\_\_\_\_

Eu declaro que aceito participar como voluntário da investigação científica que está sendo realizada pelo Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ com o objetivo de se estudar os mecanismos que levam o organismo humano a se curar da leishmaniose. Fui informado de que este estudo não me beneficiará diretamente, mas poderá auxiliar os estudos para a obtenção de melhores esquemas de tratamento e de uma vacina contra a doença.

Minha colaboração será submeter-me aos seguintes procedimentos a serem realizados por profissionais de saúde especializados:

1. Exame clínico;
2. Teste de Montenegro. Este consiste na aplicação de 0,1 ml de uma solução contendo parasitos mortos pelo fenol a 0,4%. A leitura é feita em 48 h.
3. Coleta de 4 tubos de sangue (aproximadamente 40 mL) através de punção na veia do braço.
4. Biópsia da lesão antes do início da terapia.

Esclarecimento sobre os procedimentos e inconvenientes:

O teste de Montenegro é utilizado rotineiramente para o diagnóstico da Leishmaniose e sua positividade indica a exposição ao parasito. No entanto, **o teste não deve** ser aplicado nos indivíduos alérgicos a mertiolate. A reação positiva se acompanha de vermelhidão e endurecimento restritos à área de aplicação do teste. Reações mais intensas como inflamação, ulceração na pele ou mesmo febre são bastante raras.. Os possíveis desconfortos, se ocorrerem, são relacionados a problemas ocorridos durante a punção venosa local, como extravasamento de sangue que leva a dor e hematoma, mas que regredem em cerca de 3 a 5 dias. A biópsia da lesão será realizada com *punch* de 6 mm, após anestesia local com Lidocaína. O volume de sangue e o tamanho da biópsia obtidos não causam danos ou riscos ao organismo, não havendo assim necessidade de indenizações para qualquer um dos problemas citados. Os investigadores deverão, a qualquer momento, esclarecer minhas dúvidas sobre a doença, a utilização do material biológico retirado do meu organismo e os resultados obtidos com o estudo. Estes resultados poderão ser divulgados na forma de comunicação científica, mas não será permitida a minha identificação. Autorizo, ainda, eventual armazenamento da amostra biológica para utilização futura. Fui informado, também, que posso me retirar e meu consentimento em qualquer fase da pesquisa sem penalidade alguma e sem prejuízo ao meu cuidado.

Declaro estar ciente do teor deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, decidindo-me a participar da investigação proposta. Este documento ficará arquivado no Laboratório de Imunoparasitologia do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, ficando Eu de posse de uma cópia.

Voluntário: \_\_\_\_\_

Assinatura

Investigador: \_\_\_\_\_

Assinatura