

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA PARASITÁRIA

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE POR LINFÓCITOS T CD8⁺ E POPULAÇÕES
CELULARES CITOTÓXICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

RAQUEL FERRAZ NOGUEIRA

Rio de Janeiro
2015

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação *Strictu sensu* em Biologia Celular e Molecular

RAQUEL FERRAZ NOGUEIRA

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE POR LINFÓCITOS T CD8⁺ E POPULAÇÕES
CELULARES CITOTÓXICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia e Patogenia

Orientador: Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos

Co-orientadora: Dra. Alda Maria Da-Cruz

Rio de Janeiro
2015

Ferraz, Raquel .

PERFIL DA RESPOSTA IMUNE POR LINFÓCITOS T CD8+ E POPULAÇÕES CELULARES CITOTÓXICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR LEISHMANIA BRAZILIENSIS / Raquel Ferraz. - Rio de janeiro, 2015.

126 f.

Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2015.

Orientador: Álvaro Luiz Bertho dos Santos.

Co-orientador: Alda Maria da Cruz.

Bibliografia: f. 104-126

1. Leishmaniose cutânea. 2. Linfócitos T duplo negativos. 3. citotoxicidade. 4. Citometria de Fluxo. 5. Células NKT. I. Título.

Esta tese foi realizada no Laboratório de Imunoparasitologia □
Pavilhão Leônidas Deane □ Instituto Oswaldo Cruz (IOC) □ Fundação
Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), sob orientação do Dr. Álvaro Luiz Bertho
dos Santos e co-orientação da Dra. Alda Maria da Cruz.

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação *Strictu sensu* em Biologia Celular e Molecular

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNE POR LINFÓCITOS T CD8⁺ E POPULAÇÕES
CELULARES CITOTÓXICAS NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR
*LEISHMANIA BRAZILIENSIS***

Autora: Raquel Ferraz Nogueira

Orientador: Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos

Co-orientadora: Dra. Alda Maria Da Cruz

Banca Examinadora:

Dr. Renato Porrozzì de Almeida
Instituto Oswaldo Cruz □ Fiocruz, RJ

Dra. Andrea Henriques Pons
Instituto Oswaldo Cruz □ Fiocruz, RJ

Dr. Kenneth John Gollob
Instituto de Ensino e Pesquisa, Hospital Santa Casa-Belo Horizonte

Dr. Adriano Gomes da Silva
Instituto Nacional de Infectologia □ Fiocruz, RJ

Dr. Alberto Félix Antônio Nóbrega
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2015

Aos meus pais, Lourival Nogueira
Filho e Fabia Ribeiro Ferraz, minhas
maiores fontes de amor e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos, meu orientador desde a iniciação científica e grande influência na minha vida acadêmica. Tenho enorme gratidão pela oportunidade concedida, pelo incentivo e a confiança que alimentaram minha dedicação a este trabalho.

À Dra. Alda Maria da Cruz pela oportunidade de realizar este trabalho sob sua orientação e por todas as contribuições científicas ao longo destes anos.

À Clarissa Ferreira Cunha, que eu nem sei por onde começar a agradecer. A amizade e a bondade dela contribuíram diariamente para a evolução do meu trabalho. Obrigada por toda a sua contribuição científica, fosse nos experimentos ou nos questionamentos. Sou muito grata pelo seu companheirismo desde o "happy hour" até as noites de laboratório.

Ao Alessandro Marins, por ter me ajudado sempre que precisei, e por compartilhar seu conhecimento em citometria de fluxo, foi um ganho enorme.

Ao Dr. Álvaro, À Clarissa e ao Alessandro agradeço ainda a convivência cordial e descontraída que fizeram do dia-a-dia no laboratório um ambiente agradável de trabalho.

À Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC, Núcleo de Purificação Celular (Sorting). Agradeço os serviços prestados e a porta aberta para que eu pudesse aprimorar os meus conhecimentos e participar como integrante da mesma. Faço um agradecimento especial aqui para o Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos e à Thereza Benévolo pela oportunidade e pela confiança.

Aos meus pais, Lourival Nogueira Filho e Fabia Ribeiro Ferraz, que sempre me apoiam e me incentivam em todas as minhas decisões. A confiança e o amor de vocês me impulsionam todos os dias.

À minha irmã, Bianca Ferraz Nogueira, pela amizade, pelo companheirismo, por ter escutado tanto as minhas teorias e questionamentos imunológicos.

A todos que fazem, ou fizeram, parte do laboratório de imunoparasitologia (LIP) do IOC, pesquisadores, alunos, técnicos e secretária. Agradeço a convivência cordial e a cooperação.

À Dra. Léa Cysne, pelo carinho comigo e com as *Leishmanias* em cultivo.

Ao Dr. Juan Camilo Sánchez-Arcila, amigo mais antigo do LIP, desde a iniciação científica contribuiu com discussões imunológicas, acadêmicas, sociais e tecnológicas.

À Alinne Renzetti, pela ajuda com as amostras de sangue.

Agradeço a toda a equipe do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses e do Ambulatório do INI, especialmente o Dr. Armando Schubach por ter aberto o caminho para que eu pudesse trabalhar com amostras de pacientes de leishmaniose; a Dra. Maria Inês Pimentel e o Dr.

Marcelo Lyra, fundamentais no atendimento, diagnóstico e acompanhamento dos pacientes. Agradeço também a disponibilidade em ceder às informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes. Por fim agradeço à Michelle Moreira por toda organização que me garantiu o acesso as amostras.

Ao Dr. Adriano Gomes da Silva, por todo conhecimento imunológico compartilhado e por cada anticorpo cedido.

Agradeço aos integrantes do laboratório interdisciplinar de pesquisas médicas (LIP-MED), que sempre estão dispostos a ajudar e contribuíram muito para o aprimoramento deste trabalho.

À Dra. Tatiana Pereira da Silva, por ter me ajudado com o *Cytometric Bead Array* com toda a disponibilidade e atenção possíveis.

À Dra. Carmen Beatriz Giacoia Grip, que tanto acredita no meu trabalho, seja como doutoranda, seja na citometria, e pelas palavras de apoio sempre.

Ao Dr. André Dias, por me ceder os anticorpos que eu precisava na reta final.

A todos os amigos que fiz nestes 8 anos de IOC, que com certeza contribuíram para o meu processo de formação, fosse compartilhando conhecimento, dúvidas, alegrias e tristezas da vida acadêmica.

À Plataforma de Citometria de Fluxo do PDTIS, à Dra Íris Marins Peixoto; e à Plataforma de Citometria de Fluxo do IOC, à Dra. Andrea Henriques Pons.

À pós graduação em Biologia Parasitária do Instituto Oswaldo Cruz (IOC) e sua equipe. Agradeço em especial o financiamento de passagens aéreas para que eu pudesse participar de congressos nacionais e internacionais e à Rita Gomes pela atenção e pelo secretariado muito eficiente.

Ao Dr. Renato POrrozzi por ter aceitado ter revisão esta tese e aos integrantes da Banca examinadora que aceitaram o convite para a avaliação do presente estudo.

À Fundação Oswaldo Cruz, meu endereço mais fixo no Rio de Janeiro.

À CAPES pela concessão da bolsa de estudos.

□ You can't always get what you want,
but if you try sometimes,
you just might find you get what you need □

(Mick Jagger e Keith Richards)

RESUMO

A evolução clínica da leishmaniose cutânea (LC) depende da interação entre a espécie de *Leishmania* infectante e a resposta imune celular do hospedeiro, a qual ocorre através das funções efectoras dos linfócitos T. Embora os linfócitos T CD8⁺ sejam importantes nessa resposta, seu papel na LC ainda é controverso. Sua função citotóxica tem sido relacionada tanto à proteção e regressão da lesão, quanto à manutenção da infecção e dano tecidual. No entanto, outras populações celulares, como as células *natural killer* (NK), células *natural killer-T* (NKT), linfócitos T CD4⁺, linfócitos T duplo-negativos (DN) e linfócitos T duplo-positivos (DP) apresentam um potencial citotóxico, e pouco é conhecido a respeito da função destas células na imunopatogenia da LC. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi investigar o papel dos linfócitos T CD8⁺ efetores e da citotoxicidade, a fim de traçar um perfil imunológico na doença ativa e no desenvolvimento para a cura clínica de pacientes de LC. A partir de amostras de sangue de pacientes infectados por *L. braziliensis*, obtidas antes, durante e após o tratamento com Glucantime®, foi avaliado, através de ensaios *ex vivo* e *in vitro*, se os linfócitos T CD8⁺ efetores e a apoptose destas células estavam envolvidos no processo de cura. Também foram avaliados se os linfócitos T CD8⁺ e as células NK, NKT, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T DN, obtidos de pacientes antes, durante e após a terapia antimonial, produziram perforina e IFN- γ quando estimulados *in vitro* com antígenos de *L. braziliensis*. Ainda, avaliamos a distribuição e o comprometimento destas populações celulares numa resposta citotóxica e a concentração de granzima B, IFN- γ e TNF nas lesões. A citometria de fluxo foi a técnica utilizada em todos os ensaios. Nossos resultados reforçam o papel crucial dos linfócitos T CD8⁺ na imunopatogenia da LC, mostrando que a indução de apoptose destas células, a indução de células efectoras, a modulação da citotoxicidade e a indução da produção de IFN- γ são eventos críticos no desenvolvimento da resposta protetora. A citotoxicidade mostrou-se como um fenômeno imunomodulador associado ao dano tecidual. As células NKT e os linfócitos DN parecem contribuir para a intensidade da atividade citotóxica observada nas lesões de LC, enquanto os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos parecem exercer pouca influência. Por fim, enquanto a evolução para a cura envolve a moderação da resposta citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ e das células NKT, os linfócitos T DN citotóxicos apresentam baixas frequências nos pacientes que apresentam cura clínica, sugerindo que um processo de inibição destes linfócitos T DN esteja associado à cura. Este trabalho abre caminho para uma visão mais ampla da citotoxicidade como fenômeno imunomodulador, o qual pode ser exercido por populações distintas na LC e mostra a importância destas células como promissores alvos para estudos terapêuticos e vacinais.

Palavras-Chave: Leishmaniose cutânea, Linfócitos T CD8⁺, apoptose, citotoxicidade, *Leishmania braziliensis*, pacientes durante o tratamento, citometria de fluxo, linfócitos T duplo-negativos, células NKT.

ABSTRACT

The clinical course of cutaneous Leishmaniasis (CL) depends on the interaction between the infective *Leishmania* specie and cellular immune response, which occurs through T lymphocyte-effector functions. Although CD8⁺ T lymphocytes are important in this response, there is a controversy about their role. The cytotoxic function of these cells have been related to both protection and healing of lesion; and to maintenance of infection and tissue damage. Besides, other cells such as natural killer (NK), T natural killer (NKT), CD4⁺ T lymphocytes, double-negative T lymphocytes (DN), and double-positive T lymphocytes (DP) have a cytotoxic potential, and little is known about their function on immunopatogenesis of CL. Thus, our aim was to investigate the role of effector CD8⁺ T-lymphocyte and other cytotoxic-potentially cells in the cytotoxicity and to identify an immunological profile in active disease and on the development to clinical cure of CL patient. Based on blood samples from patients infected with *L. braziliensis*, obtained before, during and after Glucantime therapy, we evaluated, through *ex vivo* and *in vitro* assays, whether effector CD8⁺ T-lymphocyte and apoptosis were committed to healing process. We also evaluated if CD8⁺ T lymphocytes, NK and NKT cells, CD4⁺ T lymphocytes, DP and DN T lymphocytes obtained from patients before, during and after treatment produce perforin and IFN- γ when stimulated with *L. braziliensis* antigens. Furthermore, we evaluated the distribution and commitment of these cell subsets in a cytotoxic immune response and the granzyme B, IFN- γ and TNF concentrations at lesion environment. All assays were performed using flow cytometry. Our results reinforces the key role of CD8⁺ T lymphocytes in immunopatogenesis of CL, showing that the high frequencies of apoptotic-CD8⁺ T lymphocytes, the induction of effector cells, the modulation of cytotoxicity and the induction of IFN- γ production are critical events in the development of protective immune response. The NKT cells and DN T lymphocytes seems to contribute to the intensity of cytotoxic activity observed in CL lesion, while the CD8⁺ T lymphocytes seems to exert a poor influency. Finally, while the progression to healing involve the modulation of cytotoxic response of CD8⁺ T lymphocytes and of NKT cells, clinically cured patients showed low frequencies of cytotoxic DN cells, suggesting a inhibitory process associated to healing. This work open mind for a broader view of cytotoxicity as an immunomodulatory phenomenon, which could be played by distinct cell populations in CL and highlights the importance of these cell populations as promising target for therapeutic and vaccine studies.

Key words: Cutaneous Leishmaniasis, CD8⁺ T lymphocytes, apoptosis, cytotoxicity, *Leishmania braziliensis*, patients during treatment, flow cytometry, double-negative T lymphocytes, NKT cells.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-AAD □ 7-Aminoactinomicina D

AcMo □ Anticorpos Monoclonais

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

AIDS □ do inglês *Acquired Immune Deficiency Syndrome* (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida)

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

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

CBA □ do inglês *Cytometric Bead Array*

CCR7 □ do inglês *Cysteine-Cysteine Chemokine receptor type 7* (receptor de quimiocina cisteína-cisteína tipo 7)

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

CEP □ Comitê de Ética em Pesquisa

CMSP □ Células Mononucleares de Sangue Periférico

CONEP □ Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

DN □ Duplo-negativas

DP □ Duplo-positivas

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

Fiocruz □ Fundação Oswaldo Cruz

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

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

IDRM □ Intradermorreação de Montenegro

IFN- γ □ Interferon-gamma

IL □ Interleucina

INI □ Instituto Nacional de Infectologia

IOC □ Instituto Oswaldo Cruz

IS □ Indivíduos Sadios

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

LbAg □ antígenos de *L. braziliensis*

LC □ Leishmaniose Cutânea

LM □ Leishmaniose Mucosa

LT □ Leishmaniose Tegumentar

LTA □ Leishmaniose Tegumentar Americana

LV □ Leishmaniose Visceral

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

MS □ Ministério da Saúde

NK □ células Natural Killer

NKT □ células Natural Killer T

NO □ do inglês *Nitric Oxide* (Óxido Nítrico)

OMS - Organização Mundial da Saúde

PAT □ Pacientes Antes do Tratamento

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

PDT □ Pacientes Durante o Tratamento

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

PPT □ Pacientes Pós Tratados

RPL □ Resposta Proliferativa de Linfócitos

rpm □ Rotações por Minuto

TCM □ Células T de Memória Central

TCR □ do inglês *T-Cell Receptor* (receptor de células T)

TGF- β □ do inglês *Transforming Growth Factor Beta* (Fator de transformação do crescimento beta)

Th □ do inglês *T helper* (linfócitos T auxiliares)

TME □ Células T de Memória Efetora

TNF- α □ do inglês *Tumor Necrosis Factor alpha* (fator de necrose tumoral alfa)

Treg □ células T reguladoras

V β □ cadeia variável beta

LISTA DE FIGURAS

Figura 4: Características das lesões de leishmaniose cutânea na evolução para a cura clínica

Figura 5.1: Frequência de células NKT, NK, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T duplo-negativos (DN) produtores de perforina cultivados por 24h na ausência (*Background* □ BG; barra lisa) e na presença de antígenos de *Leishmania braziliensis* (LbAg; barra hachuriada).....

Figura 5.2: Frequência de células produtoras de perforina em resposta aos antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-específicas)

Figura 5.3 :Análise de correlação entre o percentual de células CD107a⁺ em lesão de PAT e o percentual de CMSP de PAT produtoras de perforina em resposta aos antígenos de *L. braziliensis*

Figura 5.4: Frequência de células produtoras de Interferona-gama (IFN-G) em resposta aos antígenos de *Leishmania braziliensis* (Ag-específicas).....

5.2.2 Avaliação da Frequência de Células Responderas aos LbAg Produtoras de Perforina	53
5.2.3 Correlação entre a Frequência de Células Citotóxicas na Lesão e a Frequência de Células Citotóxicas obtidas do Sangue Periférico antes do Tratamento.....	57
5.2.4 Avaliação da Frequência de Células Responderas aos LbAg Produtoras de Interferon-gama.....	59
5.3 3ª parte	61
ARTIGO II: Double negative CD4 ⁻ CD8 ⁻ T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic populations in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> (submetido).....	62
6. DISCUSSÃO	82
7. CONCLUSÕES	102
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	103

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia das Leishmanioses

As leishmanioses constituem um grupo de doenças causadas por protozoários de diferentes espécies do gênero *Leishmania*, os quais são transmitidos de forma vetorial por flebotomíneos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as leishmanioses estão entre as seis doenças tropicais de maior importância para a saúde pública e estão inseridas no grupo das doenças negligenciadas. A doença está amplamente distribuída, atingindo 98 países, principalmente aqueles situados em regiões tropicais e subtropicais, totalizando uma incidência anual estimada entre 0,7 e 1 milhão de casos de leishmaniose tegumentar Americana (LTA) e entre 200 e 400 mil casos de leishmaniose visceral (LV) (Alvar *et al.*, 2012; SVS, 2010).

O homem e outros mamíferos, como os cães e roedores silvestres, representam os hospedeiros vertebrados da *Leishmania*, enquanto as fêmeas (hematófagas) de flebotomíneos são os vetores da doença. Estes insetos (Ordem: Díptera; Família: Psychodidae) pertencem à subfamília Phlebotominae e podem ser do gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo ou do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo (Lainson, 1983; Rangel and Lainson, 2009; Rey, 2008). Apesar das 500 espécies de flebotomíneos já identificadas, somente 40 participam do ciclo da *Leishmania* como vetores (Grimaldi & Tesh, 1993; Rocha et al, 2010). Poucas espécies são responsáveis pela transmissão dos agentes infecciosos das leishmanioses, indicando que as espécies de *Leishmania* parecem ter preferência por espécies particulares de flebotomíneos (Rangel & Lainson, 2009). As leishmanioses caracterizam-se por apresentar um amplo espectro de manifestações clínicas que podem ser divididas em LV e leishmaniose tegumentar (LT), de acordo com o tropismo do parasito (Lainson 1983; Grimaldi & Tesh 1993).

Atualmente a leishmaniose é considerada uma antropozoonose. Entretanto, historicamente esta doença constitui uma zoonose típica, com reservatórios silvestres e vetores bem definidos, enquanto os humanos assumem o papel de hospedeiros acidentais. A forma tegumentar da doença já foi descrita em animais como cães, gatos e cavalos (Aguilar *et al.*, 1989; Mancianti, 2004). Como as altas taxas de infecção nestes animais acompanham o aumento das infecções no ambiente doméstico, acredita-se que os mesmos atuem como reservatórios desta doença (Reithiger & Davis, 1999). Além disso, com o crescimento populacional, a urbanização, as mudanças ambientais, a devastação de florestas e a adaptação do vetor ao ambiente peridomiciliar, o homem passou a fazer parte do ciclo. Assim, a infecção tem ocorrido em áreas peridomiciliares

e até domiciliares, onde a adaptação do vetor permite a transmissão do parasito para animais domésticos e para o homem, fazendo com que a probabilidade da infecção seja semelhante àquela observada para a população de risco, não importando faixa etária, sexo ou atividade profissional (SVS, 2010).

A forma tegumentar é observada desde o Sul dos Estados Unidos (Texas) até o norte da Argentina, alcançando maior importância no Peru e no Brasil, onde apresenta ampla distribuição por todo o território nacional. No Brasil, no período entre 1985 e 2005 foi verificada uma média anual de aproximadamente 30.000 casos registrados (SVS, 2010).

1.2 Leishmaniose Tegumentar Americana

O termo leishmaniose tegumentar refere-se à infecção por *Leishmania* que afeta a pele e mucosas. A leishmaniose tegumentar do Novo Mundo ou a leishmaniose tegumentar Americana (LTA) é uma doença que pode apresentar diferentes desfechos clínicos, sendo o grau de acometimento tecidual diretamente relacionado aos mecanismos patogênicos resultantes da interação entre o parasito, o vetor e o hospedeiro. Sendo assim, as múltiplas formas de apresentação clínica dependem da espécie de *Leishmania*; da resposta imune e das características genéticas do hospedeiro humano; e da espécie do inseto vetor envolvida na transmissão do parasito (Kevric *et al.*, 2015).

O Brasil é um dos dez países com maior incidência de leishmaniose cutânea (LC), sendo a maioria dos casos causada pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, incluindo também a *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (Alvar *et al.*, 2012; Da-Cruz and Pirmez, 2005). No entanto, a ocorrência de casos causados por espécies como a *L. naiffi*, tem aumentado na região Amazônica (Figueira *et al.*, 2014). Com a expansão geográfica da LTA, durante a década de 1980, a doença foi assinalada em 19 estados brasileiros e, em 2003, foi confirmada a autoctonia nos 27 estados do país. Apesar da ampla dispersão no território nacional há intensa concentração de casos em determinadas áreas, principalmente nas regiões Norte e Nordeste, enquanto que em outras, os casos apresentam-se isolados. A doença é incidente na Amazônia; na Bahia; em Minas Gerais, na região do Triângulo Mineiro e nas regiões próximas à bacia do rio Mucuri e do rio Doce; em São Paulo, na região sul que abrange a área de Mata Atlântica; bem como nos estados do Espírito Santo; Mato Grosso do Sul e Goiás. No estado do Rio de Janeiro, o maior número de casos ocorre nos municípios de

Mesquita; Paraty; Ilha Grande; Paracambi e na própria capital, onde a *L.braziliensis* é a espécie responsável pela grande maioria dos casos (de Oliveira-Neto *et al.* 2000; Da-Cruz & Pirmez 2005; Vieira-Gonçalves *et al.* 2008; Rangel & Lainson 2009).

A LTA apresenta um amplo espectro de manifestações clínicas, sendo o grau de acometimento tecidual diretamente relacionado aos mecanismos patogênicos que se estabelecem em decorrência da espécie do parasito e da interação entre o parasito e o hospedeiro humano.

1.3 LTA causada por *Leishmania braziliensis*

A maioria dos pacientes de LTA apresenta a forma cutânea da doença e cerca de 5% dos pacientes de LC, causada pela *L. braziliensis*, evoluem para a forma mucosa. Esta é uma forma mais grave, caracterizada por lesões destrutivas na cavidade oral e nasofaríngea, que ocorre, sobretudo, na infecção por *L. braziliensis*. Em geral, as lesões de leishmaniose mucosa (LM) são mais resistentes ao tratamento, exigindo doses maiores de drogas e recidivando com mais frequência que a forma cutânea (Amato *et al.*, 2009; Reithinger *et al.*, 2007). A infecção por *L.braziliensis* também pode ocorrer de forma assintomática ou subclínica, mostrando que as populações expostas ao parasito podem ser infectadas sem desenvolver a doença (Amato *et al.*, 2008; de Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Guerra *et al.*, 2015; Jirmanus *et al.*, 2012; Marsden, 1986; Souza *et al.*, 1992).

A LC é caracterizada pelo desenvolvimento de lesão ulcerada única ou lesões múltiplas na pele, restritas ao(s) local(ais) de inoculação, geralmente em regiões do corpo expostas ao inseto vetor e apresentam baixa carga parasitária. A lesão aparece com um eritema e avança para uma pápula ou nódulo com bordas elevadas, formando uma úlcera centralizada (Reithinger *et al.*, 2007; Silveira *et al.*, 2009). A doença evolui de forma crônica e usualmente a lesão cicatriza quando os pacientes recebem a terapia recomendada pelo Ministério da Saúde, podendo ainda ser curada de forma espontânea (Marsden *et al.* 1984; SVS 2010).

1.4 Diagnóstico e Tratamento da Leishmaniose Cutânea

O diagnóstico da LC é clínico, epidemiológico e laboratorial. É baseado na aparência e localização das lesões e na epidemiologia, principalmente quando o

paciente tem procedência de área endêmica ou visitou áreas onde há ou houve casos de leishmaniose.

O padrão ouro de diagnóstico da leishmaniose é realizado através de métodos diretos de isolamento e identificação do parasito (SVS, 2010). Atualmente, o método molecular mais utilizado para a detecção de *Leishmania* e distinção das diferentes espécies, é a reação em cadeia de polimerase (polymerase chain reaction - PCR) através da amplificação de segmentos gênicos específicos do protozoário (Graça *et al.*, 2012).

A intradermoreação de Montenegro (IDRM) é uma forma indireta de diagnóstico laboratorial baseado na mensuração da resposta imune celular com a injeção intradérmica de antígenos do parasito. O resultado é avaliado entre 48 e 72 horas, sendo consideradas positivas as reações com área de endureção maior ou igual a 5mm. Pacientes de LM usualmente apresentam resposta exacerbada, com vários centímetros de endureção, enquanto nos pacientes com a forma difusa a reação costuma ser negativa e nos pacientes de LC a resposta é moderada. Este método indireto complementa o diagnóstico clínico-epidemiológico (SVS, 2010; Vega-López, 2003).

Há seis décadas os antimoniais pentavalentes têm sido recomendados como a droga de primeira escolha no tratamento das leishmanioses, sendo que no Brasil o mais utilizado é o antimonial pentavalente N-metil glucamina (Glucantime[®] Rhodia) (Herwaldt, 1999; Oliveira *et al.*, 2011). Este medicamento é preconizado pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LTA e pode ser administrado via intramuscular ou intravenosa. Em casos de contra indicação, resistência ou intolerância, utiliza-se como opções terapêuticas de segunda linha o isotionato de pentamididina ou a anfotericina B. Para o tratamento da LC recomenda-se a administração de 10-20mg/Kg/dia do antimonial pentavalente durante 20 dias, e para LM 20mg/Kg/dia durante 30 dias. Caso haja lesão cutânea persistente ou reativação após 90 dias de acompanhamento clínico, uma nova série do tratamento deve ser repetida (SVS, 2010).

O antimônio pentavalente é uma droga leishmanicida e, para exercer sua função anti-*Leishmania*, sabe-se que esta deve alcançar as amastigotas intracelulares e que o medicamento exerce efeitos sobre a resposta imunológica. No entanto, os mecanismos de ação do antimônio não foram completamente elucidados (Ouellette *et al.*, 2004; Santos *et al.*, 2008).

Na maioria dos casos o tratamento com antimoniais é efetivo, apresentando taxa de cura entre 60 e 100%, embora faltem estudos controlados utilizando diferentes posologias das drogas empregas. No Rio de Janeiro, o número de indivíduos que não respondem ao tratamento é reduzido, o que parece estar relacionado a susceptibilidade da *L.braziliensis* encontrada neste Estado ao medicamento (Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007). No Instituto Nacional de Infectologia (INI) da Fiocruz, onde os pacientes estudados no presente trabalho são atendidos e acompanhados clinicamente, a taxa de insucesso no primeiro esquema terapêutico foi de 11% e menos de 2% do total de casos preencheram os critérios de falha terapêutica do Ministério da Saúde entre os anos 1999 e 2009 (Nascimento, 2009). Em outras regiões do Brasil, os percentuais de falha terapêutica relatados podem chegar a 47% (Machado *et al.* 2002a; Rojas *et al.* 2006).

A eficácia do tratamento esbarra nas desvantagens do medicamento devido principalmente a sua alta toxicidade, podendo desencadear efeitos adversos como náusea, dor abdominal, pancreatite, distúrbios intestinais, cefaléia, alterações cardíacas e hepáticas, e insuficiência renal aguda; além da necessidade de aplicações diárias por pelo menos 20 dias. Por conta destas desvantagens, na década de 90 foram realizados alguns ensaios clínicos utilizando baixas doses de antimônio, os quais foram eficazes e levaram à cura clínica da doença, até mesmo das formas mais graves e mais difíceis de serem tratadas (Oliveira Neto *et al.* 1996; Oliveira-Neto *et al.* 1997; Oliveira *et al.* 2011). Sendo assim, tem-se buscado esquemas terapêuticos alternativos e doses menores para o uso de antimoniais com o objetivo de obter resultados satisfatórios, em casos de resistência à dosagem recomendada, e de minimizar os efeitos colaterais (de Oliveira-Neto and Mattos, 2006; Oliveira-Neto *et al.*, 2000). Recentemente foi demonstrado que pacientes provenientes do Estado do Rio de Janeiro, após 10 anos do tratamento com baixas doses de antimônio permaneciam curados, sem episódios de recidiva ou acometimento secundário de mucosas (Vieira-Gonçalves *et al.*, 2015). Embora os regimes terapêuticos alternativos, com baixa dose de antimônio ainda não façam parte das orientações do MS, o Novo Manual de Leishmaniose apresenta uma nota recomendando a dose baixa para situações específicas.

1.5 A Cura na Leishmaniose Cutânea

Por conta da remissão das lesões após o tratamento específico nem sempre ser definitiva e pela persistência do parasito após a cicatrização da lesão, o critério de

cura na LTA é apenas clínico (Mendonça *et al.*, 2004; Schubach *et al.*, 1998). Os pacientes de LC são considerados clinicamente curados quando há reepitelização total das lesões ulceradas ou não ulceradas e regressão total do infiltrado e do eritema até três meses após o tratamento.

O processo de cicatrização é lento e se caracteriza pela persistência do infiltrado inflamatório e de parasitos no tecido por longos períodos após a cura (Morgado *et al.*, 2010; Schubach *et al.*, 1998). As lesões cicatrizadas em geral são lisas, brilhantes e finas com dimensões que correspondem aos limites da úlcera (Marsden *et al.*, 1984; SVS, 2010).

A persistência parasitária após cicatrização da lesão permite que o sistema imune seja constantemente estimulado mantendo assim o *pool* de células efetoras específicas aos antígenos de *Leishmania* (Coutinho *et al.*, 2002; Gollob *et al.*, 2005; Okwor and Uzonna, 2008; Schubach *et al.*, 1998). Entretanto, alguns casos evoluem para reativação da infecção, geralmente com novas lesões nos bordos da cicatriz, conhecida como leishmaniose recidiva cútis (Oliveira-Neto *et al.*, 1998). De fato, apenas 5% dos indivíduos curados de LC desenvolvem uma nova lesão no futuro (Jirmanus *et al.*, 2012), indicando que na LT a maioria dos indivíduos adquirem imunidade duradoura após a cicatrização da lesão. O tempo após a cicatrização da lesão parece ser fundamental para a ocorrência de um abrandamento das atividades imunes efetoras específicas ao parasito, refletindo uma condição de equilíbrio entre parasito e hospedeiro (Gomes-Silva *et al.*, 2014).

1.6 A Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos durante o repasto sanguíneo do flebotomíneo que regurgita as formas promastigotas na derme do hospedeiro. Após a invasão do parasito, o sistema imune inato da pele induz o recrutamento de células inflamatórias para o sítio da lesão, como neutrófilos, macrófagos e células dendríticas necessários para a contenção do parasito, controlando sua disseminação, assim como uma ativação da resposta imune adaptativa (Maurer *et al.*, 2009). O estabelecimento, a evolução e a gravidade da doença são determinados pelo equilíbrio entre a resposta imune do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasito, assim como sua adaptação ao meio.

Em estudos em modelo murino, a evolução de lesão tecidual pode ser dividida em duas fases: uma fase inicial, chamada de silenciosa, durante a qual ocorre o pico da carga parasitária na derme com ausência de lesão tecidual ou qualquer alteração histopatológica. A segunda fase corresponde ao desenvolvimento da doença e se caracteriza por intensa inflamação do tecido infectado e formação da lesão, dando a noção de que o dano tecidual é mediado por uma resposta imune inflamatória e não pela presença do parasito por si só (Belkaid *et al.* 2000; Naik *et al.* 2012). Sabe-se que o curso da doença é determinado pela natureza e magnitude da resposta imune orquestrada por linfócitos T específicos, as quais exercem um papel central no controle da replicação parasitária e na destruição tecidual (Silveira *et al.* 2009; Nylén & Eidsmo 2012).

A ativação de linfócitos T específicos aos antígenos de *Leishmania* resulta na geração de células efetoras e persistência de linfócitos T de memória, os quais parecem ser responsáveis pela proteção contra reativações ou reinfecções. Neste contexto, a distribuição e as características funcionais de células efetoras que participam da patogênese e do processo de cura clínica parecem ter relevante papel no estabelecimento da doença e controle da infecção. Os mecanismos envolvidos na geração e manutenção das células envolvidas na resposta anti-*Leishmania* ainda não estão completamente elucidados e as dificuldades em definir os mecanismos protetores e imunopatológicos são as principais razões por ainda não existir uma vacina disponível eficaz, assim como esquemas terapêuticos alternativos bem estabelecidos. Assim, a identificação dos fenômenos imunológicos associados à cura e à proteção continua sendo um desafio para a geração de candidatos vacinais para a leishmaniose humana e estudos estratégicos contribuiriam para uma melhor compreensão do tema. Particularmente, a LC causada por *L. braziliensis*, cujo prognóstico é benigno, representa um importante alvo de estudo da resposta imune associada ao controle da infecção, visto que a maioria dos pacientes apresenta cura clínica após o tratamento.

Apesar de sabermos que a resposta imune pode ser um fator essencial para o desfecho clínico da LC, ainda não estão definidos quais seriam os fatores que levam os pacientes a curarem espontaneamente ou após a terapia, o que leva os indivíduos a desenvolverem a doença ou permanecerem assintomáticos, e o que leva os pacientes a se manterem curados, evoluírem para recidivas ou formas mucosas. Muito conhecimento já foi produzido quanto a estas questões, no entanto ainda não estão

totalmente definidos quais os fatores que definem a dicotomia entre patogênese e cura.

No modelo murino de LC produzida por *L.major*, foi bem estabelecido que a resposta imune do tipo Th1, com predominância de IFN- γ e IL-12, leva à cura das lesões e proteção contra reinfecções, enquanto a resposta do tipo Th2, com predominância de IL-4, IL-5 e IL-10, produz doença grave (Locksley *et al.* 1991; Sacks & Noben-Trauth 2002). Já em humanos, a infecção benigna induz uma resposta imune caracterizada por um perfil misto de produção destas citocinas. Na LC há predominância da resposta do tipo 1, com maior ativação de macrófagos e produção de Óxido Nítrico (NO), mas que também pode levar ao dano tecidual; enquanto que a resposta do tipo 2 é importante para regular os efeitos inflamatórios podendo também favorecer a replicação do parasito (Coutinho *et al.*, 2002; Pirmez *et al.*, 1993; Santiago *et al.*, 2000a). A dificuldade de resposta ao tratamento, como no caso da leishmaniose cutânea difusa estaria relacionada ao desencadeamento de uma resposta imune predominante do tipo 2, enquanto na forma mucosa da doença as duas respostas estariam exacerbadas e seriam responsáveis pela gravidade da lesão (Da-Cruz *et al.* 1996; Brandonisio *et al.* 2001; Bacellar *et al.* 2002). Mais recentemente foi demonstrado que, em humanos, a evolução para a cura não depende apenas do domínio de um dos perfis de resposta. Além do balanço entre estes dois perfis, seria necessário a ação de mecanismos imunomodulatórios para se alcançar o equilíbrio na relação parasito-hospedeiro e conseqüentemente a cura da doença (Gomes-Silva *et al.*, 2007). Tal balanço parece ser mediado, entre outros fatores, pelas células T regulatórias (Treg), produtoras de IL-10 e TGF- β . Estas células podem contribuir para o agravamento da doença inibindo a destruição dos parasitos pelos macrófagos, os quais não responderiam aos estímulos de IFN- γ e TNF- α embora na LC, a presença de células Treg venha sendo associada a uma resposta imune controlada (Ding *et al.* 1990; Saha *et al.* 2007).

Além do paradigma Th1/Th2, já foi descrita uma população de linfócitos T CD4⁺ produtores de IL-17, denominada Th17, cuja função efetora está ligada à ação pró-inflamatória (Korn *et al.*, 2007). Embora esta citocina seja associada ao aumento do infiltrado inflamatório nas lesões de LC e LM, ainda existem poucos relatos sobre o papel desta citocina na LTA, e a possível associação entre a presença das células Th17 e o desenvolvimento de diferentes formas clínicas ainda precisa ser esclarecida (Bacellar *et al.* 2009; Anderson *et al.* 2009).

Os linfócitos T CD4⁺ são os principais produtores de IFN- γ (Santos *et al.*, 2013) o qual, juntamente com o TNF- α é responsável por ativar macrófagos e controlar a proliferação parasitária nas fases iniciais da infecção por *Leishmania*. Entretanto, se esta resposta inflamatória for muito intensa pode contribuir para um dano tecidual (Bacellar *et al.*, 2002). Apesar dos linfócitos T CD4⁺ desempenharem um papel crucial na resposta imune anti-*Leishmania*, através do reconhecimento de antígenos e produção de citocinas, as funções dos linfócitos T CD8⁺ também influenciam na evolução da LC, embora o papel destas células na LC seja controverso.

1.7 Os Linfócitos T CD8⁺ na Leishmaniose Cutânea

Os linfócitos T CD8⁺ desempenham um papel fundamental na resposta imune da LC (Brodszyn *et al.*, 1997; Da-Cruz *et al.*, 2005, 2002; Faria *et al.*, 2009; Hernández-Ruiz *et al.*, 2010a; Ruiz and Becker, 2007). Alguns autores demonstraram que os linfócitos T CD8⁺ poderiam contribuir tanto para um dano tecidual como para a destruição parasitária (Bousoffara *et al.*, 2004; Cardoso *et al.*, 2015; Esterre *et al.*, 1992; Faria *et al.*, 2009; Nylén and Eidsmo, 2012). Em estudos em modelo murino, foi sugerido que os linfócitos T CD8⁺ tenham um papel protetor (Belkaid *et al.*, 2002; Uzonna *et al.*, 2004). Trabalhos do nosso grupo sugerem que os linfócitos T CD8⁺ destruam macrófagos infectados levando à resolução da infecção (S. G. Coutinho *et al.*, 1998; da Conceição-Silva *et al.*, 1994; Da-Cruz *et al.*, 1994). Além disso, em lesões de LC de pacientes que evoluíram para a cura espontânea foi detectado um percentual mais baixo de linfócitos T CD8⁺ em apoptose, e portanto com maior sobrevivência, do que as lesões tratadas com antimonial, sugerindo assim uma participação destas células na cura clínica, com provável ação citotóxica ante as células infectadas (Bertho *et al.*, 2000). Por outro lado, foi observado que pacientes de LM apresentam atividade citotóxica mais elevada de linfócitos T CD8⁺, específicos à *Leishmania*, contra macrófagos infectados quando comparados com os pacientes de LC (Brodszyn *et al.*, 1997). Embora a importância das células T CD8⁺ na resposta imune na infecção por *Leishmania* tenha sido evidenciada nestes estudos, há uma controvérsia em relação a função protetora ou deletéria destas células (Barral-Netto *et al.* 1995; Toledo *et al.* 2001; Coutinho *et al.* 2002; Nylén & Eidsmo 2012; Cardoso *et al.* 2015).

Os linfócitos T CD8⁺ reconhecem pequenos peptídeos através do Receptor de Células T (TCR) que interage com o Complexo Maior de Histocompatibilidade do tipo I (MHC-I) nas células apresentadoras de antígeno (APC). Este reconhecimento permite

que as células se diferenciem e exerçam suas funções efetoras. Neste sentido, nosso grupo investigou se havia clones de linfócitos T CD8⁺ com cadeia variável $V_{\alpha 2}$ do TCR ($V_{\alpha 2}$) específicos que estariam envolvidos na resposta imune da LC. Neste trabalho nós sugerimos que uma modulação dos linfócitos T CD8⁺ expressando $V_{\alpha 2}$ estaria relacionada com o dano tecidual, enquanto os linfócitos T CD8⁺ que expressam $V_{\alpha 12}$ ou $V_{\alpha 22}$ seriam aqueles clones envolvidos em uma resposta efetora de pacientes que evoluíram para a cura após a terapia antimonial, corroborando o papel desta população na evolução para a cura (Ferraz *et al.*, 2015).

Compreender o desencadeamento das funções efetoras dos linfócitos T CD8⁺ é um processo complexo e parece ser o caminho para estabelecer os parâmetros imunológicos associados ao seu papel (ou aos seus papéis) na LC. Alguns autores observaram que a participação dos linfócitos T CD8⁺ como produtores de IFN- γ estava associada à resolução da infecção (Pompeu *et al.* 2001; Da-Cruz *et al.* 2002b; Nateghi Rostami *et al.* 2010), e que grandes quantidades de IFN- γ produzida pelas células CD8⁺ logo após a infecção eliminava a maioria dos parasitos antes do desenvolvimento da lesão (Bertholet *et al.*, 2005). Além disso os linfócitos T CD8⁺ também teriam um papel modulador sobre os linfócitos T CD4⁺ que estaria envolvido no processo de cura da leishmaniose, indicando que o equilíbrio entre estas células configura uma etapa importante para o processo de controle da infecção e cicatrização da lesão (Da-Cruz *et al.* 2005^a; Brelaz-de-Castro *et al.* 2012). Outros autores argumentam que estas células participam do estabelecimento e progressão da doença, principalmente através de mecanismos citotóxicos (Barral-Netto *et al.*, 1995; Brodskyn *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2013).

O papel dos linfócitos T CD8⁺ na LTA não está completamente definido, indicando uma necessidade de esclarecimento quanto a participação das funções efetoras destas células no estabelecimento da doença e no processo de cura.

Em relação à citotoxicidade, é importante ressaltar que nos estudos mencionados anteriormente, os linfócitos T CD8⁺ foram estudados como uma população de células citotóxicas clássicas e associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune antígeno específica. No entanto, outras populações celulares como as células natural killer (NK), que é classicamente citotóxica poderia influenciar o desenvolvimento da doença ou da cura da LC através deste fenômeno.

1.8 O Estudo da Citotoxicidade na Leishmaniose Cutânea

Enquanto os perfis de produção de citocinas vêm sendo bastante explorados nos estudos em LTA, o papel da citotoxicidade nesta doença ainda não está completamente definido e tem sido associado tanto ao controle de células infectadas como à destruição tecidual, principalmente por linfócitos T CD8⁺ (Machado *et al.*, 2002; Bousoffara *et al.*, 2004; Faria *et al.*, 2009; Santos *et al.*, 2013). A citotoxicidade é um mecanismo efetor que pode ser exercido por linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ CD8⁺ (duplo positivos, DP), T CD4⁻CD8⁻ (duplo negativos, DN) e T CD4⁺, além de células *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT) (Matsumoto *et al.*, 1991; Ruiz & Becker, 2007; Brown, 2010; Overgaard *et al.*, 2015). Estas células citotóxicas, quando ativadas, passam a exercer suas funções através de dois mecanismos: pela expressão de FasL (CD95L), que induz a trimerização do receptor Fas (CD95) nas células-alvo; e principalmente pela exocitose de grânulos líticos (granzima e perforina). Ambos os mecanismos necessitam de contato célula-célula e induzem a apoptose nas células-alvo através da ativação de caspases (Trapani & Smyth, 2002).

As células NK são conhecidas pela sua habilidade em lisar diretamente células que expressam fenótipo de superfície alterado, principalmente em infecções virais, podendo atuar nas leishmanioses. Na LC humana, estas células podem ser ativadas através da interação com células mielóides e através de citocinas estimulatórias como IL-2 e IL-18. Além da sua habilidade citotóxica estas células também são produtoras de citocina como IFN- γ e TNF- α , contribuindo para o desenvolvimento da resposta por linfócitos T CD4⁺ do tipo 1 (Bogdan, 2012). Alguns estudos sugerem um papel protetor das células NK através da lise de promastigotas extracelulares e de macrófagos infectados (Stenger *et al.* 1998; Aranha *et al.* 2005; Lieke *et al.* 2011). Entretanto, já foi sugerido que as células NK citotóxicas também podem contribuir para a exacerbação das lesões de LC (Machado *et al.*, 2002b).

As células NKT representam uma linhagem de células T que medeiam a imunidade contra tumores e viroses e previnem a doença auto imune (Berzins and Ritchie, 2014). Os estudos da distribuição e das funções das células NKT na LC são raros e realizados predominantemente em modelo murino ou em infecção humana por *L. major*. Sendo assim, pouco se sabe a respeito do papel destas células na LC causada por *L. braziliensis*. Em modelo murino de LC, foi demonstrado que as células NKT inibem a expansão do parasito e direcionam a resposta imune de acordo com a produção de citocinas (Stenger *et al.* 1998; Ishikawa *et al.* 2000; Joyee *et al.* 2010; Lieke

et al. 2011). Entretanto, o papel da citotoxicidade por células NKT na LC humana ainda não foi demonstrado.

A subpopulação citotóxica de linfócitos T CD4⁺ apresenta relevância imunológica especialmente em tumores e em algumas doenças infecciosas (Brown, 2010). Embora esta população tenha sido descrita há mais de trinta anos, tanto em humanos quanto em nos modelos murinos, tais relatos eram isolados e geralmente associados a longos períodos de cultura, tendo sido considerado por alguns autores como artefato (Fleischer, 1984; Lukacher *et al.*, 1985; Maimone *et al.*, 1986; Wagner *et al.*, 1977). Atualmente, sabe-se que os linfócitos T CD4⁺ são capazes de exercerem papel citotóxico, com a habilidade de matar diretamente células infectadas, principalmente durante infecções virais por Epstein Barr vírus, HIV e dengue (Brown, 2010; Gagnon *et al.*, 1999; Haigh *et al.*, 2008; Zaunders *et al.*, 2004). Sendo assim, além do papel como linfócito T *helper*, os linfócitos T CD4⁺ poderiam direcionar a resposta imune na LC através da citotoxicidade? Esta pergunta também cabe para outra população de linfócitos T, que tem um papel imunomodulador na LC humana, que são as células T DN. Estas células representam uma população minoritária de linfócitos T periféricos, são células altamente ativadas e que reconhecem antígenos apresentados pelas clássicas moléculas de MHC classe I e de classe II, além da molécula CD1 (Gollob *et al.*, 2008 e 2014).

Outra população de linfócitos T com potencial papel citotóxico são as células T duplo-positivas (DP), as quais tem sido mais estudadas em infecções virais e em câncer, apresentando também um papel regulatório (citotóxico) na prevenção de doença auto imune. As células DP já foram encontradas em órgãos periféricos e na pele, porém não foram encontradas em sangue periférico. Já foi sugerido que estas células seriam tímócitos que teriam deixado o timo prematuramente. Posteriormente foi mostrado que as células T DP periféricas perdem a expressão de marcadores tímicos, indicando que mesmo expressando CD4 e CD8 estas células existem nos órgãos periféricos como populações maduras, ainda que em baixa frequência (Parel *et al.*, 2007; Eljaafari *et al.*, 2013; Overgaard *et al.*, 2015). O papel destas células na resposta imune contra parasitos ainda é pouco explorado e a frequência e função das mesmas na LC ainda não foi descrita.

Todas essas populações potencialmente citotóxicas compartilham a mesma via de citotoxicidade, por exocitose de grânulos líticos pré-formados. Através desta via, os grânulos líticos, perforina e granzima, são armazenados em vesículas de bicamada

lipídica contendo em sua parte interna proteínas de membrana associada a lisossomo (LAMP), entre elas o CD107a (LAMP-1). Esta vesícula se funde com a membrana plasmática no momento da exocitose mobilizando o CD107a para a superfície celular, indicando haver uma degranulação a contento. Este fenômeno tem sido explorado no estudo da citotoxicidade (Betts *et al.*, 2004; Aktas *et al.*, 2009; Zaritskaya *et al.*, 2010), além da quantificação de perforina e granzima, exercida pelas diferentes populações citotóxicas em potencial (Colmenares *et al.* 2003; Henriques-Pons *et al.* 2004; van Leeuwen *et al.* 2004; Faria *et al.* 2009; Donskoi *et al.* 2011; Hodge *et al.* 2012).

Embora um vasto conhecimento tenha sido produzido a respeito da resposta imune desenvolvida durante a fase ativa da LTA, algumas lacunas ainda precisam ser preenchidas. Assim, um estudo quanto ao papel da citotoxicidade, como fenômeno imunomodulador, exercido por diferentes populações celulares, contribuiria para um entendimento mais amplo acerca dos fenômenos envolvidos na resposta imunológica nesta enfermidade. Além disso, pouco se sabe sobre o perfil imunológico desenvolvido no processo de cura clínica e estabelecido após a mesma, visto que pouco trabalhos enfatizam esta fase clínica da doença ou incluem pacientes durante a terapia.

1.9 A apoptose de linfócitos T na Leishmaniose Cutânea

A apoptose é um processo de morte comprometido com a manutenção da homeostase, responsável pela renovação, maturação e seleção do repertório de linfócitos, assim como com a remoção de células infectadas ou auto-reativas. A apoptose de linfócitos está envolvida nos processos fundamentais que regulam o sistema imune, atuando como um mecanismo capaz de controlar o curso da resposta imune celular (Kerr *et al.* 1972; Krammer 2000).

A indução e a inibição da apoptose de células hospedeiras tem um importante papel nas infecções parasitárias, podendo estar diretamente relacionadas com o controle e a eliminação dos parasitos (Guillermo *et al.*, 2009). Diversos estudos vêm demonstrando que a exacerbação ou inibição da apoptose de determinadas populações celulares estariam relacionadas ao agravamento ou à cura de doenças como o câncer (Debatin *et al.* 1993; Debatin 2009); a AIDS (Gougeon & Montagnier 1993; Sloand *et al.* 1997) e as leishmanioses (Das *et al.* 1999; Shaha 2006; Hernández-Ruiz *et al.* 2010b; Lüder *et al.* 2010). Tem sido observado níveis aumentados de apoptose de linfócitos T durante as infecções por protozoários intracelulares como *Trypanosoma cruzi* (Lopes & DosReis 1995; DosReis *et al.* 1995;

de Meis *et al.* 2008; DosReis & Lopes 2009), *Plasmodium sp.* (Baldé *et al.* 1995; Matsumoto *et al.* 2000), e *Leishmania sp* (Bertho *et al.*, 2000). A morte destas células parece comprometer o processo de expansão clonal e diferenciação celular, resultando em produção insuficiente de citocinas e diminuição de atividade citotóxica que resultariam na persistência do parasito (Guillermo *et al.*, 2009). Assim, além do papel fisiológico, a apoptose de linfócitos T pode ser um fator modulador da imunopatogenia de uma série de doenças como por exemplo a LC. Em lesões de pacientes infectados por *L. braziliensis*, a maior frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose foi associada à persistência da lesão. No entanto, a associação entre a apoptose e os linfócitos T CD8⁺ funcionalmente distintos na evolução da LC ainda não foi completamente elucidado.

A resposta imune que contribui para o estabelecimento e persistência da lesão na LC, assim como para o processo de cura, é um processo dinâmico que envolve a alteração da frequência e das funções efetores de linfócitos. Assim, a avaliação do perfil da resposta imune na LC contribuiria para o melhor entendimento dos mecanismos imunológicos associados à proteção e à patogênese da doença.

2. JUSTIFICATIVA

A extensa distribuição geográfica da LTA, sua alta incidência e o grande número de indivíduos expostos fazem desta doença uma questão de grande importância para a saúde pública. A LTA é uma doença endêmica no Brasil, onde a *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o principal agente etiológico das formas cutânea e mucosa. A Leishmaniose Cutânea (LC) é a forma clínica mais frequente da doença e é endêmica no Estado do Rio de Janeiro, onde a maioria dos casos é causada pela espécie *L.braziliensis* (SVS, 2010).

A estratégia para a profilaxia da LTA seria o desenvolvimento de uma vacina capaz de proteger os indivíduos que se encontram nas áreas de risco de transmissão do parasito. Paralelamente, uma terapia menos agressiva, em termos de efeitos colaterais, se faz necessária, com o intuito de amenizar as consequências do protocolo terapêutico atualmente utilizado.

A perspectiva de controle desta doença depende de um aprofundamento do conhecimento no que diz respeito aos fenômenos que ocorrem durante a resposta imune na doença ativa e na evolução para a cura. Este conhecimento é fundamental para estabelecer parâmetros imunológicos associados com a patogênese, a cura e a resposta protetora da LC, para que possa então, ser aplicado em manipulações terapêuticas e no desenvolvimento de vacinas. Assim, realizamos abordagens experimentais que pudessem dissecar algumas variáveis da resposta imune, a fim de melhor compreender os mecanismos imunológicos envolvidos na doença e na proteção.

A patogênese da LC é dependente de uma resposta imune celular, a qual ocorre através funções efetoras dos linfócitos T, e a magnitude da doença parece estar associada à frequência de linfócitos T reativos à *Leishmania* nas lesões, à citotoxicidade parasito-específica e à produção de IFN- γ e TNF- α . Além dos linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ também exercem importantes funções, através da liberação de citocinas e de sua atividade citotóxica, o que tem sido relacionado tanto a um papel na proteção e regressão da lesão, quanto na manutenção da infecção e dano tecidual (Brodskyn *et al.*, 1997; Cardoso *et al.*, 2015; S G Coutinho *et al.*, 1998; Da-Cruz *et al.*, 1994; Hernández-Ruiz *et al.*, 2010b; Nateghi Rostami *et al.*, 2010). Resultados do nosso grupo mostraram que a uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose, analisados em lesões de pacientes de LC estaria associada à persistência da doença, enquanto a menor frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose foi observada nos

pacientes que evoluíram para cura espontânea, sugerindo que a apoptose destas células contribuiria para a persistência da lesão e que os linfócitos T CD8⁺ teriam um papel protetor na LC (Bertho *et al.*, 2000). Sendo assim, torna-se importante a avaliação da frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose ao longo da terapia e desenvolvimento para a cura.

A citotoxicidade é um fenômeno efetor o qual pode ser exercido tanto por linfócitos T CD8⁺ como por células *natural killer* (NK), células *natural killer* T (NKT), linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁻CD4⁻ (duplo-negativos; DN) e linfócitos T CD4⁺CD8⁺ (duplo-positivos; DP). Entretanto pouco é conhecido a respeito da função destas células na imunopatogenia da LC e da distribuição das mesmas na lesão (Gollob *et al.*, 2008; Lieke *et al.*, 2011; Machado *et al.*, 2002b; O'Reilly *et al.*, 2011; Sun and Lanier, 2011; Weiss *et al.*, 1998; Zaunders *et al.*, 2004). Assim, os linfocitos T CD8⁺ poderiam ter um papel no controle e/ou na progressão da doença e a citotoxicidade pode ser um fenômeno imunomodulador na LC, tanto pelos linfocitos T CD8⁺ como por outras populações citotóxicas, podendo influenciar o desfecho clínico. Um estudo acerca da atividade citotóxica exercida por populações celulares distintas em lesão de LC torna-se necessário para melhor entender o desenvolvimento da resposta imune no combate ao parasitismo e/ou no dano tecidual e conseqüentemente na evolução clínica da doença. Além disso, a avaliação das células NK; células NKT; linfócitos T DN; linfócitos T CD8⁺; e linfócitos T CD4⁺ em atividade citotóxica em resposta a antígenos de *L. braziliensis*, pode contribuir para entender o papel destas células na persistência da lesão tecidual e na evolução para a cura. Assim, estas populações celulares citotóxicas podem representar importantes alvos de estudo, podendo caracterizar uma bioassinatura no que diz respeito a evolução para a cura e/ou a persistência da lesão tecidual.

A maioria dos pacientes de LC apresenta uma resposta satisfatória ao tratamento com antimônio (Glucantime®), a qual parece estar associada ao desencadeamento de uma resposta imune celular eficaz o suficiente para ocasionar uma destruição parasitária, levando à cicatrização da lesão. É interessante ressaltar que as abordagens nos estudos da resposta imune na LC em humanos baseiam-se principalmente na avaliação de amostras de sangue periférico obtidas antes (doença ativa) e após o tratamento (cl clinicamente curados). Entretanto, pouco se sabe a respeito das características da resposta imune desenvolvida pelos pacientes durante os protocolos terapêuticos aplicados. Sendo assim, um estudo incluindo avaliações antes, durante e

depois do tratamento, permite delinear um perfil mais abrangente da resposta imune desde a fase ativa da doença e ao longo do processo de cura da lesão.

A lesão tecidual é a principal manifestação clínica da LC. O infiltrado inflamatório parece ser um processo dinâmico influenciado pelo desenvolvimento de uma resposta imune localizada. O aumento da frequência de linfócitos na lesão pode refletir uma falha na regulação dos linfócitos no infiltrado inflamatório o qual pode estar associado a um mal prognóstico e persistência da lesão (Da-Cruz *et al.*, 2005). Assim, o estudo das populações celulares presentes nas lesões permite um maior esclarecimento quanto à resposta imune localizada que contribuiria para o dano tecidual e persistência da lesão.

A correlação dos dados imunológicos observados na lesão e no sangue periférico dos pacientes com os dados clínicos dos mesmos contribui para um maior detalhamento e aprofundamento dos conhecimentos acerca da resposta imune associada à patogenia e evolução para a cura da leishmaniose cutânea.

Particularmente nos estudos em LTA, a citometria de fluxo tem oferecido uma grande contribuição para o estudo da imunopatogenia desta doença, principalmente no que diz respeito à frequência e proporção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ e a produção de citocinas por estas células (Barral-Netto *et al.*, 1995; Bertho *et al.*, 2000; Bottrel *et al.*, 2001; Clarêncio *et al.*, 2006; S. G. Coutinho *et al.*, 1998; Da-Cruz *et al.*, 1994; Ferraz *et al.*, 2015; Gomes-Silva *et al.*, 2007; Liew *et al.*, 1987; Mendes-Aguiar *et al.*, 2009; Mendonça *et al.*, 1991).

Com o avanço desta tecnologia, no que diz respeito às aplicações, dezenas de parâmetros podem avaliados em milhares de células, gerando um enorme volume de dados. Assim, além da correta interpretação, uma análise exploratória dos dados através de protocolos multiparamétricos torna-se uma ferramenta diferencial. Neste cenário, a citometria de fluxo se apresenta como uma ferramenta adequada, moderna e indispensável para o estudo fenotípico e funcional de diversas populações celulares simultaneamente, contribuindo para um aprimoramento do conhecimento, principalmente no âmbito imunológico.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar o papel dos linfócitos T CD8⁺ efetores e das populações citotóxicas a fim de traçar um perfil imunológico na doença ativa e no desenvolvimento para a cura clínica de pacientes de Leishmaniose Cutânea (LC).

3.2 Específicos

1ª Parte □ Artigo I

- Investigar se a frequência de linfócitos T CD8⁺ totais e efetores, obtidos de sangue periférico, é alterada na doença ativa, durante o tratamento e após a cura, assim como a indução destas células por antígenos de *L.braziliensis*;

- Investigar se a frequência de linfócitos T CD8⁺ totais e efetores em apoptose, obtidos de sangue periférico, é alterada na doença ativa, durante o tratamento e após a cura, assim como após estímulo *in vitro* com antígenos de *L.braziliensis*.

2ª Parte

- Realizar uma avaliação longitudinal da dinâmica dos perfis citotóxicos de pacientes de LC antes, durante e após a terapia antimonial através da detecção da produção de perforina por linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ e DN; e por células NK e NKT, obtidas de sangue periférico quando submetidas a estímulo antigênico de *L.braziliensis*;

- Avaliar se a dinâmica dos perfis de citotóxicos podem ser relacionadas à produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ e DN; e por células NK e NKT, após estímulo antigênico de *L.braziliensis*, antes, durante e após a terapia.

3ª Parte □ Artigo II

- Verificar se as populações celulares potencialmente citotóxicas, isto é, linfócitos T CD4⁺; T CD8⁺; T CD4⁻CD8⁻ (duplo-negativos □ DN); T CD4⁺CD8⁺ (duplo-positivos - DP); células NK e NKT, estariam presentes nas lesões da LC

- Avaliar o comprometimento destas populações celular com a citotoxicidade e a distribuição das mesmas em lesões de LC;

- Avaliar a concentração de granzima B e das citocinas IFN- γ , TNF- α nas lesões de LC;

Todas as etapas:

- Investigar se os parâmetros imunológicos estariam correlacionados com os dados clínicos dos pacientes a fim de determinar uma possível bioassinatura associada com a patogênese e/ou com a evolução para a cura.

4. METODOLOGIA

A presente tese está dividida em três partes e os detalhes metodológicos específicos de cada uma delas estão descritos no artigo I, no item 5.2.1 e no artigo II, respectivamente.

4.1 Casuística

Participaram deste estudo um total de 46 pacientes de LC e 26 indivíduos sadios (IS), os quais foram considerados como controles de normalidade.

Para a obtenção das amostras biológicas utilizadas neste estudo, os indivíduos preenchiem os seguintes critérios:

- Indivíduos sadios (IS): indivíduos que não apresentam qualquer morbidade, assim como ausência de histórico prévio de leishmaniose e que não residem em áreas endêmicas de leishmanioses.

- Pacientes com suspeita de leishmaniose: Todos os pacientes com lesões características clínicas ou epidemiológicas de LC foram submetidos a biópsia de lesão para realização de diagnóstico e para o presente estudo. Apenas os indivíduos com diagnóstico de LC confirmado foram incluídos.

- Pacientes antes do tratamento (PAT): Pacientes diagnosticados com LC, que residem no Estado do Rio de Janeiro, sem histórico recente de viagem a área endêmica de leishmanioses, que ainda não iniciaram o tratamento.

- Pacientes durante o tratamento (PDT): Pacientes de LC sob terapia antimonial com Glucantime®.

- Pacientes pós tratados (PPT): Pacientes de LC após a conclusão da terapia, que apresentem cura clínica no octagésimo dia após o início do tratamento, de acordo com critérios definidos pela equipe médica.

Todos os pacientes foram atendidos no ambulatório do Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Nacional de Infectologia - INI, FIOCRUZ, RJ e foram submetidos ao tratamento convencional com Glucantime® (15mg/Kg/dia).

Foram investigadas informações epidemiológicas e clínicas, como idade e sexo; número e área das lesões durante a fase ativa; tempo de evolução; local de moradia dos indivíduos; resposta ao teste de Intradermorreação de Montenegro (IDRM); resposta ao tratamento; cura clínica; reativação e re-infecção, através de levantamento dos prontuários dos pacientes. A identificação da espécie do parasito

foi realizada por PCR, pelo Laboratório de Pesquisa em Leishmaniose, IOC, Fiocruz e somente aqueles pacientes que tiveram a confirmação da infecção por *L. braziliensis* foram incluídos neste estudo.

O critério de cura clínica foi definido pela epitelização das lesões ulceradas, regressão do infiltrado inflamatório e do eritema, após conclusão do esquema terapêutico (SVS, 2010). Com base nestas definições, as lesões cicatrizadas em até três meses após a conclusão do esquema terapêutico, foi considerada como cura clínica recente. No presente estudo, todos os pacientes apresentaram cura clínica após a terapia, e ausência de reativação até o octagésimo dia após o início do tratamento (Figura 4).

Foram excluídos do estudo os pacientes com doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem na capacidade imunológica do indivíduo; pacientes sob o uso de medicação tópica sobre a lesão cutânea; gravidez; tratamento prévio com medicamento leishmanicida; e pacientes com contra-indicação para o uso do Glucantime®, na dose e esquema terapêutico recomendados pelo Ministério da Saúde. Foram excluídos, ainda, os indivíduos que apresentaram resposta negativa à IDRM, a fim de incluir somente aqueles que apresentaram uma resposta imune celular preservada.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), bem como pelo Comitê de Ética do INI (CEP-INI / FIOCRUZ 029/2012), Brasil. Todos eles respeitam os princípios estabelecidos na Declaração de Helsinki de pesquisa em seres humanos. Antes da coleta de sangue e da realização das biópsias de lesão, todos os voluntários leram e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido.

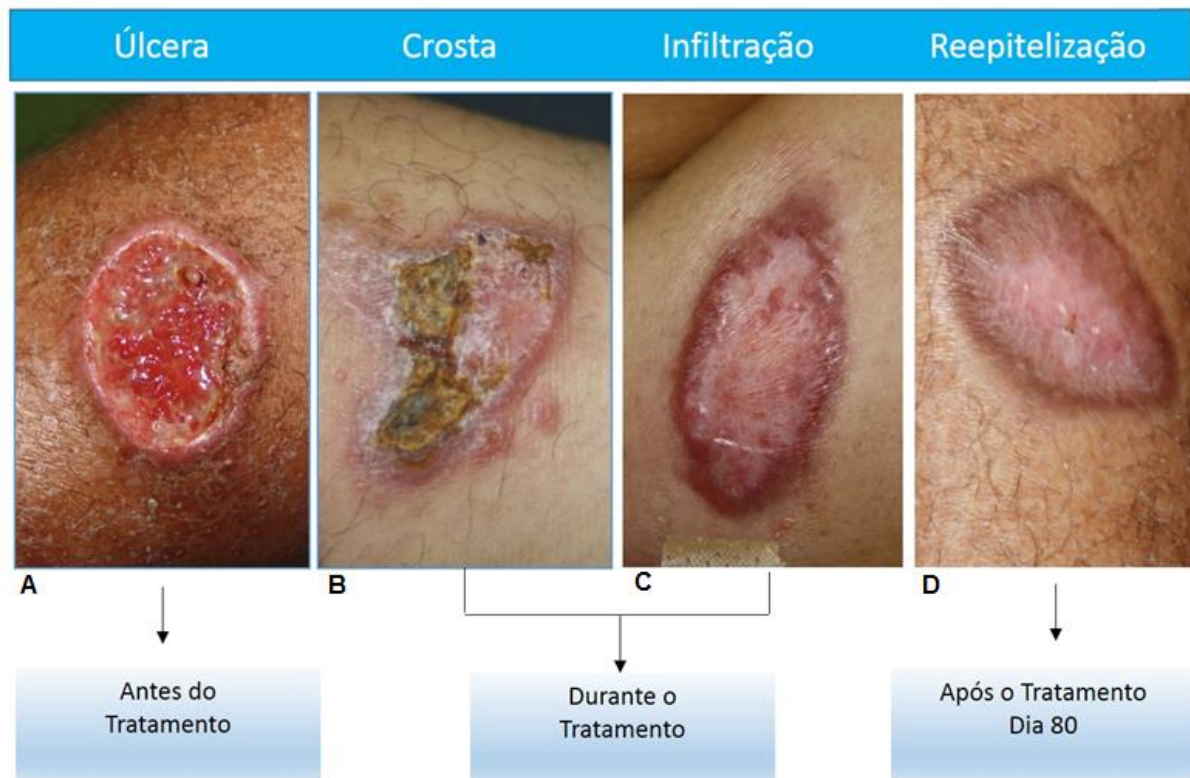


Figura 4: Características das lesões de leishmaniose cutânea na evolução para a cura clínica. (A) Paciente antes do tratamento apresentando úlcera, destruição do epitélio, eritema e infiltrado inflamatório; (B) Paciente durante o tratamento apresentando os primeiros sinais de cicatrização e início da reepitelização; (C) Paciente durante o tratamento com lesão reepitelizada apresentando bordas elevadas e infiltrado inflamatório; (D) Paciente pós tratado com lesão reepitelizada, redução do eritema e do infiltrado inflamatório.

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese estão divididos em três partes:

5.1 1ª Parte

Os resultados da primeira parte estão descritos no Artigo I, no qual nós demonstramos que os linfócitos T CD8⁺ efetores e a apoptose dos mesmos estavam implicados no processo de evolução para a cura e em uma resposta antígeno específica.

Artigo I (publicado)

Título: Apoptosis and frequency of total and effector CD8⁺ T lymphocytes from cutaneous Leishmaniasis patients during antimonial therapy

Autores: Raquel Ferraz^{1,2}, Clarissa F Cunha¹, Adriano Gomes-Silva³, Armando O Schubach⁴, Maria Inês F Pimentel⁴, Marcelo Rosandiski Lyra⁴, Sergio CF Mendonça¹, Cláudia M Valete-

Rosalino^{4,5}, Alda Maria Da-Cruz³ and Álvaro Luiz Bertho^{1,2,*}

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³ Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Laboratory of Surveillance for Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectology (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁵ Department of Otolaryngology and Ophthalmology, Medicine College, Federal University of Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Correspondence: alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br

BMC Infectious Disease (2015)15;74

DOI 10.1186/s12879-015-0799-x

Apoptose e frequência de linfócitos T totais e efetores de pacientes de leishmaniose cutânea durante a terapia antimonial.

Resumo: A patogênese da leishmaniose cutânea (LC) é dependente de uma resposta imune celular, a qual parece influenciar a evolução clínica da doença. Já foi demonstrado que, além dos linfócitos T CD4⁺, os linfócitos T CD8⁺ tem um importante papel no processo de cura da LC. Esta doença é endêmica no Estado do Rio de Janeiro, onde a maioria dos pacientes apresentam uma resposta satisfatória à terapia antimonial. No entanto, pouco se sabe a respeito da frequência dos linfócitos T CD8⁺ e de células apoptóticas em pacientes durante o tratamento. Tais características seriam importantes na investigação de parâmetros imunológicos associados à evolução para a cura. Sendo assim, nós avaliamos a frequência de linfócitos T CD8⁺ totais e efetores, e daqueles em apoptose, a partir de amostras de sangue periférico obtidas de pacientes de LC, causada por *L. braziliensis*, antes (PAT), durante (PDT) e após o tratamento (PPT), assim como amostras de sangue periférico de indivíduos saudáveis (IS). Os PDT apresentaram as menores frequências de linfócitos T CD8⁺ totais assim como maior frequência destas células em apoptose, o que também foi observado após estímulo *in vitro* com antígenos de *L. braziliensis* (LbAg). Em relação a subpopulação de linfócitos T CD8⁺ efetores, durante o tratamento houve maior frequência destas células, assim como destas em apoptose, principalmente quando comparada aos PAT. Resultados semelhantes foram observados após estímulo com LbAg, sendo que após o ensaio *in vitro* os PPT também apresentaram maiores frequências de linfócitos T CD8⁺ efetores quando estimulados com LbAg, assim como maior frequência destas células em apoptose. Nós correlacionamos estes dados imunológicos com dados clínicos e observamos que quanto maior as lesões dos PDT e dos PPT, menor era a frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores e maior era a frequência destas células em apoptose. Estas alterações e correlações observadas ao analisar a frequência de linfócitos T CD8⁺ dos PDT sugerem que estas células possam estar envolvidas no processo de resolução da lesão, mesmo que sob influência da terapia antimonial. Estes dados sugerem que o desenvolvimento de uma resposta imune que leve à cicatrização da lesão possa envolver a modulação de linfócitos T CD8⁺ durante e após a terapia. Assim, os PDT representam um importante grupo a ser estudado no que diz respeito ao perfil da resposta imune associado ao processo de cura clínica dos pacientes de LC.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Apoptosis and frequency of total and effector CD8⁺ T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients during antimonial therapy

Raquel Ferraz^{1,2}, Clarissa F Cunha¹, Adriano Gomes-Silva³, Armando O Schubach⁴, Maria Inês F Pimentel⁴, Marcelo Rosandiski Lyra⁴, Sergio CF Mendonça¹, Cláudia M Valete-Rosalino^{4,5}, Alda Maria Da-Cruz³ and Álvaro Luiz Bertho^{1,2,6*}

Abstract

Background: Leishmaniasis is an important parasitic disease affecting millions worldwide. Human cutaneous leishmaniasis (CL) is endemic in Rio de Janeiro, Brazil, where is caused by *Leishmania braziliensis*. The adaptive immune response is accountable for the healing of CL and despite of key role of CD8⁺ T cells in this immune response little is known about the CD8⁺ T lymphocytes frequencies, apoptosis and antigen-responsive CD8⁺ T lymphocytes of CL patients during antimonial therapy.

Methods: Using flow cytometry, we examined total and effector CD8⁺ T cells from CL patients before (PBT), during (PDT) and after (PAT) treatment for apoptosis and frequencies upon isolation and after *in vitro* *L. braziliensis* antigens (LbAg)-stimulation culture. Besides, a correlation study between immunological findings and lesion size was done.

Results: PDT showed lower frequencies of total CD8⁺ T lymphocytes and higher levels of apoptosis of these cells, which were also observed following LbAg-stimulation culture. Regarding effector CD8⁺ T cells, high frequencies were observed in PDT, while lower frequencies were observed in PAT. Interestingly, PDT showed higher frequencies of apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes. Similar results were seen after *in vitro* antigenic-stimulation assays. Correlation analysis showed that the greater the size of lesion, the smaller the frequency of effector CD8⁺ T lymphocytes in PDT and PAT, as well as a positive correlation between apoptotic-effector CD8⁺ T cells frequency and lesion size of PDT.

Conclusions: Changes in effector CD8⁺ T-lymphocyte frequencies, during and after treatment, seem to represent a critical stage to generate an efficient immune response and suggest that these cells would be evolved in the triggering or in the resolution of lesion, under the influence of therapy. This hypothesis opens new perspectives to clarify controversial statements about the protective or deleterious role of CD8⁺ T cells in the cure or aggravation of CL and the new approach of evaluating patients during treatment proved to be of utmost importance for understanding the immune response in the healing process of human CL.

Keywords: Flow cytometry, Effector CD8⁺ T lymphocytes, Apoptosis, Human cutaneous leishmaniasis, During antimonial treatment, *Leishmania braziliensis*

* Correspondence: alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article

Background

Leishmaniasis is a group of diseases caused by different species of protozoan parasites from the genus *Leishmania* and is ranked as the sixth major neglected tropical disease in the world. In Brazil, American tegumentary leishmaniasis (ATL) was registered in all states and is endemic in Rio de Janeiro, where it is caused mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, leading to a spectrum of clinical, immunological and histopathological manifestations, ranging from self-healing localized cutaneous leishmaniasis (CL) to destructive mucosal leishmaniasis [1,2]. CL is the most frequent clinical form of ATL and is characterized by the presence of a skin ulcer, which heals spontaneously or after antimonial therapy [2,3]. While spontaneous healing appears to be associated with natural resistance, the immunological mechanisms of resistance have not been clearly defined. It was shown that early treatment fails to prevent ulcer formation in CL [4].

Despite the CD4⁺ T-cell-mediated immune response play a pivotal role in the processes either for cure or aggravation of the disease, some reports highlighted that CD8⁺ T lymphocytes may also play important role in the mechanisms for cure of and resistance to *Leishmania* infection [5-10]. Although the role of CD8⁺ T cells has been well established in these studies, there is a controversial statements about protective or deleterious function of effector subpopulation which has not been elucidated so far [7,11-17]. Previous researches have focused mostly on immune responses during active phase and at the clinical cure of disease, thus the investigation of immunological patterns of patients during the antimonial therapy is critical for better understanding the establishment of pathology and for determine beneficial parameters of the immune responses associated with clinical cure.

CD8⁺ T lymphocytes are functionally heterogeneous and the involvement of effector, naïve and memory CD8⁺ T-cell subsets has already been described in antitumor immune responses [18]. It is well established that human-effector CD8⁺ T cells have the CD45RA⁺CD27⁻ phenotype and these subset is thought to result from CD8⁺CD27⁺ precursors in response to antigenic stimulation [19-22]. To date there are few reports about the role of CD8⁺ T-cell subpopulations in the modulation of CL immune response and their functional activity should be better investigated.

Some authors have shown that apoptosis is involved in modulation of the immune response and may be directly related to the immunopathogenesis of some diseases including leishmaniasis [7,23-26]. Our previous results suggest that active disease and spontaneous cure of CL patients have been associated with higher or lower percentages of apoptotic CD8⁺ T cells, respectively [7]. Nevertheless, the association between apoptosis and functionally-defined CD8⁺ T-lymphocyte subsets in CL patients still remains undefined.

The present study investigates frequency and apoptosis of total and effector CD8⁺ T lymphocytes, in blood smears from CL patients before, during and after treatment, as well as evaluates antigen-specific effector CD8⁺ T-lymphocyte frequency and correlating immunological features with lesion size.

Methods

Study Groups

All CL patients enrolled in this study live in *Leishmania braziliensis*-endemic areas in Rio de Janeiro, Brazil [2] and were recruited at Leishmaniasis Surveillance Laboratory, Evandro Chagas Clinical Research Institute (IPEC), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. All patients are volunteers and informed consent was obtained from all individuals prior to collection of blood samples. Diagnosis of leishmaniasis was based on clinical, laboratorial and epidemiological criteria. Ulcerated cutaneous lesions were associated with positive Montenegro skin test (MST) and positive parasitological exams to confirm a diagnosis of CL. All patients were submitted to meglumine antimoniate treatment according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health and sub-divided in three cohorts: Patients before treatment (PBT, n = 8, 36 ± 9 years old), evaluated after confirmed diagnosis and before beginning of anti-*Leishmania* treatment; patients during treatment (PDT, n = 14, 35.7 ± 13.4 years old), evaluated at the tenth day after beginning anti-*Leishmania* treatment, still showing ulcerated skin lesions; and patients after treatment (PAT, n = 11, 41 ± 15,19 years old), at the eighty day after the beginning of treatment. After treatment, all patients presented clinical cure, which was defined as full epithelialization of ulcerated lesions, regression of crusts, desquamation and infiltration. Healthy subjects (HS, n = 18, 29 ± 9.7 years old), from non-endemic areas, showing neither previous history of leishmaniasis nor any other co-morbidity, such as inflammatory diseases, diabetes or cardiologic disease, was analyzed similarly. The duration of lesion ranged from one month (less than 30 days) to six months and the larger diameter measured of the ulcers varied from 15 to 60 mm (PBT: 40 ± 5.3 mm; PDT: 42 ± 12.5 mm; PAT: 41.4 ± 13.9 mm). Basic demographic information of the studied groups is summarized in Table 1.

Ethics statement

This study was approved by National Ethical Clearance Committee of Brazil (CONEP) as well as by the Ethical Committee for Human Research from Oswaldo Cruz Foundation (CEP-FIOCRUZ) and Evandro Chagas Clinical Research Institute (CEP-IPEC/FIOCRUZ), Brazil. All of them adhere to the principles established in the Declaration of Helsinki on human subject research. Written

Table 1 Demographic and clinical information of groups included in the study

	HS	PBT	PDT	PAT
Number of volunteers	18	8	14	11
Sex: M/F	11/7	7/1	9/5	8/3
Age	29 ± 9.7	36.1 ± 9	35.71 ± 13.4	41 ± 15.1
Number of lesions	NA	1	1	1
Diameter of lesion (mm) (BF)	NA	40 ± 5.3	42 ± 12.5	41.4 ± 13.9
Montenegro Skin Test (MST) (mm) (BF)	NA	11.3 ± 1.8	11.7 ± 3.6	12.3 ± 3.6
Duration of disease (months)	NA	2 (1–6)	2 (1–6)	2 (1–5)

Age; Diameter of lesions; and MST: mean ± Standard Deviation.

Duration of disease: median (range).

BF = measured Before Treatment.

NA = Not Applicable.

informed consent was taken from all volunteers prior to blood collection.

Ex vivo and in vitro phenotypic and apoptotic assays

Heparinized venous blood was obtained from CL patients and HS and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained by Ficoll-Hypaque density gradient centrifugation (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) separation. A fraction of these cells was stained *ex vivo* and another was submitted to *in vitro* stimulation assay, where PBMC were adjusted (3×10^5 /well) in RPMI medium supplemented with 10% of AB Rh⁺ inactivated human serum (Sigma Aldrich) and then distributed in triplicate in a 96-well, flat-bottomed plate (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA), as described previously [27]. Cells were stimulated with particulate antigens of *L. braziliensis* (LbAg) (disrupted in repeated freeze/thaw cycles and a final 5-minutes ultrasonication). Non-stimulated and 1 µg/well-concanavalin A (ConA)-stimulated cells (Sigma Aldrich) were used as negative and positive controls of proliferation, respectively. Cultures were carried out in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37°C. The time of incubation of ConA-stimulated cells was three days, while non-stimulated and LbAg-stimulated cells were five days. After that, cells were harvested and prepared for staining protocols.

Cell surface and apoptosis staining protocol

Staining protocol was performed as previously described [7]. Briefly, *ex vivo* or *in vitro* assay's cells were stained for surface markers with a panel of monoclonal antibodies, as follows: FITC-conjugated anti-CD3; APC-conjugated anti-CD8; PECy7-conjugated anti-CD27; ECD-conjugated anti-CD45 (all Beckman Coulter, Miami, FL, USA) in PBS containing 0.1% sodium azide (NaN₃; Sigma Aldrich) and 2% fetal calf serum (Sigma Aldrich) and incubated for 20 minutes on ice. Afterwards, these samples were incubated with 20 µg/mL of 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Sigma Aldrich) for 30 minutes at 4°C, for apoptosis evaluation, as described

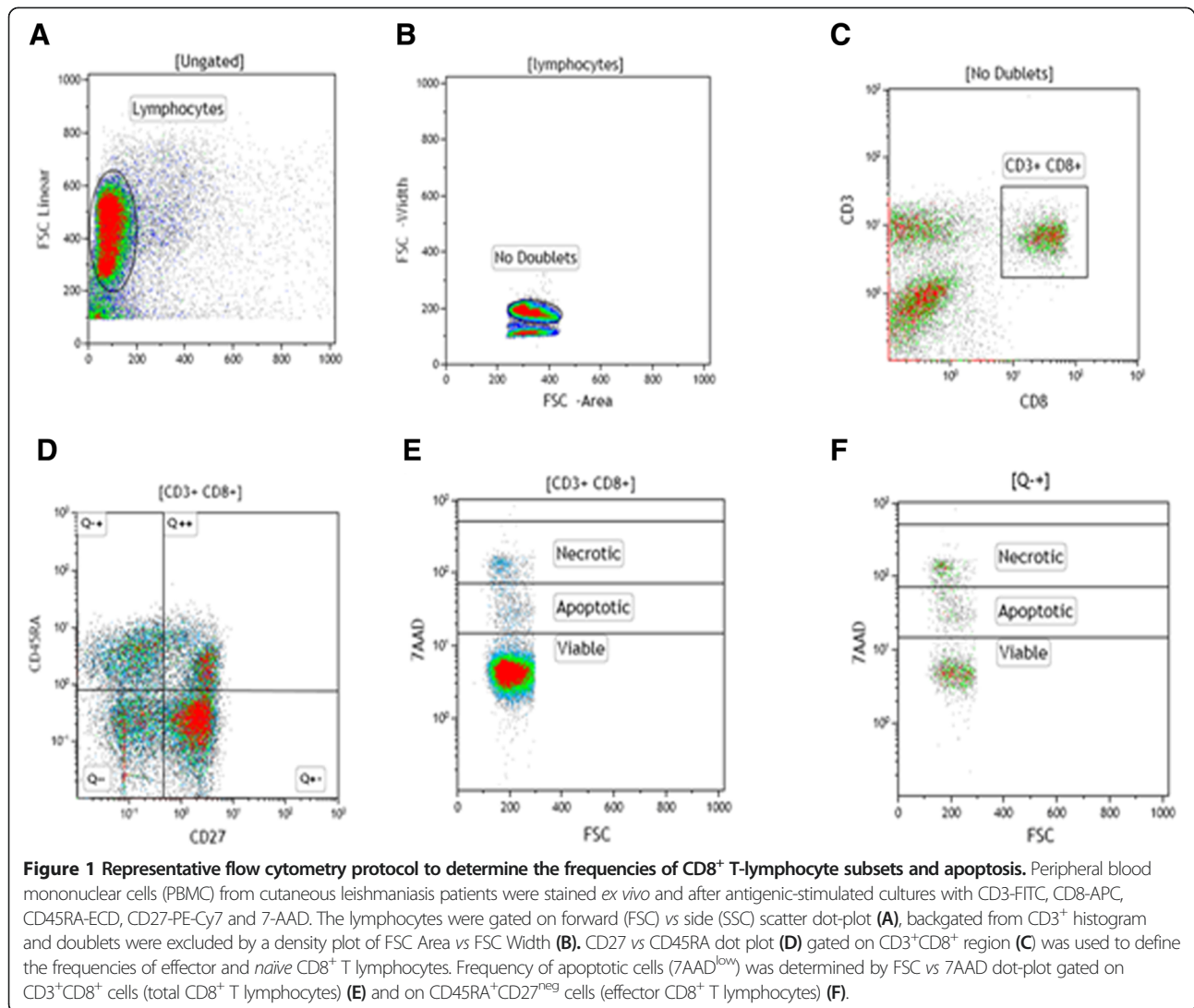
in elsewhere. The samples were kept on 7-AAD solution, protected from light, until the flow cytometry acquisition.

Flow cytometry

Fifty thousand-event acquisitions were performed on Beckman Coulter Cyan ADP and on BD FACSAria II flow cytometers. The limits for the quadrant markers and histograms were always set based on non-staining cells and isotypic controls and color compensations were made based on simple labeling samples. A multi-parameter flow cytometric protocol to determine the frequencies of total and effector CD8⁺ T lymphocytes and apoptosis was done in Kaluza 1.2 software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). In this manner, the frequency of total CD8⁺ T lymphocytes was determined in a CD3 vs. CD8 dot plot (Figure 1C) created from a region encompassing lymphocyte population in a SSC vs. FSC density plot (Figure 1A), excluding doublets (Figure 1B). To evaluate the frequency of effector CD8⁺ T-lymphocyte subsets a CD27 vs. CD45RA dot plot gated on CD3⁺CD8⁺ region was created and data CD27⁺CD45RA⁻ was recorded (Figure 1D; Q - +). Simultaneously, for apoptosis determination in total (Figure 1E) and effector (Figure 1F) CD8⁺ T cells a FSC vs. 7AAD dot plot was created gated on dot plots represented in Figure 1C and Figure 1D, respectively.

Statistical analysis

For statistical analyses between two groups at a time, Mann–Whitney *U* test was used. For comparison between nonstimulated and stimulated CD8⁺ T-lymphocyte subsets, we used a paired nonparametric Wilcoxon test. These results were reported as mean ± standard error (SEM). We also used a Spearman's rank correlation test. Correlations and intergroup differences were considered statistically significant when $P < 0.05$. All statistical calculations and graphical representations of data were obtained using the GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA).



Results

Frequency of total and effector CD8⁺ T cells

We performed comparative analysis of the frequency of total CD8⁺ T cells from patients before treatment (PBT), patients during treatment (PDT) and patients after treatment (PAT), as well healthy subjects (HS). The mean frequency of total CD8⁺ T cells was significantly lower in PDT (15.3 ± 1.5) compared to PBT (23 ± 2 ; $P < 0.05$) and to HS (23.6 ± 1.2 ; $P < 0.001$). These lower frequency also were seen when comparing PDT with in PAT (21.5 ± 1.6 ; $P = 0.07$), although these difference was not statistically significant (Figure 2A).

Due to the heterogeneity of the peripheral CD8⁺ T-cell pool, we performed a dichotomized analysis in order to discriminate the differential distribution of their subsets. Thus, in order to highlight the importance of effector CD8⁺ T lymphocytes in the parasitic immune responses, we analyzed the CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ T cells, an effector

phenotype. We observed a higher frequency of these cells in PDT (31.2 ± 2.2) compared to other three groups, HS (12 ± 1.4 ; $P < 0.001$), PBT (25 ± 2.7 ; $P < 0.05$) and PAT (16.9 ± 2.7 ; $P < 0.001$) (Figure 2B). PBT also showed higher frequency of these cells when compared to HS and PAT. It is important to note that PBT and PDT showed lower percentages of CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺ *naïve* T-cell subset when compared to HS and to PAT, which could be a consequence of differentiation of *naïve* in effector CD8⁺ T cells, during active disease (data not shown).

Apoptosis of total and effector CD8⁺ T cells

Previous report of our group showed that there was a higher rate of apoptotic-total CD8⁺-T lymphocytes in non-healing lesions of CL when compared to lesions that progress to spontaneous cure [7], suggesting a modulate role of apoptosis on these cells in CL lesion environment. Following this hypothesis, we investigated the role of apoptosis in blood

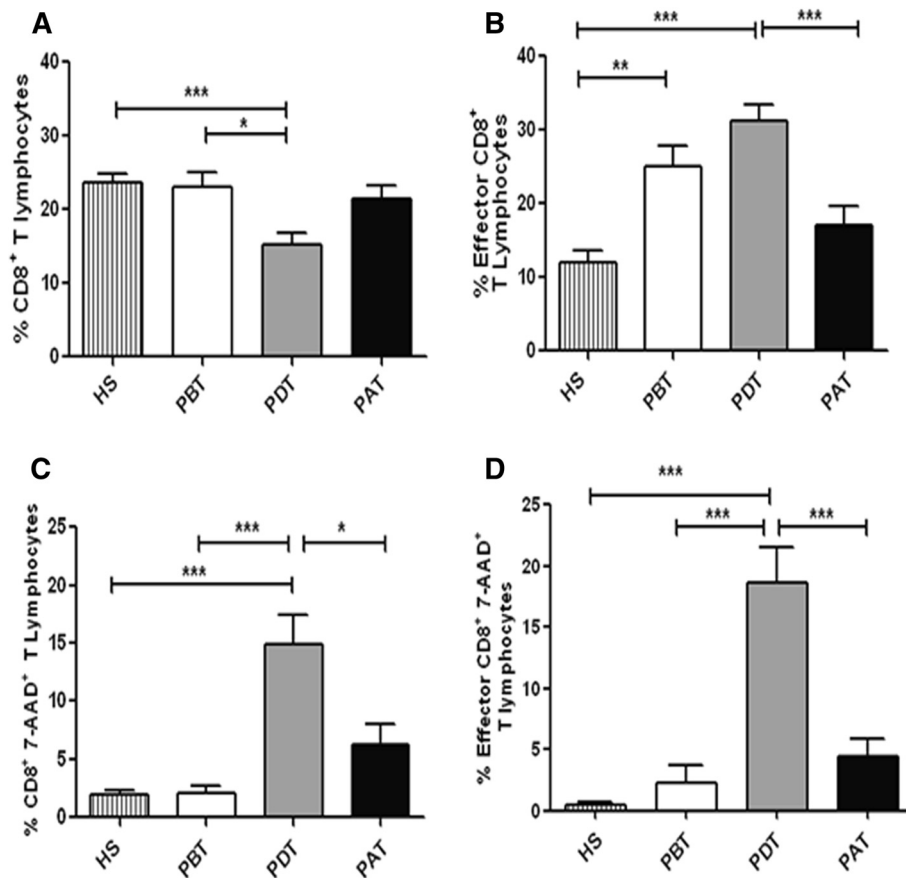


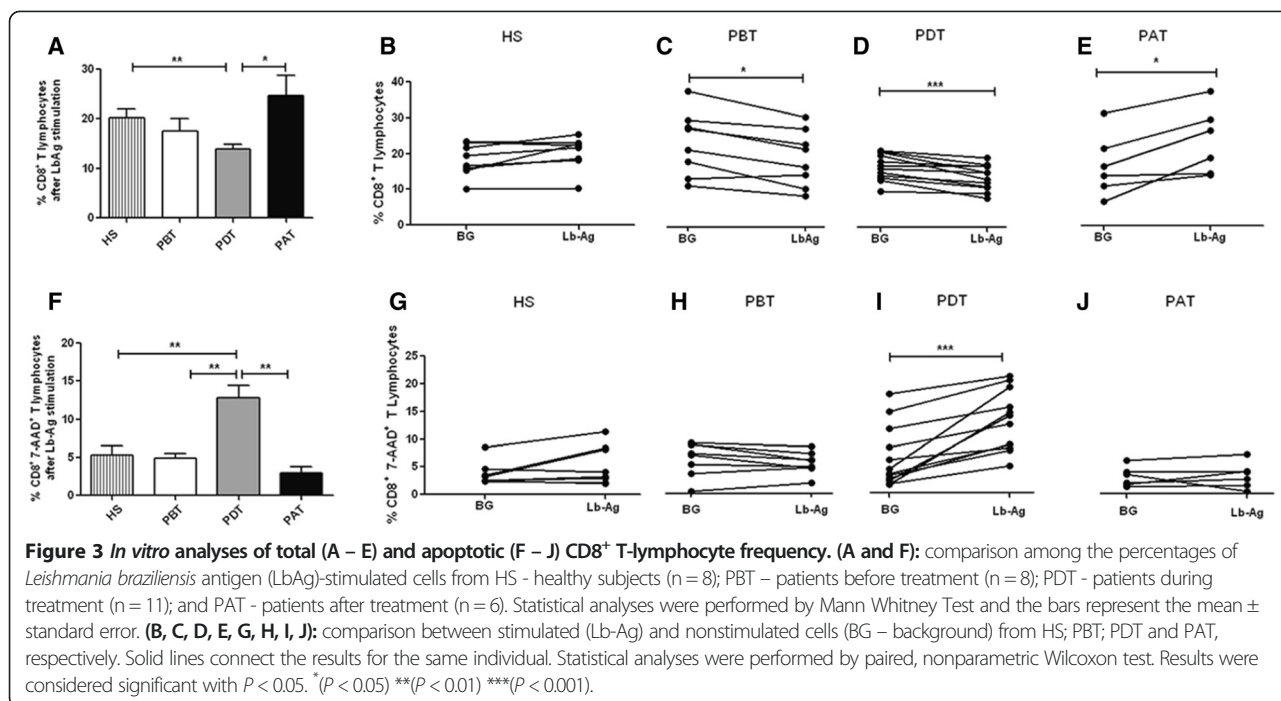
Figure 2 *Ex vivo* analysis of total CD8⁺ T-lymphocyte frequency and apoptosis in human cutaneous leishmaniasis. (A) Total CD8⁺ T lymphocytes; (B) Effector CD8⁺ T lymphocytes; (C) Apoptotic-total CD8⁺ T lymphocytes; (D) Apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes. HS - healthy subjects (n = 18); PBT – patients before treatment (n = 8); PDT - patients during treatment (n = 14); PAT - patients after treatment (n = 11). Statistical analyses were performed by Mann Whitney Test. The bars represent the mean ± standard error. Results were considered significant with $P < 0.05$ - * ($P < 0.05$) ** ($P < 0.01$) *** ($P < 0.001$).

compartment, through the 7-AAD staining and flow cytometry. The results of *ex vivo* analyses showed higher frequencies of apoptotic-total (14.9 ± 2.8) and apoptotic-effector CD8⁺ T cells from PDT (18.6 ± 2.8) when compared to: PBT (apoptotic-total, 2 ± 0.6; $P < 0.001$; apoptotic-effector, 2.3 ± 1.4; $P < 0.001$); PAT (apoptotic-total, 6.2 ± 1.7; $P < 0.05$; apoptotic-effector, 4.3 ± 1.5; $P < 0.001$); and HS (apoptotic-total, 1.8 ± 0.4; $P < 0.001$; apoptotic-effector, 0.4 ± 0.2; $P < 0.001$) (Figure 2C and D). These results showed pronounced percentages of apoptotic CD8⁺ T lymphocytes only on patients during treatment, which tend to decrease after the end of treatment indicating that this phenomenon could be associated to the glucantime therapy and the immune response triggering.

Leishmania braziliensis-reactive CD8⁺ T lymphocytes

In order to determine an expansion of CD8⁺ T cells involved in a specific anti-Leishmania T-cell response, PBMC were cultured in the absence and in the presence of *L. braziliensis* antigens (LbAg). Frequencies of LbAg-reactive-total CD8⁺ T cells were compared among the four

studied groups. PDT showed lower mean frequencies of *Leishmania braziliensis*-reactive CD8⁺ T lymphocytes (13.8 ± 1.0) when compared to PAT (24.7 ± 3.9; $P < 0.05$) (Figure 3A); to HS (20.2 ± 1.6; $P < 0.01$); and to PBT (17.5 ± 2.5), although the difference between the frequencies of PBT and PDT was not statistically significant ($P = 0.2$) (Figure 3A). To evaluate the modulation in the frequencies of LbAg-reactive CD8⁺-T cells, we performed paired analyses between the percentage of nonstimulated-total CD8⁺ T cells (background - BG) and those of LbAg-stimulated CD8⁺ T cells. Both PBT (BG, 21.4 ± 2.8; LbAg, 17.5 ± 2.5; $P < 0.05$) and PDT (BG, 16.9 ± 1; LbAg, 13.8 ± 1; $P < 0.01$) showed lower frequencies of LbAg-reactive total CD8⁺ T cells, more pronounced in PDT (Figure 3C and D, respectively). On the other hand, PAT showed a higher frequency of these cells (BG - 17.7 ± 3.7; LbAg - 24.7 ± 3.9; $P < 0.05$) (Figure 3E), showing that LbAg down-modulate CD8⁺ T cells during *in vitro* assays with cells obtained from PBT and PDT. In the opposite manner, LbAg up-modulate these cells in assays performed with cells from patients after treatment and clinical cure. No changes on frequency of these cells were



seen in experiments with cells from HS (BG, 18.1 ± 1.6 ; LbAg, 20.2 ± 1.6) (Figure 3B).

Corroborating the results showed in *ex vivo* findings, we observed higher rates of apoptotic-CD8⁺ T cell in cultures with LbAg-stimulated cells from PDT (12.8 ± 1.5) compared to PBT (4.9 ± 0.6 ; $P < 0.01$); PAT (2.9 ± 0.8 ; $P < 0.01$); and HS (5.2 ± 1.2 ; $P < 0.001$) (Figure 3F). The paired analysis confirmed that the higher frequency of apoptotic-total CD8⁺ T lymphocytes from PDT (BG, 6.4 ± 1.5 ; LbAg, 12.8 ± 1.5 ; $P < 0.001$) is antigen-dependent (Figure 3I), and could not be seen in HS- (BG, 3.7 ± 0.7 ; LbAg, 5.2 ± 1.2), in PBT- (BG, 5.6 ± 0.9 ; LbAg, 4.9 ± 0.6) neither in PAT-*in vitro* experiments (BG, 2.7 ± 0.6 ; LbAg, 2.9 ± 0.8) (Figure 3G, H and J, respectively).

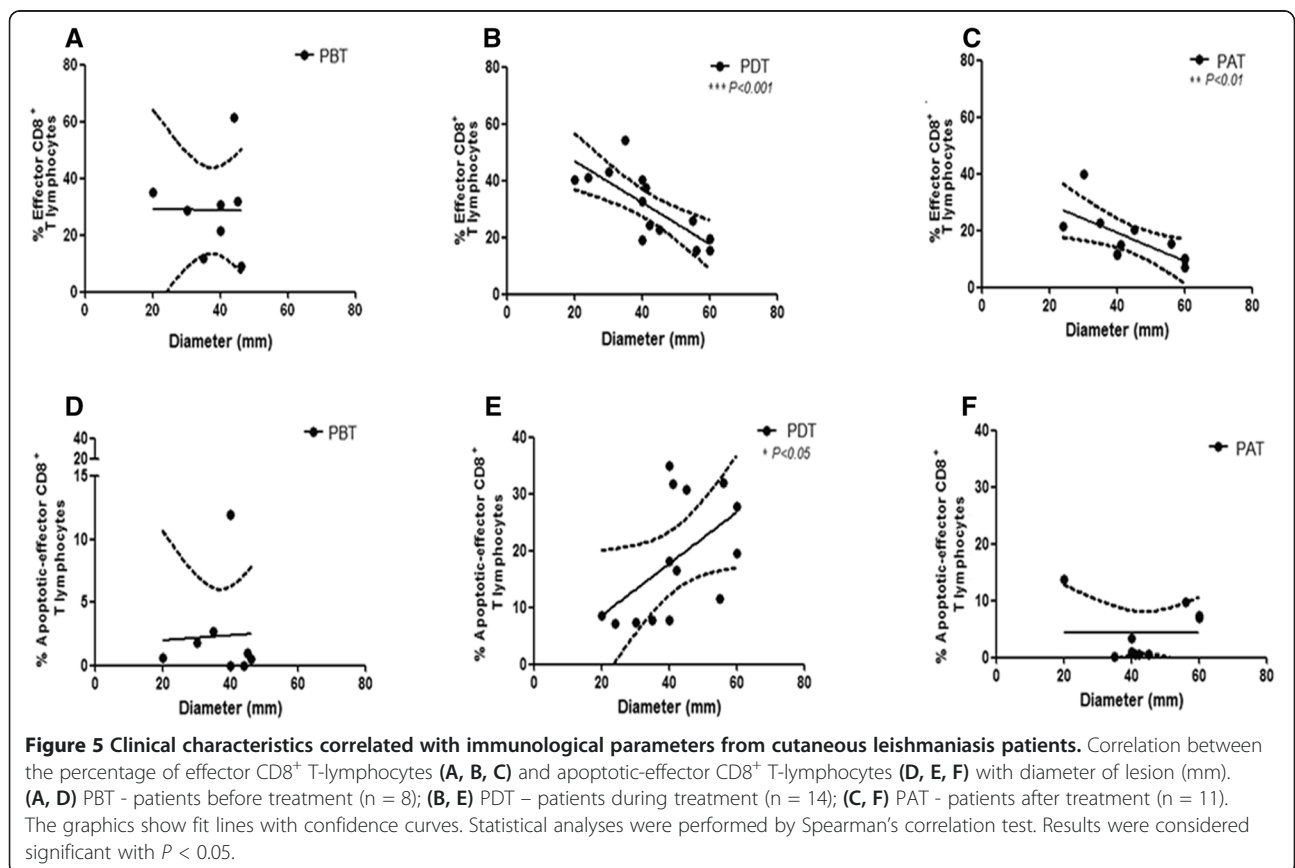
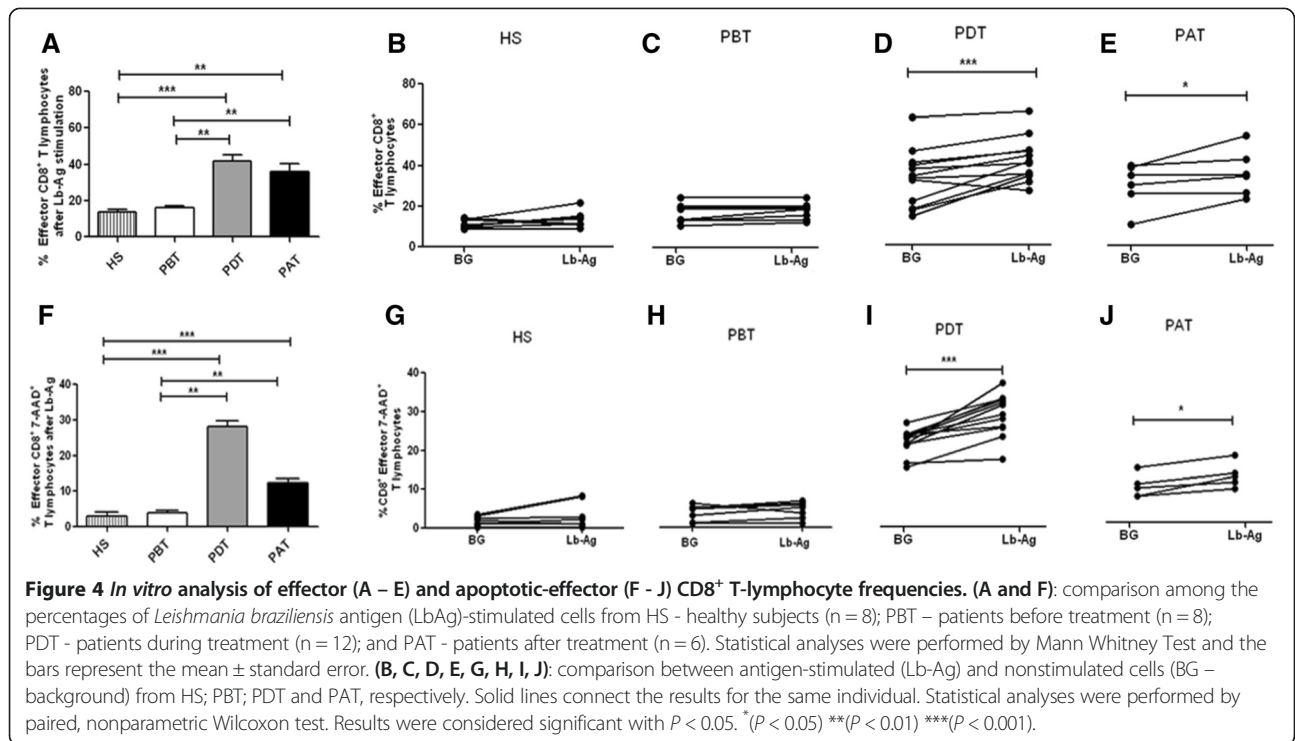
Regarding frequency of LbAg-reactive-effector CD8⁺ T cells during *in vitro* assays, it was observed higher frequencies of these cells in experiments with cells from PDT (41.8 ± 3.1) and from PAT (35.8 ± 4.6) when compared to experiments with cells from PBT (15.9 ± 1.3 ; $P < 0.01$) and also to HS (13.4 ± 1.3 ; $P < 0.01$ and $P < 0.001$) (Figure 4A). The modulation of frequency of these cells in the presence of these antigens was confirmed by the paired test in which we detected higher frequencies in PDT (BG, 33.1 ± 4 ; LbAg, 41.8 ± 3.1 ; $P < 0.001$) and PAT (BG, 29.8 ± 4.3 ; LbAg, 35.8 ± 4.6 ; $P < 0.05$) (Figure 4D and E, respectively), while PBT (BG, 14.6 ± 1.5 ; LbAg, 15.9 ± 1.3 ; $P < 0.01$) and HS showed similar frequencies among stimulated and nonstimulated cells (BG, 11.3 ± 0.7 ; LbAg, 13.4 ± 1.3) (Figure 4C and B, respectively).

Concerning the apoptotic-effector CD8⁺ T cells, a comparison among the four studied groups showed higher

percentages in PDT (28.1 ± 1.5) when compared to HS (3 ± 1.1 , $P < 0.001$) and PBT (3.8 ± 0.7 , $P < 0.01$). We also observed higher frequencies in PAT (12.3 ± 1.1) when compared to HS ($P < 0.001$) and PBT ($P < 0.01$) (Figure 4F). The paired analysis have shown significant differences of apoptotic-effector CD8⁺ T cells between BG and LbAg in PDT (BG, 21.2 ± 0.9 ; LbAg, 28.1 ± 1.5 ; $P < 0.001$) and PAT (BG, 9.6 ± 1 ; LbAg, 12.3 ± 1.1 ; $P < 0.05$) (Figure 4I and J, respectively), while no significant difference was observed in HS (BG, 1.7 ± 0.4 ; LbAg, 3 ± 1.1) and PBT (BG, 3.2 ± 0.7 ; LbAg, 3.8 ± 0.7) (Figure 4G and Figure 4H, respectively).

Correlation analysis of effector and apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes with lesion size

Taking account the relationship between clinical features and immune response in CL, we correlated the frequencies of effector and apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes with lesion size. Results showed an inverse correlation between frequencies of effector CD8⁺ T lymphocytes and lesion size in PDT ($r = -0.79$; $P < 0.001$) as well as in PAT ($r = -0.79$; $P < 0.01$). The lower the frequency of effector CD8⁺ T cells, the larger the size of lesion (Figure 5B and C, respectively). In contrary, no statistical correlation was observed between the frequencies of effector CD8⁺ T lymphocytes and lesion size in PBT (Figure 5A). These results suggest that a greater induction of effector CD8⁺ T cells after the beginning of treatment would be associated with small lesions, less inflammatory process and minor tissue destruction. Correlation analyses between lesion size and antigen-specific CD8⁺ T cell were done but no statistically significant result could be observed (data not shown).



Earlier report of our group showed high frequencies of apoptotic-total CD8⁺ T cells in lesions of patients with active CL compared with patients evolved to spontaneous cure [7]. Hence, became noteworthy to correlate the frequencies of circulating-apoptotic-effector CD8⁺ T cells to lesion sizes in order to identify a T cell subset implicated either protective or deleterious role during the treatment or after clinical cure of CL. It was observed a positive correlation between higher frequencies of apoptotic-effector CD8⁺ T cells and larger lesion areas in PDT ($r = 0.62$; $P < 0.05$) (Figure 5E), although there were no correlation between these parameters in PBT and in PAT (Figure 5D and C, respectively).

Discussion

The host immune response to *Leishmania* is mainly mediated by T cells [28]. The study of immunopathogenesis in human CL has been based on the determination of the frequency of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and cytokine production [13,27,29]. Earlier observations from our group have shown that CD8⁺ T lymphocytes have a role in the cure process in CL patients [7,8,10,27,30] and other reports reinforces this hypothesis [14,31]. Conversely, some authors have associated the CD8⁺ T lymphocytes to tissue injury in CL [15] and in mucocutaneous leishmaniasis [11,12]. It is important to note that, in all of these reports, patients were evaluated before and after antimonial therapy not taking into account the immunological events that happen during treatment. In order to assess the characteristics of the immune response involved in the healing process of CL patients, it is of utmost importance the evaluation of patients during antimonial therapy. Our results showed important differences in the CD8⁺ T-cell frequencies, characterizing early and final phases of clinical cure, which seems to be linked to antimonial therapy.

The frequency of apoptotic CD8⁺ T cells in HS is in accordance to the normal apoptotic rate (1–4%) as reported elsewhere [32]. Because PDT showed higher frequencies of apoptotic CD8⁺ T cells than PBT and HS, we suggest that apoptosis of these cells could be related to the beginning of therapy. The highest frequency of apoptotic CD8⁺ T lymphocytes observed during the antimonial treatment could be associated to lower rate of total CD8⁺ T cells in PDT, suggesting an association between apoptosis and a down-modulation of the total CD8⁺ T cells. It is in accordance with a previous report of our group, which have shown that high rates of apoptotic-total CD8⁺ T cells was related to active disease, while a lower frequency of apoptotic-total CD8⁺ T cells is related to spontaneous cure [7]. Brelaz et al. [27] related the key role of CD8⁺ T cells in the process of healing with a significantly higher proportion of circulating CD8⁺ T lymphocytes in spontaneously healed patients when compared to patients before treatment. Elevated frequencies of total CD8⁺ T cells in PAT compared to PDT, may represent a tendency of these cells

to reestablish levels of normality at the end of treatment and could be associated to clinical cure.

We observed an increase of apoptotic-total CD8⁺ T cells and a decrease of total CD8⁺ T-cell frequencies in LbAg-stimulated cultures with cells from PDT as well as from PBT. Inversely we observed an increase of total CD8⁺ T-cell frequencies in LbAg-stimulated cultures with cells from PAT, showing that at the end of treatment, total CD8⁺ T lymphocytes could expand in response to LbAg. Based in these findings we may hypothesize that the high rates of apoptosis observed in *ex vivo* total CD8⁺ T cells from PDT could be triggered by expressive amount of circulating antigen derived from parasite destruction caused by the antimony.

The high frequency of LbAg-reactive total CD8⁺ T lymphocytes observed after therapy corroborates data found by Da-Cruz et al. [10,23] who suggested that the increased levels of these cells at the end of treatment would be associated with resolution of lesion. It is worth to note that these studies compared patients before and after treatment and there was a need to supplement this information, evaluating patients during treatment. So, the increased levels of LbAg-reactive total CD8⁺ T lymphocytes observed at the end of therapy indicate that probably an expansion of this cell population was not perceived at early phases of healing process. It is in accordance with others [33,34] who reported a later development of an efficient immune response, i.e., when there is a balanced response with control of parasite replication without tissue injury.

Despite the knowledge about the key role of CD8⁺ T lymphocytes in the immune response, the evaluation of effector CD8⁺ T-cell subset became an imperative approach for better understanding the specific role of these cells, in healing process in patients under treatment [19,20,35]. Besides, the relationship between frequencies of effector CD8⁺ T cells and the different stages of treatment is unknown. Taking into account that effector CD8⁺ T lymphocytes represent 10 to 40% of total-circulating CD8⁺ T cells and this pool includes a variety of functionally distinct subpopulations, an analysis of effector population can provide information about some functional characteristics of this subset, which would be imperceptible when the analysis of total CD8⁺ T lymphocytes was performed.

Concerning *ex vivo* analysis of effector CD8⁺ T cell, the highest percentage observed in PDT seems to indicate a greater induction of this subset during the treatment. Considering that Glucantime® is a leishmanicidal drug, a higher amount of circulating antigen during treatment might induce effector CD8⁺ T lymphocytes and explain the higher frequency of these cells in PDT. Some reports corroborates this statement, as demonstrated by Meymandi et al. [36] where clearly showed that, at their histological findings, there was a reduction in aggregations of histiocytes,

decreased cellular parasitic load and an important increased numbers of CD3⁺ T cells in response to combining antimonial treatment. In another study there was an increase in the percentage of CD8⁺ T cells in peripheral blood from patients with leishmaniasis under treatment with meglumine antimoniate [37]. Moreover, the lower frequency of CD8⁺ T cells observed in PAT may be related to a reduced antigenic stimulation, which could depict what is happening *in vivo* after clinical cure.

Because effector CD8⁺ T lymphocytes from PDT and PAT expanded in response to LbAg while PBT did not, our study indicated that antimonial treatment might not influence the involvement of effector CD8⁺ T lymphocytes in the antigen-specific immune response to parasite.

Apoptosis is a physiological process of immune responses, however this phenomenon of death can also be a modulating factor of immunopathogenesis of some disorders such as Dengue, Chagas' disease and AIDS [21,31,32]. In the present report, high apoptosis rates observed in LbAg-stimulated effector CD8⁺ T cells in PDT point to the occurrence of activation-induced cell death (AICD), suggesting that this death phenomenon may be happening *in vivo* during treatment [33]. Although PAT showed low frequencies of effector CD8⁺ T lymphocytes, when compared to PDT, the small rates of apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes seem to favor to clinical cure. Moreover, in parasitic infections the cross-talk between apoptosis of T lymphocytes and cytokine production was associated to a deleterious role of this death phenomenon [26].

Some authors considered that the severity of disease could be characterized by lesion size, which is considered as the most significant clinical feature in CL [38]. Herein, we showed that the smaller the size of lesion, the greater the frequency of effector CD8⁺ T lymphocytes in PDT and PAT. Some authors [34] reported that the size of lesion found in patients evaluated before therapy was directly related to activated T lymphocytes. Thus, we may postulate that after the beginning of antimonial therapy there is a greater induction of effector CD8⁺ T cells, which is inversely proportional to the lesion size, suggesting that a small frequency of effector CD8⁺ T lymphocytes can favor to the tissue damage. Agreeing this data, we showed that the greater the size of lesion, the higher the frequency of apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes in PDT, suggesting a deleterious role of this death phenomenon. This observation corroborates with our previous report [7] where we observed that patients evolved to spontaneous cure were associated to small frequencies of apoptotic CD8⁺ T lymphocytes. This data emphasize the protective role of CD8⁺ T cells considering the severity of lesions. Further studies are underway to determine what functional characteristics these effector cells have, since they can present cytotoxic and/or pro-inflammatory-cytokine-producer profiles.

Conclusions

Taking together, our results showed an evident expansion of effector CD8⁺ T lymphocytes in response to LbAg, more pronounced in PDT. Changes in effector CD8⁺ T-lymphocyte frequencies, during and after treatment, seem to represent a critical stage to generate an efficient immune response and suggest that these cells would be evolved in the triggering or in the resolution of lesion, when under the influence of therapy. Although this work do not define the effective role of CD8⁺ T cells in the CL immunopathogenesis, our findings put forth the notion that the evolution to cure induced by antimonial therapy implicate the effector CD8⁺ T lymphocytes. Moreover, our results emphasize the protective role of CD8⁺ T cells considering the severity of lesions. Further studies are underway to determine what functional characteristics these effector cells have, since they can present cytotoxic and/or pro-inflammatory-cytokine-producer profiles. This new approach of evaluating patients during treatment proved to be very important for understanding the healing process. Furthermore, this report might be used as a basis for further investigations concerning antimonial therapy and to guide vaccine investigations based on the development of an effective cellular immune response that regulates tissue damage in human cutaneous leishmaniasis.

Abbreviations

7-AAD: 7 aminoactinomycin D; AICD: Activated-induced cell death; AIDS: Acquired immunodeficiency syndrome; APC: Allophycocyanin; ATL: American tegumentary leishmaniasis; BD: Becton & Dickinson; BF: Measured before treatment; BG: Background; CD: Cluster of differentiation; CL: Cutaneous leishmaniasis; ConA: Concanavalin A; CONEP: National Ethical Clearance Committee of Brazil; ECD: Energy couple dye; FIOCRUZ: Oswaldo Cruz Foundation; FSC: Forward scatter; FITC: Fluorescein Isothiocyanate; HS: Health subjects; IPEC: Evandro Chagas Clinical Research Institute; LbAg: *Leishmania braziliensis* antigen; MST: Montenegro skin test; NA: Not applicable; PAT: Patients after treatment; PBMC: Peripheral blood mononuclear cells; PBT: Patients before treatment; PDT: Patients during treatment; PECy7: Phycoerythrin Cyanin 7; SSC: Side scatter.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Authors' contributions

ALB and RF conceived and designed the study and performed statistical analysis. RF, CFC and ALB performed the experiments. RF and ALB performed all flow cytometry acquisition and analysis. RF and ALB analyzed and compiled the data. AOS, MRL, MIFP and CMVR took patient care. SCFM, AGS and AMDC contributed reagents and drafted the manuscript. RF and ALB wrote the final version of manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Authors' information

ALB is Senior Scientist, PhD, Vice-Head at Lab. of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ and Coordinator of Flow Cytometry Core Facility at Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil; Member of ISAC – International Society for Advancement of Cytometry. RF is PhD student received scholarship from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); Supervisor at Flow Cytometry Core Facility at Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil. CFC is PhD student and received scholarship from CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa). AMDC is Senior Scientist, PhD, investigators from CNPq. AOS is

investigator from FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro). SCFM is Senior Scientist, PhD and Head of Lab. of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ. AGS is postdoctoral student.

Acknowledgements

The authors would like to thank Platform of Flow Cytometry, IOC-FIOCRUZ and Platform of Flow Cytometry, PDTIS-FIOCRUZ for flow cytometry acquisitions; to Dr. Marise Nunes (IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) and Dr. Paula De-Luca (IOC-FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil) for donation of some reagents. This research was supported by an internal funding from IOC-FIOCRUZ and PROEP-CNPq-IOC (402557/211-5). The funding agencies had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Author details

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁴Laboratory of Surveillance for Leishmaniasis, Evandro Chagas National Infectology Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Department of Otolaryngology and Ophthalmology, Medicine College, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁶Laboratory of Immunoparasitology and Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Pavilhão Leônidas Deane, sala 408-A, CEP: 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brasil.

Received: 7 August 2014 Accepted: 4 February 2015

Published online: 19 February 2015

References

- WHO. WHO Technical Report Series 949. Control of Leishmaniasis. [internet]. WHO. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf?ua=1
- De Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol*. 2000;39(7):506–14.
- Convit J, Ulrich M, Fernández CT, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, Castés M, et al. The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1993;87(4):444–8.
- Machado P, Araújo C, Da Silva AT, Almeida RP, D'Oliveira Jr A, Bittencourt A, et al. Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002;34(12):E69–73.
- Mendonça SC, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceicao-Silva F, Da-Cruz AM, et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1995;53(2):195–201.
- De Luca PM, Mayrink W, Alves CR, Coutinho SG, Oliveira MP, Bertho AL, et al. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine*. 1999;17(9–10):1179–85.
- Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. 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 Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al*. 2000;33(3):317–25.
- Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol*. 2005;153(3):537–43.
- Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e871.
- Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9(2):251–6.
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1995;17(1):21–8.
- Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1997;159(9):4467–73.
- Coutinho SG, Pirmez C, Da-Cruz AM. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96 Suppl 1:S173–8.
- Toledo VP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MA, Costa CA, Genaro O, et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 2001;96(1):89–98.
- da Santos C. S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8(+) Granzyme B(+) Mediated Tissue Injury Versus CD4(+)IFNγ(+) Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2013;133(6):1533–40.
- Gautam S, Kumar R, Singh N, Singh AK, Rai M, Sacks D, et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*. 2014;209(2):290–9.
- Nylén S, Gautam S. Immunological perspectives of leishmaniasis. *J Glob Infect Dis*. 2010;2(2):135–46.
- Appay V, Jandus C, Voelter V, Reynard S, Coupland SE, Rimoldi D, et al. New generation vaccine induces effective melanoma-specific CD8+ T cells in the circulation but not in the tumor site. *J Immunol Baltim Md* 1950. 2006;177(3):1670–8.
- Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, et al. Evidence that human CD8 + CD45RA + CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol*. 1999;11(7):1027–33.
- Hamann D, Baars PA, Rep MHG, Hooibrink B, Kerckhof-Garde SR, Klein MR, et al. Phenotypic and functional separation of memory and effector human CD8+ T cells. *J Exp Med*. 1997;186(9):1407–18.
- Bretschneider I, Clemente MJ, Meisel C, Guerreiro M, Streitz M, Hopfenmüller W, et al. Discrimination of T-cell subsets and T-cell receptor repertoire distribution. *Immunol Res*. 2014;58(1):20–7.
- Nakamura R, La Rosa C, Tsai W, Lacey SF, Srivastava T, Seidel A, et al. Ex vivo detection of CD8 T cells specific for H-Y minor histocompatibility antigens in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Transpl Immunol*. 2014;30(4):128–35.
- Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, DosReis GA. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1995;154(2):744–52.
- Nunes MP, Andrade RM, Lopes MF, DosReis GA. Activation-induced T cell death exacerbates Trypanosoma cruzi replication in macrophages cocultured with CD4+ T lymphocytes from infected hosts. *J Immunol Baltim Md* 1950. 1998;160(3):1313–9.
- DosReis GA, Lopes MF. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 2009;104 Suppl 1:259–62.
- DosReis GA, Ribeiro-Gomes FL, Guillermo LVC, Lopes MF. Cross-talk between apoptosis and cytokines in the regulation of parasitic infection. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2007;18(1–2):97–105.
- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 1994;62(6):2614–8.
- Liew FY, Xu D, Chan WL. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol Lett*. 1999;65(1–2):101–4.
- Pereira-Carvalho R, Mendes-Aguiar CO, Oliveira-Neto MP, Covas CJF, Bertho AL, Da-Cruz AM, et al. Leishmania braziliensis-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. *PLoS One*. 2013;8(11):e81529.
- Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al*. 1998;31(1):139–42.
- Brelaz-de-Castro MCA, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VRA. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell Immunol*. 2012;279(2):180–6.
- Herbein G, Mahlknecht U, Batliwalla F, Gregersen P, Pappas T, Butler J, et al. Apoptosis of CD8+ T cells is mediated by macrophages through interaction of HIV gp120 with chemokine receptor CXCR4. *Nature*. 1998;395(6698):189–94.

33. Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-Neto MP, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. *Memórias Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(5):625–30.
34. Schriefer A, Wilson ME, Carvalho EM. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(5):483–8.
35. Baars PA, Siervo S, Arens R, Tesselaar K, Hooibrink B, Klenerman P, et al. Properties of murine (CD8+)CD27- T cells. *Eur J Immunol*. 2005;35(11):3131–41.
36. Meymandi SS, Javadi A, Dabiri Shahriar S, Meymandi MS, Nadjji M. Comparative histological and immunohistochemical changes of Dry type cutaneous leishmaniasis after administration of meglumine antimoniate, imiquimod or combination therapy. *Archives of Iranian Medicine*. 2011;14:238–43.
37. Mohajery M, Shamsian A, Mahmoodi M. Tc1 cells percentage in patients with cutaneous leishmaniasis before and after treatment with glucantime. *Iranian J Publ Health*. 2007;36:55–61.
38. Oliveira F, Bafica A, Rosato AB, Favali CBF, Costa JM, Café V, et al. Lesion size correlates with *leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 2011;85(1):70–3.

**Submit your next manuscript to BioMed Central
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



5.2 2ª Parte

A metodologia e os resultados obtidos na segunda etapa desta tese estão descritos a seguir.

5.2.1 Metodologia utilizada na 2ª parte

5.2.1.1 Casuística

Os ensaios experimentais foram realizados a partir de amostras de sangue periférico de 8 pacientes (que também foram incluídos na 3ª parte deste estudo) obtidas antes, durante e após a terapia antimonial, com o intuito de realizar um estudo longitudinal. Também foram avaliadas amostras de sangue periférico de oito IS.

5.2.1.2 Obtenção de material biológico

As amostras de sangue periférico foram coletadas através de punção venosa, em tubos contendo heparina, em um máximo de 40mL. A punção foi realizada pelos técnicos do laboratório do INI, FIOCRUZ. As células mononucleares de sangue periférico (CMSP) foram obtidas através de centrifugação em gradiente de Ficoll-Hypaque (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA). As alíquotas de células foram armazenadas em solução de criopreservação e acondicionadas em nitrogênio líquido para posterior utilização.

5.2.1.3 Avaliação da Produção de Perforina e de Interferon- gama Após Estimulação de CMSP *in vitro* com Antígenos de *L. braziliensis*

As amostras criopreservadas de um mesmo paciente, obtidas antes, durante e após o tratamento, foram descongeladas no mesmo momento para a realização do ensaio experimental. As CMSP recuperadas foram ajustadas para a concentração de $3,0 \times 10^5$ células/100 μ L de meio 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 (200 μ g/mL; Sigma), acrescido de 20 μ L de soro humano AB Rh⁺ inativado (Sigma Chemical Company, Saint Louis, MO, EUA) para um volume final de 200 μ L.

As CMSP foram cultivadas em placa de poliestireno de 96 poços de fundo U (Corning Inc., Tewksbury, MA, E.U.A.) sob estímulo de anti-CD28 (0,5 mg/mL) (Biolegend, San Diego, CA, EUA), na ausência (background, BG) e na presença de

antígenos de *L.braziliensis* (LbAg) (MHOM/BR/75/M2903), equivalente a 1×10^6 promastigotas metacíclicas/poço, por 24h em estufa a 37°C contendo 5% de CO₂. Seis horas antes do fim do cultivo foram adicionados GolgiPlug, contendo brefeldina A (BD Biosciences). Como controle positivo, as CMSP foram estimuladas por 6h com acetato de forbol miristato (*Phorbol Myristate Acetate* □ PMA) (10ng/mL) e ionomicina (1µg/ml) (Sigma Chemical Company).

Após o cultivo estas células foram submetidas a marcação de superfície com os seguintes anticorpos monoclonais (AcMo) para identificação das células NK, NKT, linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e duplo negativos (DN): anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 (Beckman Coulter, Kendon, FL, USA). Posteriormente, estas células foram fixadas e permeabilizadas, utilizando o kit Cytofix/Cytoperm (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA), e a seguir foram submetidas a marcação intracelular com AcMo anti-perforina (Beckman Coulter).

A cultivo por 24h foi determinado após ensaio cinético de 6h, 12h, 16h, 20h, 24h, 36h e 48h a fim de avaliar o pico de produção de perforina que contemplasse as células NK, NKT, linfócitos T CD8⁺, CD4⁺ e DN estimuladas *in vitro* com antígenos de *L. braziliensis* (LbAg).

5.2.1.3 Citometria de Fluxo

As amostras foram adquiridas no citômetro de fluxo Moflo Astrios *Cell Sorter* (Beckman Coulter), da Plataforma de Citometria de Fluxo, Núcleo de Purificação Celular (*Sorting*), IOC, Fiocruz, RJ em um mínimo de 50.000 eventos por amostra. Os limites das regiões nos *dot plots* e nos histogramas foram definidos com base em amostras não marcadas e amostras submetidas a marcação com AcMo isotípicos anti-IgG conjugados aos mesmos fluorocromos utilizados no ensaio. A compensação dos sinais interferentes de fluorescência foi baseada nas marcações simples e nos critérios de aproximação dos valores da intensidade média de fluorescência. Os dados citofluorimétricos foram analisados utilizando o *software* Kaluza v. 1.3 (Beckman Coulter).

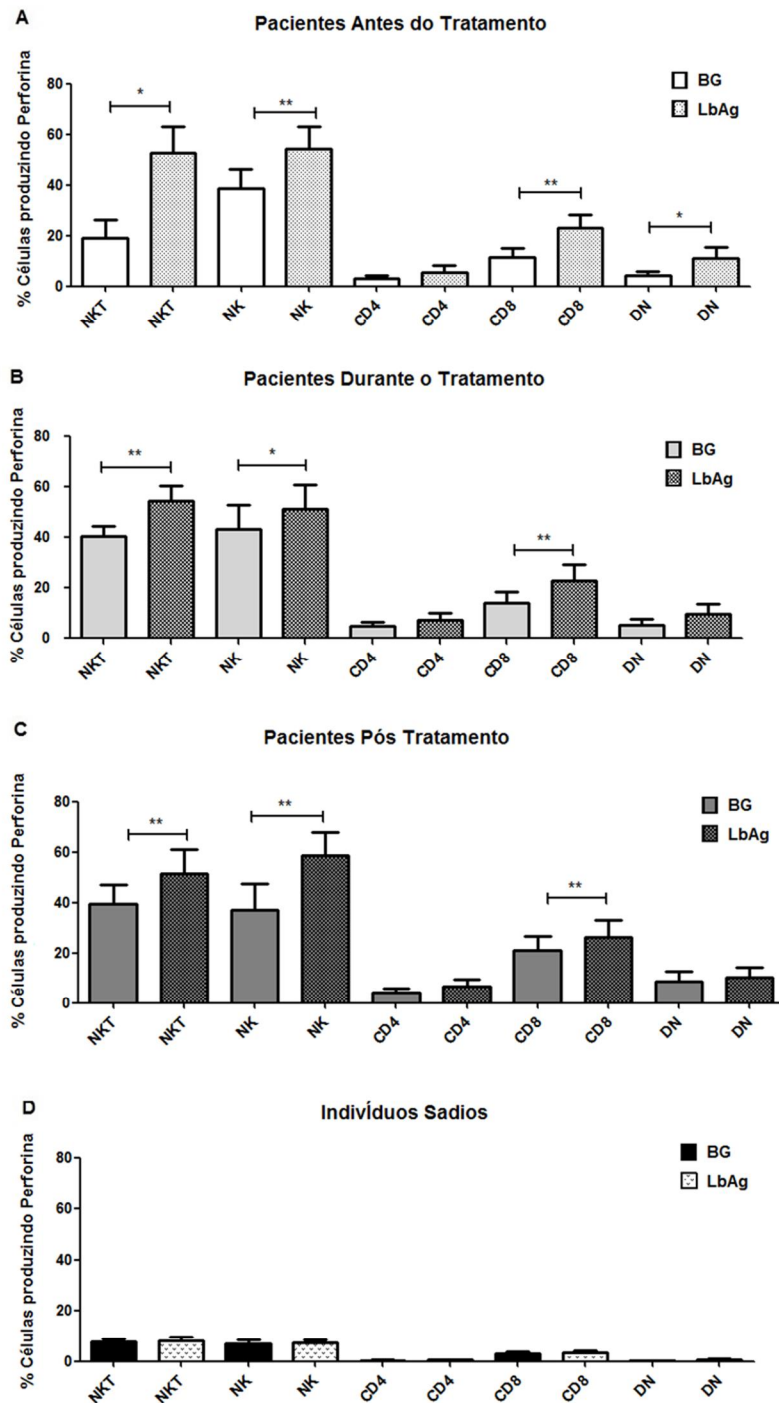
5.2.1.5 Análise Estatística

As análises de variância entre os indivíduos sadios e os grupos de pacientes foram realizadas através do teste ANOVA, não paramétrico (teste Kruskal-Wallis) e pós teste de Dunns. Os resultados obtidos de uma mesmo indivíduo foram avaliados

pelo teste pareado, não paramétrico de Wilcoxon. As análises de correlação foram realizadas através do teste de Spearman. Todos os cálculos estatísticos e representações gráficas dos dados foram obtidos através do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). Foram consideradas estatisticamente significantes as diferenças que apresentaram valores de $P < 0,05$.

5.2.2 Avaliação da Frequência de Células Responderas aos LbAg Produtoras de Perforina

Inicialmente nós avaliamos a frequência de células NK, NKT, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e DN produtores de perforina, cultivados *in vitro* na ausência (BG) e na presença de LbAg, dos pacientes antes, durante e após o tratamento, assim como dos indivíduos sadios (Figura 5.1).



	NKT	NK	CD4	CD8	DN
	BG/LbAg	BG/LbAg	BG/LbAg	BG/LbAg	BG/LbAg
PAT	19±7,3/52±10	38,5±7,8/54,4±8,5	3,1±1,1/5,6±2,5	11,5±3,6/22,9±5,5	4,3±1,6/11±4,5
PDT	40,3±4,4/54,5±5,6	43,2±9,4/51,3±9	4,7±1,7/7,3±2,8	14,1±4,2/22,9±6,1	5,1±2,2/9,8±3,9
PPT	39,5±7,4/51,4±9,6	37,1±10,1/58,6±9	4,1±1,5/6,5±2,7	21,2±5,3/26,1±6,8	8,7±8/10,4±4
IS	7,6±1,4/8,1±1,6	6,9±1,4/7,2±1,9	0,4±0,1/0,5±0,1	2,9±0,7/3,4±0,9	0,2±0/0,8±0

Figura 5.1: Frequência de células NKT, NK, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T duplo-negativos (DN) produtores de perforina cultivados por 24h na ausência (*Background* □ BG; barra lisa) e na presença de antígenos de *Leishmania braziliensis* (LbAg; barra hachuriada). (A) Pacientes antes do tratamento (PAT; n=8); (B) pacientes durante o tratamento (PDT; n=8); (C) pacientes pós tratamento (PPT; n=8); (D) indivíduos saudáveis (IS; n=8). Os dados foram descritos em média±erro padrão. *(P<0,05) e *(P<0,01). Valor de P obtido pelo teste t não paramétrico de Wilcoxon.

Para verificar a produção de perforina em resposta ao estímulo antigênico, foi realizada uma análise da frequência de cada população celular produtora de perforina na presença dos LbAg descontada daquelas que produzem perforina na ausência destes antígenos (BG).

Os resultados mostraram que durante e após o tratamento os pacientes apresentam uma menor frequência de células NKT respondedoras ao LbAg produtoras de perforina (PDT: 14,3% ± 2,8%; PPT: 10,7% ± 3,1%) quando comparadas a mesma população celular produtora de perforina antes da terapia (36,1% ± 8,6%), e a frequência de todos os grupos foi maior do que aquela observada nos IS (0,5% ± 0,2%) (Figura 5.2A).

As células NK produtoras de perforina também parecem ser moduladas pelo LbAg após o início da terapia já que a frequência das células produtoras de perforina é menor (PDT: 9,3% ± 3%) quando comparadas com as células dos PAT (12,5% ± 3,3%). Por outro lado, não observamos um padrão de resposta antígeno específica após a terapia (PPT: 11,4% ± 3,5%). Todos os grupos apresentaram maior frequência destas NK quando comparados aos IS (0,9% ± 0,7%) (Figura 5.2B).

Ao analisar a população de linfócitos T CD4⁺, nós não observamos nenhum padrão de produção de perforina em resposta aos LbAg ao longo da terapia. Embora a média entre os grupos seja semelhante, alguns pacientes apresentaram aumento da frequência destas células durante (PDT: 3,1% ± 1,4) e após a terapia (PPT: 2,4% ± 1,7%) (PAT: 2,4% ± 1,5%). Além Disso, não houve diferença estatisticamente significativa entre a frequência de linfócitos T CD4⁺ produtores de perforina dos IS (0,3% ± 0,4%) e dos grupos de pacientes (Figura 5.2C).

A frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de perforina em resposta aos antígenos diminuiu durante a terapia (PAT: 12,2% ± 3,8%; PDT: 6,5% ± 1,6%) e esta frequência parece ser mantida pelos PPT (4,9% ± 1,7%), enquanto os IS apresentaram menor frequência destas células respondedoras e produtoras de perforina (0,2% ± 0,3%) quando comparados aos PAT, PDT e PPT (Figura 5.2D).

Por fim, a frequência dos linfócitos T DN produtores de perforina em resposta aos LbAg parecem diminuir gradativamente ao longo da terapia (PAT: 9,4% ± 3,5%; PDT: 4,6% ± 1,8%) e evolução para a cura (PPT: 1,7% ± 0,4), sendo que a frequência destas células nos IS (0,5% ± 0,2%) foi menor somente quando comparada aos PAT e PDT (Figura 5.2E).

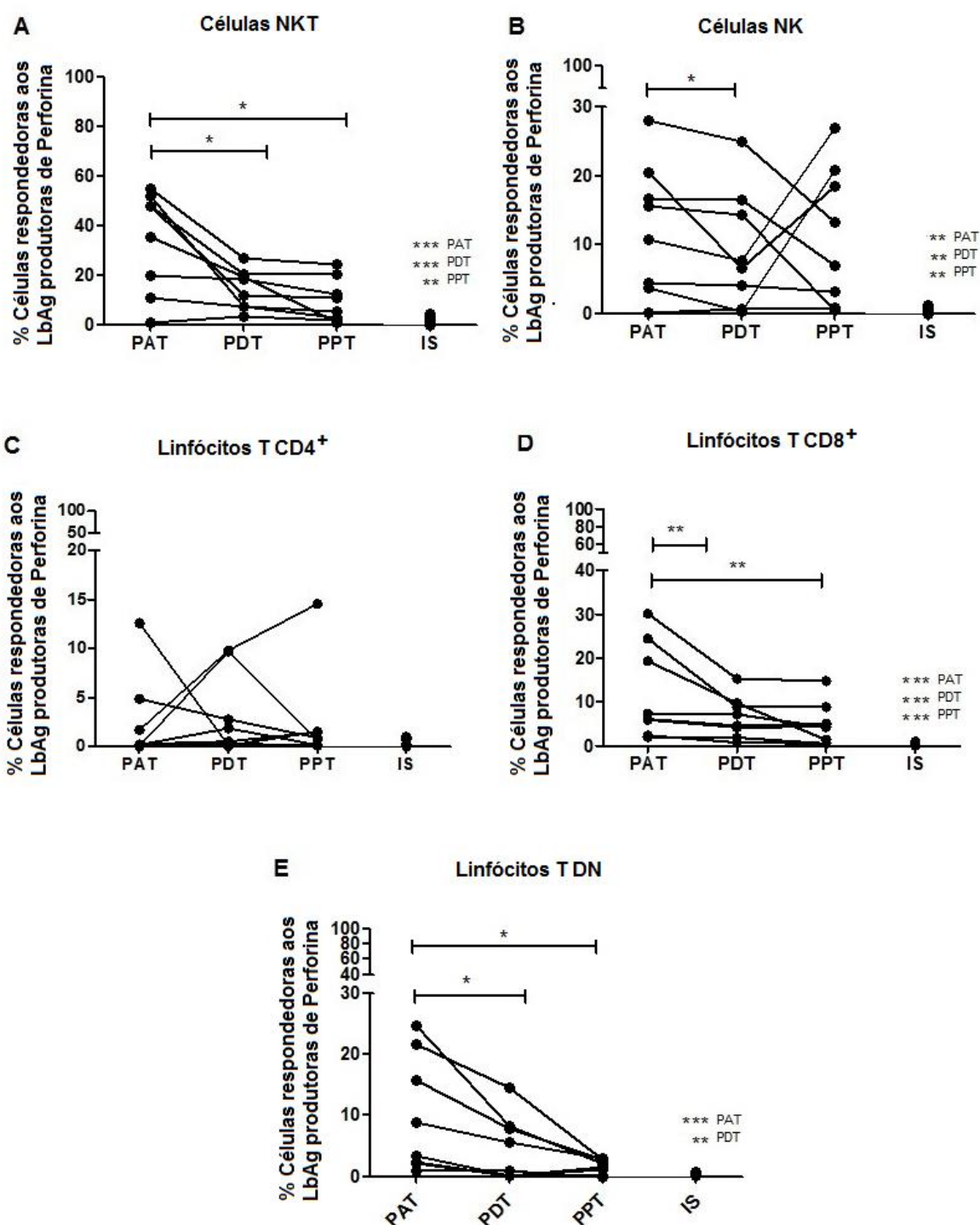


Figura 5.2: Frequência de células produtoras de perforina em resposta aos antígenos de *Leishmania braziliensis*. (A) células células NKT; (B) células NK; (C) linfócitos T CD4⁺; (D) linfócitos T CD8⁺ e (E) linfócitos T duplo-negativos (DN). Pacientes antes do tratamento (PAT; n=8); pacientes durante o tratamento (PDT; n=8); pacientes pós tratamento (PPT; n=8); indivíduos sadios (IS; n=8). **($P < 0,05$) e *($P < 0,01$). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de P obtido pelo teste t não paramétrico de Wilcoxon nas comparações entre os mesmos pacientes; e pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney* para as comparações entre a frequência dos IS com os grupos de pacientes.

5.2.3 Correlação entre a Frequência de Células Citotóxicas na Lesão e a Frequência de Células Citotóxicas obtidas do Sangue Periférico antes do Tratamento

A frequência das populações celulares citotóxicas na lesão dos pacientes (resultados obtidos na segunda etapa) foi correlacionada com a frequência dos mesmos tipos celulares, obtidas do CMSP dos mesmos pacientes de LC antes do tratamento. As análises de correlação foram realizadas entre a frequência das células CD107a⁺ da lesão e a frequência das populações celulares produtoras de perforina nas culturas *in vitro* na ausência de LbAg (BG); na presença de LbAg; e a frequência das células respondedoras ao LbAg (subtração das frequências em LbAg e BG).

Os dados obtidos não mostraram nenhuma associação entre a frequência das células de lesão e a frequência das populações celulares produtoras de perforina na ausência (BG) ou na presença de LbAg. Por outro lado, observamos correlações entre a frequência das populações celulares citotóxicas respondedoras aos LbAg e a frequência das populações celulares citotóxicas na lesão.

Nós observamos uma tendência de correlação positiva entre a frequência de células NKT, linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ produtores de perforina em resposta aos AgLb, e a frequência destas mesmas populações celulares citotóxicas na lesão dos pacientes de LC (Figura 5.3A, 5.3C e 5.3D, respectivamente). Por outro lado, a frequência de células NK produtoras de perforina em resposta aos LbAg mostrou-se inversamente proporcional a frequência de células NK citotóxicas na lesão ($r=-0.89$) (Figura 5.3B). Nós também observamos uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos T DN citotóxicos na lesão e a frequência de linfócitos T DN produtores de perforina em resposta aos LbAg ($r =0.73$) (Figura 5.3C).

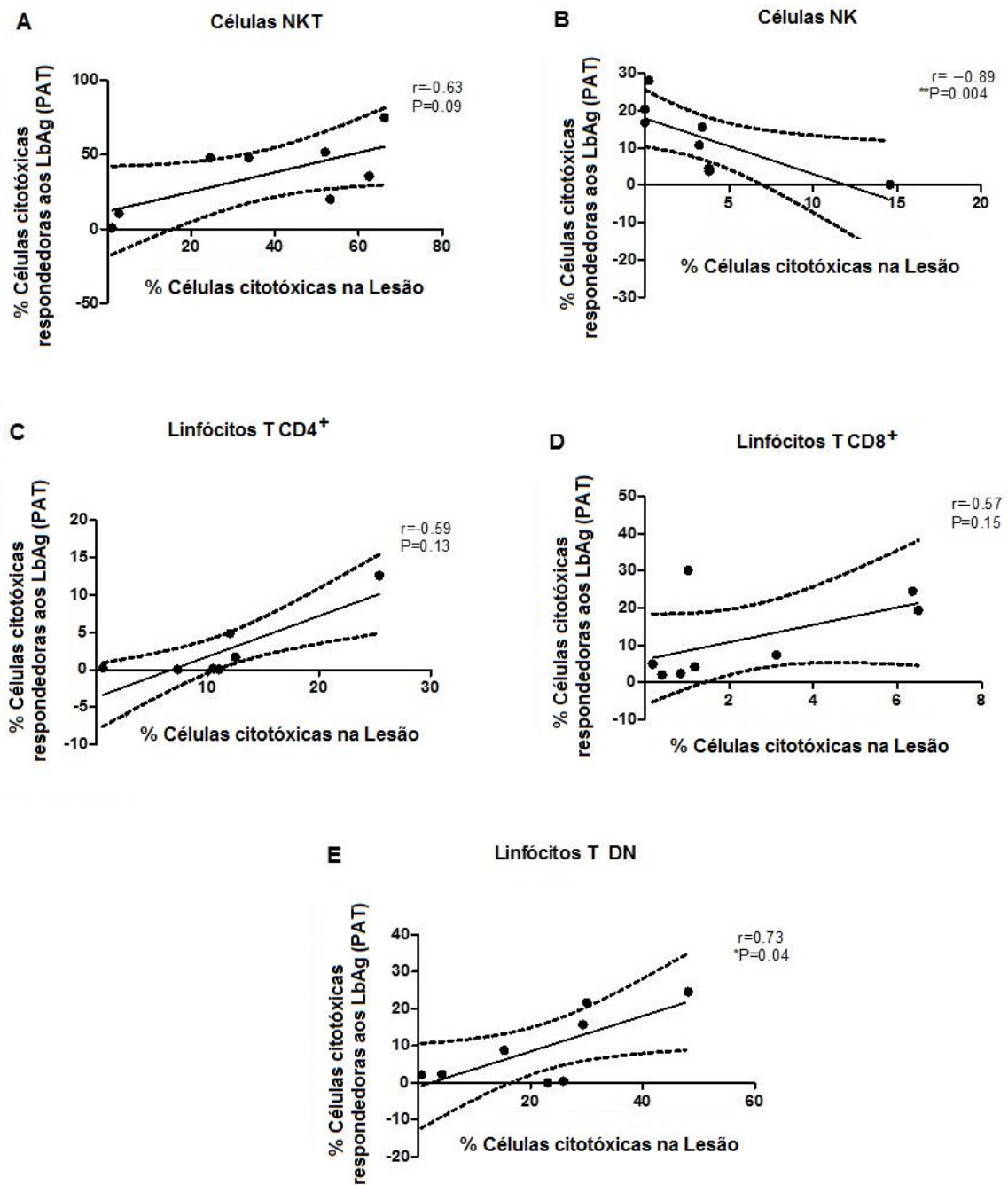


Figura 5.3: Análise de correlação entre o percentual de células citotóxicas (CD107a⁺) em lesão de PAT e o percentual de CMSP citotóxicas (produtoras de perforina) de PAT em resposta aos antígenos de *L. braziliensis*. (A) Células NKT; (B) células NK; (C) linfócitos T CD4⁺; (D) linfócitos T CD8⁺; (E) linfócitos T duplo negativos (DN). A linha central representa a mediana e a linha tracejada representa o intervalo de confiança de 95%. **($P<0,05$) e *($P<0.01$). Valor de P obtido pelo teste de Spearman. r = coeficiente de correlação.

5.2.4 Avaliação da Frequência de Células Respondedoras aos LbAg Produtoras de Interferon-gama

Nós também avaliamos a produção de IFN- γ em resposta ao estímulo antigênico. Para isto, o percentual de células produtoras de IFN- γ estimuladas com LbAg foi subtraído do percentual de células produtoras de perforina na ausência de LbAg (BG).

A frequência de células NKT antígeno-específicas produtoras de IFN- γ parece aumentar após o tratamento (PPT: 12,8% \pm 4,4%) já que antes da terapia há uma menor frequência destas células (1,1% \pm 15), assim como nos IS (2,4% \pm 0,6%), enquanto os PDT apresentaram uma média de 10,1% (\pm 5,4%) de frequência destas células, e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada ao compará-la a frequência das mesmas nos outros grupos estudados (Figura 5.4A).

Nós observamos baixas frequências de células NK produtoras de IFN- γ respondedoras aos LbAg nos PAT (0,8% \pm 0,3%), PDT (2,8% \pm 2,1%), PPT (8% \pm 3,4%) e IS (1% \pm 0,3%), e nenhuma diferença estatisticamente significativa ao comparar a média dos grupos, embora dois pacientes tenham apresentado um aumento da frequência destas células durante e após o tratamento (Figura 5.4B).

A produção de IFN- γ em resposta aos LbAg pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi maior durante (CD4: 2,1% \pm 0,7%; CD8: 6,8% \pm 1,2%) e após o tratamento (CD4: 3,2% \pm 0,9%; CD8: 6,7% \pm 1,1) quando comparada a frequência destas células antes da terapia (CD4: 0,8% \pm 0,3%; CD8: 2,5% \pm 0,9%) (Figura 5.4C e 5.4D, respectivamente). Interessantemente, a frequência destas células no IS foi menor somente quando comparada aos PDT e PPT (CD4: 0,5 \pm 0,1%; CD8: 0,6 \pm 0,1%) (Figura 5.4C e 5.4D).

Não foi observado um padrão de produção de IFN- γ em resposta aos LbAg ao longo da evolução para a cura pelas células DN, não havendo diferença da frequência destas células entre os PAT (0,9% \pm 0,6%), PDT (2,1% \pm 0,8%) e PPT (2,6% \pm 0,8%), enquanto a frequência destas células nos IS (0,1% \pm 0,1%) foi menor somente quando comparada aos PDT e PPT (Figura 5.4E).

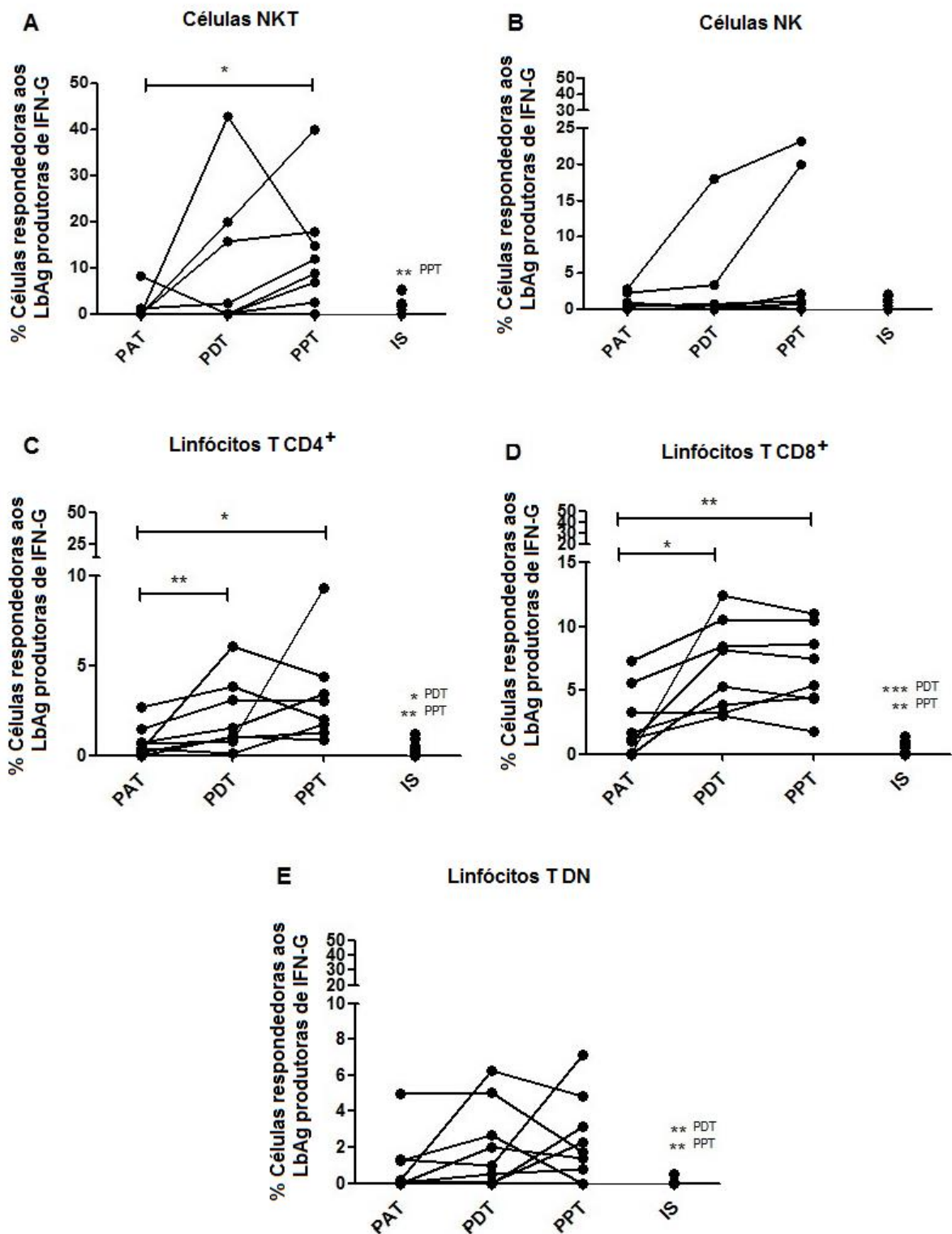


Figura 5.4: Frequência de células produtoras de Interferon-gama (IFN-G) em resposta aos antígenos de *Leishmania braziliensis*. (A) células NKT; (B) células NK; (C) linfócitos T CD4⁺; (D) linfócitos T CD8⁺ e (E) linfócitos T duplo-negativos (DN). Pacientes antes do tratamento (PAT; n=8); pacientes durante o tratamento (PDT; n=8); pacientes pós tratamento (PPT; n=8); indivíduos saudáveis (IS; n=8). **($P < 0,05$) e *($P < 0,01$). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de P obtido pelo teste t não paramétrico de Wilcoxon nas comparações entre os mesmos pacientes; e pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney* para as comparações entre a frequência dos IS com os grupos de pacientes.

5.3 3ª Parte

Na terceira parte nós demonstramos, no Artigo II (submetido), que nas lesões de LC, a citotoxicidade está associada ao dano tecidual e que nas lesões de LC este fenômeno é exercido principalmente por linfócitos T DN, células NKT e linfócitos T CD4⁺, e que os linfócitos T CD8⁺ as células NK e os linfócitos T DP citotóxicos também participam desta resposta.

Artigo II (submetido ao *Journal of Clinical Immunology*)

Título: Double negative CD4⁻CD8⁻T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic populations in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Autores: Raquel FERRAZ^{1, 2}; Clarissa F. CUNHA¹; Maria Inês F. PIMENTEL⁴; Marcelo ROSANDISKI LYRA⁴; Tatiana PEREIRA-DA-SILVA⁵; Armando O. SCHUBACH⁴; Alda Maria DA-CRUZ³; Álvaro Luiz BERTHO^{1, 2, *}

*Corresponding author E-mail: alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br

¹ Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Laboratory of Surveillance for Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectology, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁵ Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

*Corresponding author E-mail: alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br

Double negative CD4⁺CD8⁺T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic populations in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Short Title: Cytotoxicity in lesions of cutaneous leishmaniasis

Raquel FERRAZ^{1,2}

E-mail: raquelferraz@ioc.fiocruz.br

Clarissa F. CUNHA¹

E-mail: clarissafc@ioc.fiocruz.br

Maria Inês F. PIMENTEL⁴

E-mail: maria.pimentel@ini.fiocruz.br

Marcelo R. YRA⁴

E-mail: rmarcelo.lyra@ini.fiocruz.br

Tatiana PEREIRA-DA-SILVA⁵

E-mail: st8814@ioc.fiocruz.br

Armando O. SCHUBACH⁴

E-mail: armando.schubach@ini.fiocruz.br

Alda Maria DA-CRUZ³

Email: alda@ioc.fiocruz.br

Álvaro Luiz BERTHO^{1,2,*}

E-mail: alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br

¹ Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

² Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

³ Laboratory of Surveillance for Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectology, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁴ Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

⁵ Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

* **Corresponding author:** Dr. Alvaro Luiz Bertho, Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Pavilhão Leônidas Deane, sala 408-A, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ e células NKT como principais células citotóxicas em lesões de leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Resumo: A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada pela destruição tecidual e lesão ulcerada. A infecção de macrófagos dermais e células dendríticas induz uma intensa resposta imune celular e inflamação tecidual, na qual os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos teriam um papel prejudicial. Para melhor entender a citotoxicidade como um mecanismo que poderia contribuir para o dano tecidual, nós investigamos a frequência de linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺, linfócitos duplo negativos (DN), linfócitos duplo positivos (DP), células NK e células NKT citotóxicos em lesão de pacientes de LC causada por *Leishmania braziliensis*. Os fragmentos de tecido obtidos das lesões de 18 pacientes de LC foram macerados e submetidos a etapas de lavagem e filtração. O sobrenadante do macerado foi submetido a quantificação de granzima B, IFN- γ e TNF- α por *cytometric bead array*; e as células foram submetidas a um protocolo citofluorimétrico de marcação com 7-AAD e com anticorpos monoclonais anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 e anti-CD107a. Nossos resultados sugerem que uma intensa atividade citotóxica e altas concentrações de IFN- γ e de TNF- α contribuem para um maior dano tecidual. Os Linfócitos T DN, as células NKT e os linfócitos T CD4⁺ foram as células citotóxicas (CD107⁺) com maior frequência nas lesões, representando mais de 80% do total de células citotóxicas, enquanto as células NK, e os linfócitos T CD8⁺ e T DP citotóxicas foram observadas em baixos percentuais. Nós concluímos que embora a citotoxicidade pareça contribuir para o dano tecidual, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos teriam pouca influência nesta resposta, enquanto os linfócitos T DN e as células NKT seriam as principais células citotóxicas nas lesões de LC causada por *L.braziliensis*.

ABSTRACT

Purpose. Cutaneous leishmaniasis is characterized by infection of dermal macrophages and dendritic cells resulting in intense immune-mediated-tissue inflammation and a skin ulcer with elevated borders, which heals spontaneously or after antimonial therapy. The aim of this study is to better understand the role of cytotoxicity-mediated mechanisms, that occur during immune response at lesions of cutaneous leishmaniasis (CL) patients, considering distinct cytotoxic cell populations, such CD8⁺, CD4⁺, CD4⁻CD8⁻ (double-negative - DN) and CD4⁺CD8⁺ (double-positive - DP) T lymphocytes, as well as NK and NKT cells. *Methods.* After maceration of lesion tissue obtained by biopsy, we performed flow cytometry phenotyping staining protocol, including assessment of CD107a, and CBA technique to evaluate cytotoxic populations and granzyme B concentration, respectively. *Results.* The flow cytometric analysis revealed that NKT cells are the major cell population committed to cytotoxicity in CL lesion, although we also observed high frequencies of cytotoxic CD4⁺ and DN T cells. Further analysis also showed that DN T cells represent 44% of total cytotoxic-cell population in CL lesion, followed by NKT with approximately 25%, while NK and CD8⁺ T cells represent only 3 and 4 % of cytotoxic-cell pool, respectively. *Conclusions.* The cytotoxicity-mediated mechanisms in the pathogenesis of CL seem to be influenced in lesion milieu, mainly by DN T and NKT cells. These findings invite us to rethink the role of classical-cytotoxic NK and CD8⁺ T cells in CL, opening a critical look to the cytotoxic events in this disease, considering the variety of cytotoxic cell populations.

Keywords: flow cytometry; cytotoxicity; CD107a; Double-negative T lymphocytes, NKT cells; lesion; human cutaneous leishmaniasis; *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Introduction

Leishmaniasis is a group of diseases caused by different species of protozoan parasites from the genus *Leishmania* and is ranked as a major neglected tropical disease in the world. In Brazil, American tegumentary leishmaniasis (ATL) was registered in all states, where it is caused mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, leading to a spectrum of clinical, immunological and histopathological manifestations, ranging from self-healing localized cutaneous leishmaniasis (CL) to destructive mucosal leishmaniasis (ML). Cutaneous leishmaniasis is the most frequent clinical form of ATL and is characterized by parasitic infection of dermal macrophages resulting in intense immune-mediated tissue inflammation and a skin ulcer with elevated borders, which heals spontaneously or after antimonial therapy [1,2]. *Leishmania*-parasite induces a chronic granulomatous inflammatory disease with a recruitment of lymphocytes, plasmacytes and macrophages in skin [3]. Some authors have been demonstrated that the pathogenesis of ATL is dependent of cellular-mediated immune response and it seems to influence the clinical outcome of disease either by T-lymphocytes subset effector functions and/or cytokine profiles [4-8]. The picture of the cytokines profiles today is more complex than a biased

TH1 response leading to a control of parasite replication and a TH2 response leading to an exacerbated infection [9]. Thus, the immune response developed by host can contribute to protection but may also be deleterious and favor the establishment and persistence of disease. CL caused by *L. braziliensis* leads to a high rate of clinical cure and subsequent immunologic protection. Studying CL lesions, we may postulate the nature of the immune response that contributes to the formation and persistence of lesion or to healing process.

Although CD4⁺ T cells are clearly an important source of cytokines for activation of leishmanicidal activities, it is equally clear that several other cell types play important roles in the microenvironment of leishmaniasis lesions and are important for both initiation and differentiation in effective immune response. Some reports have been shown that CD8⁺ T cells may also play an important role in this disease mainly as IFN- γ producer and as cytotoxic cell. Besides extensively studies of the role of CD8⁺ T lymphocytes there is still controversy regarding the beneficial or deleterious cytotoxic effect of these cells [10-14].

It is important to highlight that the majority of studies about the immune response in CL are performed with samples originated from peripheral blood of patients, however the immunopathogenic events happens *in situ*. In CL, cytotoxic CD8⁺ T cells which kill infected macrophages have been associated with tissue damage as well as in parasite killing, while the enrichment of *Leishmania*-reactive CD8⁺ T cells seems to play a role in the healing process [15,16]. Earlier observations from our group have shown an enrichment of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory infiltrate, suggesting a recruitment and a enrolling in the healing process of CL lesion [11,17-20]. Others authors have associated CD8⁺ T lymphocytes to tissue injury in CL and ML [8,12,13,21]. In a study of cell population in CL lesion, the cell infiltration and pathology of CL suggest that tissue damage is a consequence of the immune response including T-cell-mediated cytotoxicity rather than the parasites [22]. Other authors showed that granzyme B production is an important pathway involved in cytolysis of *L. braziliensis*-infected monocytes, however that induces tissue damage in CL patients [13]. Furthermore, besides CD8⁺ T lymphocytes, other cell populations, such as NK and NKT, also have important cytotoxic functions and could influence the development of disease or lead to a healing process. Thus, the controversy about the role of cytotoxicity in the immunopathogenesis of ATL needs to be clarified.

Due to different cell population playing cytotoxic function, such NK cells, NKT, CD4⁺, CD8⁺, double-positive and double-negative T lymphocytes, become essential to include these cell in the study of cytotoxicity. Since the lesions of CL patients are the defining characteristics of the clinical course of the disease, it is important to determine the role of cytotoxic activity in the lesion environment. Some authors have previously shown a heterogeneity of T-cell subset distributions in leishmaniasis lesion [6,16,23]. Other reports concerning *in situ* immunopathological studies on leishmaniasis added contributions for understanding the local immune response, although the histopathological patterns can differ within the same lesion depending on the site of ulcer or even the duration of the disease [24-26]. Thus, the cell subset and cytotoxic profile that effectively predominates in lesions still need to be elucidated.

The results we discuss here are based on investigation by flow cytometry of frequency and distribution of T lymphocytes, NK and NKT cells in lesions from patients with first manifestation of CL as well as the cytotoxic activity at local environment through CD107a staining and granzyme B quantification. We also investigated the correlation between immunological findings and clinical features, in order to establish protector or inflammatory profiles.

Methods

Subjects

Eighteen patients fulfilled the inclusion criteria of a clinical and epidemiologic history compatible with CL and all of them were diagnosed to leishmaniasis and acquired the disease in *L. braziliensis*-endemic areas in Rio de Janeiro, Brazil [2]. All of them were recruited at Leishmaniasis Surveillance Laboratory, Evandro Chagas National Institute of Infectology (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. The main clinical and features of studied patients are described in Table 1. The following criteria were used for diagnosis: (i) positive Montenegro skin test (MST); (ii) direct detection of parasites by microscopic examination; (iii) isolation of Leishmania parasites by culture fragment in Nicolle-Nevy-McNeal (NNN) medium; and/or histopathologic analysis of the inflammatory infiltrate. We maintained the biopsy lesions fragments in PBS plus antimicrobials (penicillin and streptomycin) for a maximum of 4h before being processed. The species of isolated parasite were characterized by isoenzyme electrophoresis profiles [27]. All patients were submitted to meglumine antimoniate treatment according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health.

Ethics statement

This study was approved by National Ethical Clearance Committee of Brazil (CONEP) as well as by the Evandro Chagas Clinical Research Institute (CEP-INI/FIOCRUZ 029/2012), Brazil. All of them adhere to the principles established in the Declaration of Helsinki on human subject research. Before blood collection and lesion biopsies, all volunteers read and signed the informed consent.

Collection and processing of tissue sample

Incisional skin biopsy was performed both for the diagnosis purposes and for experimental procedures. Cells were obtained from lesions as described elsewhere. In brief, after local anesthesia with lidocaine, the biopsy was performed using a 6mm punch including 1/3 edge of the lesion. The obtained fragment was promptly stored in RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with HEPES (10mM), L-glutamine (1,5mM), 2-mercapto-ethanol (1mM), penicillin (200UI), and streptomycin (200µg/mL) enriched with 20% of fetal calf serum (all reagents from Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, U.S.A.) for up to 4h at 4°C. We placed the skin specimen, stripped of subcutaneous fat, in a cell dissociation sieve

and macerated on a Petri dish with 64µm mesh filter containing supplemented RPMI 1640 medium. After, we transferred the cell suspension with macerated tissue to 15-mL Falcon tube and allowed to rest for 3 minutes for decanting large epithelial cells, dermal cells and fat tissue. Finally, we collected the supernatant, washed once and filtered into a tube with cell strainer cap of 35µm nylon mesh (BD Biosciences). Additionally, we resuspended the cells in PBS containing 0.1% sodium azide and 2% fetal calf serum (PBSaz, Sigma-Aldrich, USA) for counting and adjusted to 1×10^6 cells per 50 µL.

Cytometric Beads Array (CBA)

The Cytometric Bead Array (CBA) Human Flex Set system (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) provide a method of capturing a soluble analyte or set of analytes with beads of known size and fluorescence, making it possible to detect analytes using flow cytometry. Each capture bead in a BD CBA kit has been conjugated with a specific antibody. The detection reagent provided in the kit is a mixture of phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies, which provides a fluorescent signal in proportion to the amount of bound analyte. When the capture beads and detectors reagent are incubated with an unknown sample containing recognized analytes, sandwich complexes are formed. The kit used in this study contain three bead populations with distinct fluorescence intensities have been coated with capture antibodies specific for granzyme B, IFN- γ and TNF- α . After acquiring samples on a BD FACSCallibur flow cytometer, we use FCAP Array software (BD Biosciences) to generate results in graphical and tabular format.

Flow Cytometry

Flow cytometry staining protocol was performed as previously described [11]. Briefly, after collection and processing of tissue specimen, cells were stained for surface markers with a panel of monoclonal antibodies (MAbs), as follows: anti-CD3; anti-CD56; anti-CD8 (all Beckman Coulter, Kendon, FL, USA); anti-CD4 and anti-CD107a (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA), and stained with 20 µg/mL of 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter) for viability evaluation, in PBSaz. After 20 minutes on ice, protected from light, we washed cells once and incubated with BD FACS lysing solution (BD Biosciences) to lyse erythrocytes.

We acquired five hundred thousand events in each sample run in MoFlo Astrios Cell Sorter Flow Cytometer (Beckman Coulter) and data were analyzed using Kaluza 1.3 software (Beckman Coulter). This staining panel and gate strategy allowed us to evaluate the distribution of six different populations: CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes; CD4⁻CD8⁻ double-negative T lymphocytes (DN); CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) T lymphocytes; NK cells; NKT cells (Figure 1); as well as cytotoxic phenotype of these cells through the CD107a staining. First, we created a forward scatter (FSC) vs side scatter (SSC) dot plot (Figure 1A) to encompass lymphocyte population. We also used dot plots of side scatter in Height, Area and Width parameters in order to remove doublets and debris from analysis

(Figure 1B and 1C). Besides, we used 7-AAD to exclude dead cells (Figure 1D). In this manner, based on CD56 vs CD3 dot plot we defined T lymphocytes, NKT and NK cells (Figure 1E). Thus, based on CD3⁺ T gate we identified the CD4⁺, CD8⁺, DN and DP cells (Figure 1F).

Afterwards, we performed two different approaches to determine the cytotoxic activities in CL lesion milieu: first, based previous gate created for define cell populations (NK and NKT cells; CD4⁺, CD8⁺, DN and DP lymphocytes) we analyzed CD107a frequency in each population (Figure 2). Second, based on live cells, we created a gate encompassing all CD107a⁺ cell population and then evaluated the distribution of NK and NKT cells, as well as, CD4⁺, CD8⁺, DN and DP T lymphocytes (Figure 3).

The limits for the regions in dot plots and histograms were always set based on non-staining cells and on isotype controls; and based on single labeling samples we performed the color compensation.

Statistical analysis

For statistical analyses between two groups at a time, we applied Mann-Whitney *U* test. For statistical analyses between more than two groups, we used one-way ANOVA test and Dunn's posttest. We also used a Spearman's rank correlation test. Correlations and intergroup differences were statistically significant when $P < 0.05$. We used GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) for all statistical calculations and graphical representations.

Results

Frequencies of cell populations on lesions of cutaneous leishmaniasis patients

Herein we focus our analysis on cellular populations that participate directly in the immune response, specifically those that exert cytotoxic activities. For this, we analyzed by flow cytometry the frequencies of NK and NKT cells; and T lymphocytes, including CD4⁺, CD8⁺, DN and DP cells. Regarding T lymphocyte populations, we observed that DN T lymphocytes showed the highest frequency of cells (31.4 % ± 4.6%), followed by CD4⁺ (21.4% ± 2.8%), CD8⁺ T lymphocytes (14% ± 3.3%) and DP cells (7.0% ± 2.5%). NKT cells represented 11.5% ± 3.4% of total cell populations and NK cells 9.4% ± 2.3%. The frequency of DN T cells was significantly higher than NK ($P < 0.001$), NKT ($P < 0.01$) and DP T cells ($P < 0.001$), while the frequency of CD4⁺ T lymphocytes was higher than NK ($P < 0.05$) and DP T cells ($P < 0.05$) (Figure 4).

Frequencies of cytotoxic cell populations on lesions of cutaneous leishmaniasis patients

In order to verify which cell population would be more committed with cytotoxicity-mediated events in the lesion microenvironment, we performed a flow cytometric analysis based on gate encompassing each cell population defined and then evaluated the frequencies of CD107a⁺ cells. We observed a highest

percentage of CD107a⁺ NKT cells (27.9% ± 5.3%) comparing to others cell populations, suggesting that NKT cells are the cell population most committed to cytotoxicity. In turn, DN T (15.4% ± 2.8%) and CD4⁺ T lymphocytes (13.5% ± 2.8%) showed similar frequencies to each other and lower percentages comparing to NKT. CD107a⁺ NK and DP T cells showed lower frequencies when compared to NKT, CD4 and DN T cells (5.2% ± 2.2% and 3.04% ± 0.8%, respectively). Interestingly, CD8⁺ T lymphocytes seem to be the less committed cytotoxic population, showing the lowest expression of CD107a (1.8% ± 0.7%) (Figure 5). Due to significant differences among populations with higher and lower frequencies of cytotoxic cells, these results may be seen as two groups: those more committed and those less committed to cytotoxicity in CL lesions, since NKT cells, DN and CD4⁺ T lymphocytes showed higher frequencies of cytotoxic cells, comparing to NK cells, DP and CD8⁺ T lymphocytes (Figure 5).

Distribution of cell populations evaluated from total cytotoxic cells present on lesions of cutaneous leishmaniasis patients

In order to verify which cell populations would show more distribution in the pool of cytotoxic cells in lesion microenvironment, we performed a flow cytometric analysis based on gate encompassing all CD107a⁺ cells and then calculated the distribution of each cell population studied (Figure 3). We observed that the majority of cell population present in the total CD107a⁺ cells in CL lesion are DN T lymphocytes (44% ± 4%). NKT cells represent the second one (25% ± 4.1%), followed by CD4⁺ T lymphocytes (14% ± 3.1%) and DP cells (10% ± 4%) while the lowest were NK and CD8⁺ T lymphocytes (3% ± 1.6% and 4% ± 1.3%, respectively) (Figure 6).

Correlation analysis between frequencies of CD107a⁺ cells, production of granzyme B, IFN- γ , TNF and clinical features.

In order to verify if there was a correlation between the cytotoxicity and clinical features, we performed a correlation analysis between the total frequency of cells expressing CD107a, granzyme B production and lesion size, as the main clinical feature. Furthermore, we also evaluated a possible association between pro-inflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF and lesion size. We observed a positive correlation between the frequency of cytotoxic-CD107a⁺ cells and the production of granzyme B at the lesion site ($r=0.79$; $P=0.01$) (Figure 7A). We also observed that the lesion size was positively correlated with granzyme B production ($r=0.80$; $P=0.005$) (Figure 7B); frequency of cytotoxic-CD107a⁺ cells ($r=0.60$; $P=0.04$) (Figure 7C); IFN- γ concentration ($r=0.86$; $P=0.001$); and TNF concentration ($r=0.83$; $P=0.003$).

Discussion

The lymphocytes are the predominant mononuclear cell population in leishmaniasis lesions and the study of immunopathogenesis in CL has been mainly based on the determination of the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes and cytokine productions. The role of CD8⁺ T lymphocytes in protective and pathological responses is still unclear. Earlier observations from our group have shown an enrichment of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory infiltrate, suggesting a cell recruitment to CL lesion environment and a commitment of this cell population with the lesion resolution [11,17-20]. In controversy, others authors have associated CD8⁺ T lymphocytes to tissue damage both in CL and ML[8,12,13,21]. In murine models, CD8⁺ T cells are important in control of the pathogen but also implicated in dermal pathology [30]. Besides CD8⁺ T lymphocytes, other cell populations, such as NK and NKT cells and DN, DP and CD4⁺ T lymphocytes, also have important cytotoxic functions and could influence the progression of disease or lead to a healing process. Our results strengthen the knowledge about the local immune response and the role of these cytotoxic-cell populations at CL lesion site. They will be critical since any intervention involving modulation of specific cell populations is needed for mounting vaccine and new therapeutic protocols.

Previous *in situ* immunopathological studies in leishmaniasis have improved our knowledge by characterizing the cellular composition within the skin inflammatory infiltrate, using confocal or fluorescent microscopy [22,25,26,31,32]. Flow cytometry (FCM) has been extensively applied and the majority of reports are based on samples obtained from peripheral blood of patients [11,33-37]. However, it is known that lymphocytes are recruited from blood into lymph nodes, primed with antigens and migrated into lesion sites, thus frequencies of antigen-specific T cells is much higher in leishmaniasis lesions than in blood [15,38,39]. In the present report, we used FCM to characterize the cellular immune response in CL-lesion environment, focusing on six distinct cytotoxic-cell populations. Tissue samples from CL lesions have a limited frequency of lymphocytes compared to blood samples, which could compromise a multigate-strategy analysis. Thinking about this issue and to optimize the FCM approach, we standardized a protocol including cell retrieval from tissue through optimization steps of maceration, washing and lysis of erythrocytes, in order to clean samples and prevent from tissue debris and clumps. Some FCM protocols defined the CD8⁺ T lymphocytes without NK and NKT exclusion, based only on CD8 molecule expression. Thus, became worthy to define NK, NKT through a double staining of CD3 and CD56 and a simultaneous phenotyping analysis of CD8 or CD4 T cells. This strategy also avoids a misinterpretation of FCM analysis due to the expression of CD8 and/or CD4 molecules by NKT cells. Our data showed that the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are pretty similar in the lesion-inflammatory, though this similarity depends of clinical profiles of patients. Even with this similarity, we observed that CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes showed different commitment in the local cytotoxicity.

DP T cells were observed in normal tissue and in multiple sclerosis skin lesion, showing regulatory functions [40,41]. Herein, we observed that this cell population have a low frequency in CL lesion and their presence in lesion may indicate that these cells could participate of local immune response and could be recruited in response to inflammatory microenvironment. Actually, the

recruitment of these cells to skin is not elucidated and in periphery, DP T cells seem to exist as a mature population and it has been suggested that these cells can be derived from a CD8⁺ T cell that further express CD4 [42,43].

Low frequencies of NK cells were also observed, mainly when the frequencies of CD4⁺ and DN T lymphocytes were compared. This observation was also demonstrated by others [44] and, at least in ML lesions, there were higher frequencies of NK cells in relapses cases when compared to cured cases, suggesting that NK frequencies could be a suitable protection/prevent prognostic marker [45]. Some attention has been dedicated to the role of NK and CD8⁺ T lymphocytes in CL, assuming that these cells are the main cytotoxic populations. The role of NK in CL has been associated to both pathology and protection. Some authors suggests a protector role through lysis of extracellular promastigotes and infected macrophages [46,47]. Nevertheless, there is evidence that cytotoxic NK cells contribute to exacerbation of tissue damage [48]. We observed that only 5% of NK cells express CD107a, which represents 3% of all cytotoxic cells present in CL lesion. These findings show a weak commitment of NK cell population with cytotoxicity. These cells have a poor influence in the cytotoxicity that occur in lesion environment, since, considering the distribution of total cytotoxic cells, NK are the minority cells.

In CL murine models, NKT cells seem to block parasite expansion and also drive the immune response according to the cytokines produced [49,50]. In human studies, NKT cells play critical role in initial immune responses in malaria, in preventing autoimmunity, in protection against neoplasia and in fighting against viral pathogens [51,52]. In visceral leishmaniasis, NKT cells seem to play a dual role depending on their subset: CD4⁺NKT cells show a pathogenic role and is accumulated at the infection site, and CD8⁺NKT cells may be protective in contact with target cells [53]. However, there is no published report about the role of NKT cells in human tegumentary leishmaniasis and no information regarding the distribution of these cells in the CL lesions at all. NKT cells represent the fourth major cell population found in CL lesions and are the most committed with cytotoxicity. Our group have recently observed a strong evidence regarding the involvement of CD8⁺ T and CD4⁺ T lymphocytes, NK cells and NKT cells (and their subsets) in the cytotoxic response in peripheral blood of CL patients before, during and after antimonial therapy (Cunha, CF - personal communication). Authors suggest an involvement of different NKT subsets in CL healing process. Our results point to an imperative participation of NKT cells in localized immune response, due to cytotoxic commitment of this cell subset and the number of cytotoxic cells existent in the lesion, since NKT represents the second most current cytotoxic-cell population in CL lesion environment.

Other important cell population observed in an unprecedented way in CL lesion is the CD4⁻CD8⁻ double-negative (DN) T lymphocytes. In addition to being the cell population with higher frequency, these cells have an important expression of cytotoxic-CD107a⁺ phenotype. In experimental model, DN T cells seem to be important players in protective primary and secondary anti-*L. major* immunity [54]. In humans, some authors described the immunoregulatory potential of DN T cells in CL and reinforced their role in both protection and pathology. Despite it has been described as a minority subpopulation in peripheral blood, DN exhibits high-activated profile in active CL, being the second

most prevalent producers of inflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF. Furthermore, DN could be subdivided into T cells expressing CD45RO⁺TCR, which may be involved in an inflammatory response and DN cells expressing CD45RA⁺TCR, which produce a biased regulatory environment [5,33,35]. Due to DN T cells are the most prevalent cytotoxic cells observed in CL lesion, we could hypothesize that, if the cytotoxicity-mediated mechanisms lead to tissue injury, it could be addressed to a nonspecific lysis played by DN T cells. Despite the high amount of these cytotoxic cells in lesion site, a great number of them are non-cytotoxic DN cells. Therefore, it is possible that DN T cells play a dual role, as cytokine producers - inflammatory or regulatory - and as cytotoxic cells. Our report reinforces their role in CL and showed a strong participation of these cells in cytotoxicity that happens actively at CL lesion milieu.

The role of CD4⁺ T lymphocytes in CL is well established by driving the immune response according to the antigen presentation and profiles of cytokines, nevertheless few authors have dedicated attention to a cytotoxic role of these lymphocytes. Recently, our group observed, in peripheral blood, that cytotoxic CD4⁺ T cell could be involved in healing process of CL patients (personal communication). Herein, we observed that this CD4⁺ T cell population is present in CL lesion in a significant frequency, interestingly higher than classical-cytotoxic NK and CD8⁺ T cell. CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity was suggested by others as a mechanism that contribute to viral control [55], thus, we may speculate that cytotoxic CD4⁺ T cells could participate in immune response contributing to the control of parasites in CL lesion.

It is important to note that a positive correlation between frequency of CD107a⁺ cells, granzyme B production and lesions size shows that cytotoxicity is associated to tissue damage and strengthens the direct relationship between these parameters. Nevertheless, beyond cytotoxicity, tissue damage seems to be associated with other pro-inflammatory factors, since the larger lesion size are correlated with the higher amount of IFN- γ and TNF.

In summary, although various reports emphasizes the key role of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes in tissue damage of CL [8,12,15], we are unable to reinforce this hypothesis since, at least in lesion environment, our results show that CD8⁺ T cells represents the population less committed to cytotoxicity, with the lowest percentages of cytotoxic cells. Furthermore, taking into account the pool of cytotoxic cells, only 4% of them are CD8⁺ T lymphocytes. Based on our results, we are not suggesting that CD8⁺ T lymphocytes do not have an immunomodulatory role, but we may propose that, tissue damage mediated by cytotoxicity in CL lesions seems to be more influenced by CD4⁺ T lymphocytes, NKT cells and mainly by DN T lymphocytes.

Conclusion

We concerned our investigation in cytotoxicity-mediated mechanisms, which would be happening in cutaneous lesion environment. We have thus showed, for the first time, the distribution and commitment

of six distinct cytotoxic populations. We suggest that cytotoxicity could contribute to tissue damage in CL. Furthermore, we can postulate that the major sources of cytotoxic activity are DN T lymphocytes, NKT cells and CD4⁺ T lymphocytes, which comprise 80% of all cytotoxic cell, although cytotoxic NK, DP and CD8⁺ T cell could be seen in these lesions. This fact opens our minds to look at cytotoxicity as a phenomenon that should be further explored, not only in the classical-cytotoxic NK and in CD8⁺ T cells. In addition, we strongly point a key role to DN and NKT cytotoxic cells in local immune response. Due to the complexity of the interaction between human and *Leishmania*, the study of immunopathological mechanisms that happens in human naturally infected by *Leishmania* is of utmost importance, if we hope to develop effective vaccines and alternative immunotherapeutic treatments in the future.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ for availability to flow cytometry acquisitions (MoFlo ASTRIOS Cell Sorter, Beckman Coulter, FL, USA). This research was supported in part by an internal funding from IOC-FIOCRUZ and PROEP-CNPq-IOC (402557/2011-5); FAPERJ APQ1 E-26/110332/2014; FIOTEC IOC-008-FIO-15-47. RF and CFC had a fellowship from CAPES and CNPq, respectively. AMD-C is researcher fellowship from CNPq and FAPERJ.

References

1. Nylén S, Eidsmo L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2012;34:551-61.
2. De Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, Da-Cruz AM, Fernandes O, Moreira J, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int. J. Dermatol.* 2000;39:506-14.
3. Bos JD, Zonneveld I, Das PK, Krieg SR, van der Loos CM, Kapsenberg ML. The skin immune system (SIS): distribution and immunophenotype of lymphocyte subpopulations in normal human skin. *J. Invest. Dermatol.* 1987;88:569-73.
4. Brelaz-de-Castro MCA, de Almeida AF, de Oliveira AP, de Assis-Souza M, da Rocha LF, Pereira VRA. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patient cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cell. Immunol.* 2012;279:180-6.
5. Bottrel RL, Dutra WO, Martins FA, Gontijo B, Carvalho E, Barral-Netto M, et al. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 2001;69:3232-9.
6. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002;9:251-6.
7. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, et al. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 2002;70:6734-40.
8. Brodskyn CI, Barral A, Boaventura V, Carvalho E, Barral-Netto M. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.* 1997;159:4467-73.

9. Coffman RL, Chatelain R, Leal LM, Varkila K. Leishmania major infection in mice: a model system for the study of CD4+ T-cell subset differentiation. *Res. Immunol.* 1991;142:36-40.
10. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A, Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4:e871.
11. Ferraz R, Cunha CF, Gomes-Silva A, Schubach AO, Pimentel MIF, Lyra MR, et al. Apoptosis and frequency of total and effector CD8+ T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients during antimonial therapy. *BMC Infect. Dis.* 2015;15:74.
12. Santos C da S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8(+) Granzyme B(+)-Mediated Tissue Injury Versus CD4(+)IFN- γ (+)-Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 2013;
13. Cardoso TM, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, et al. Protective and pathological functions of CD8+ T cells in Leishmania braziliensis infection. *Infect. Immun.* 2015;83:898-906.
14. Boussoffara T, Louzir H, Ben Salah A, Dellagi K. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of Leishmania-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 2004;189:1265-73.
15. Faria DR, Souza PEA, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31:432-9.
16. Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br. J. Dermatol.* 2005;153:537-43.
17. Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. 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.* 2000;33:317-25.
18. Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 1998;31:139-42.
19. Barral A, Jesus AR, Almeida RP, Carvalho EM, Barral-Netto M, Costa JM, et al. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1987;9:487-97.
20. Toledo VP, Mayrink W, Gollob KJ, Oliveira MA, Costa CA, Genaro O, et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2001;96:89-98.
21. Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1995;17:21-8.
22. Esterre P, Dedet JP, Frenay C, Chevallier M, Grimaud JA. Cell populations in the lesion of human cutaneous leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1992;421:239-47.
23. Palma GI, Saravia NG. In situ characterization of the human host response to Leishmania panamensis. *Am J Dermatopathol.* 1997;19:585-90.
24. Pirmez C, Cooper C, Paes-Oliveira M, Schubach A, Torigian VK, Modlin RL. Immunologic responsiveness in American cutaneous leishmaniasis lesions. *J. Immunol.* 1990;145:3100-4.
25. Palmeiro MR, Morgado FN, Valete-Rosalino CM, Martins AC, Moreira J, Quintella LP, et al. Comparative study of the in situ immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2012;34:23-31.
26. Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M, et al. Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *Br. J. Dermatol.* 2008;158:50-8.
27. Cupolillo E, Grimaldi G Jr, Momen H. A general classification of New World Leishmania using numerical zymotaxonomy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994;50:296-311.
28. Coutinho SG, Pirmez C, Da-Cruz AM. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary leishmaniasis patients. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 2002;96 Suppl 1:S173-8.
29. Lima HC, Vasconcelos AW, David JR, Lerner EA. American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1994;50:743-7.

30. Belkaid Y, Von Stebut E, Mendez S, Lira R, Caler E, Bertholet S, et al. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 2002;168:3992-4000.
31. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Schriefer A, Machado PRL, Lessa H, et al. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 2005;73:7853-9.
32. Morgado FN, Nascimento MTC, Saraiva EM, de Oliveira-Ribeiro C, Madeira M de F, da Costa-Santos M, et al. Are Neutrophil Extracellular Traps Playing a Role in the Parasite Control in Active American Tegumentary Leishmaniasis Lesions? *PLoS One* [Internet]. 2015 [cited 2015 Nov 4];10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4508047/>
33. Gollob KJ, Lis R. V. Antonelli, Daniela R. Faria, Tatjana S. L. Keesen, Walderez O. Dutra. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int. Immunopharmacol.* 2008;8:1338-43.
34. Keesen TSL, Gomes JAS, Fares RCG, de Araújo FF, Ferreira KS, Chaves AT, et al. Characterization of CD4(+) Cytotoxic Lymphocytes and Apoptosis Markers Induced by *Trypanosoma cruzi* Infection. *Scand. J. Immunol.* 2012;76:311-9.
35. Antonelli LRV, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KCL, Guimarães LH, Bacellar O, et al. Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4⁻ CD8⁻) T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. *Infect Immun.* 2006;74:6317-23.
36. Clarêncio J, de Oliveira CI, Bomfim G, Pompeu MM, Teixeira MJ, Barbosa TC, et al. Characterization of the T-cell receptor V β repertoire in the human immune response against *Leishmania* parasites. *Infect. Immun.* 2006;74:4757-65.
37. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MI, Lyra MR, Schubach AO, Mendonça SCF de, et al. T-cell receptor V α -repertoire of CD8+ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2015;
38. Conceição-Silva F, Dórea RC, Pirmez C, Schubach A, Coutinho SG. Quantitative study of *Leishmania braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 1990;79:221-6.
39. Da-Cruz AM, Oliveira-Neto MP, Bertho AL, Mendes-Aguiar CO, Coutinho SG. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* 2010;130:1329-36.
40. Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, Farre A, Addey C, Tartelin M-L, et al. Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone. *J. Immunol.* 2013;190:184-94.
41. Parel Y, Aurrand-Lions M, Scheja A, Dayer J-M, Roosnek E, Chizzolini C. Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum.* 2007;56:3459-67.
42. Kitchen SG, Jones NR, LaForge S, Whitmire JK, Vu B-A, Galic Z, et al. CD4 on CD8(+) T cells directly enhances effector function and is a target for HIV infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2004;101:8727-32.
43. Overgaard NH, Jung J-W, Steptoe RJ, Wells JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *J. Leukoc. Biol.* 2015;97:31-8.
44. Bittencourt AL, Barral A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1991;86:51-6.
45. Tuon FF, Gomes-Silva A, Da-Cruz AM, Duarte MIS, Neto VA, Amato VS. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal leishmaniasis. *Clin. Immunol.* 2008;128:442-6.
46. Aranha FCS, Ribeiro U Jr, Basse P, Corbett CEP, Laurenti MD. 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.* 2005;62:334-41.
47. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, Schmetz C, Berg L, Akuffo H. 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.* 2011;112.

48. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol.* 2002;12:449-51.
49. Joyee AG, Uzonna J, Yang X. Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 alpha+ dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection. *J. Immunol.* 2010;184:2095-106.
50. Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, Nakayama T, Sakai T, Maekawa Y, et al. CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int. Immunol.* 2000;12:1267-74.
51. Vasan S, Tsuji M. A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Semin. Immunol.* 2010;22:87-96.
52. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr. Mol. Med.* 2009;9:4-14.
53. Kumari S, Jamal F, Shivam P, Thakur A, Kumar M, Bimal S, et al. *Leishmania donovani* skews the CD56(+) Natural Killer T cell response during human visceral leishmaniasis. *Cytokine.* 2015;73:53-60.
54. Mou Z, Liu D, Okwor I, Jia P, Orihara K, Uzonna JE. MHC Class II Restricted Innate-Like Double Negative T Cells Contribute to Optimal Primary and Secondary Immunity to *Leishmania major*. *PLoS Pathog* [Internet]. 2014 [cited 2015 Nov 1];10. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4169504/>
55. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J. Biomed. Biotechnol.* 2011;2011:954602.

Tables

Table 1. Demographic and clinical information of patients included in the study.

Number of volunteers	18
Sex: M/F	17/1
Age* (years)	39.5 ± 6
Number of lesions*	1 ± 0.4
Diameter of lesion (mm)*	41.3 ± 5
Montenegro Skin Test (MST) (mm)*	19 ± 2.8
Duration of disease (months)*	57.9 ± 15

*Results showed as mean ± sd

Figure-caption list

Figure 1: Flow cytometry-representative protocol to determine the frequencies of NK, NKT and CD3⁺ T-lymphocyte subsets. Cells obtained from cutaneous leishmaniasis lesion were gated on forward (FSC) vs side (SSC) scatter Area dot-plot (A). SSC Height vs SSC Area (B) and SSC Height vs SSC Width (C) were created to exclude doublets and debris. Dead cells (7-AAD⁺) was excluded from analysis (D) and we identified NK cells (CD56⁺ CD3⁻), NKT (CD56⁺CD3⁺) and T lymphocytes (CD56⁻ CD3⁺) (E). Based on T lymphocyte gate we also identify CD4, CD8, double-negative (DN) and double-positive (DP) T lymphocytes (F).

Figure 2: Flow cytometry-representative protocol to determine the frequencies of cell population expressing CD107a on cutaneous leishmaniasis lesion. Based on NK, NKT, CD4, CD8, DN and DP gates (Figure 1), we evaluated the percentages of these populations expressing CD107a on your surface as a cytotoxic marker.

Figure 3: Flow cytometry-representative protocol to determine the distribution of cytotoxic cell populations on cutaneous leishmaniasis lesion. Based on gate of live cells (Figure 1D), we evaluate the total percentage of CD107a⁺ cells (A). Based on this gate we evaluated the distribution of NK and NKT (B), CD4, CD8, DN and DP (C).

Figure 4: Analysis of frequency of cell populations on cutaneous leishmaniasis lesions. NK, NKT, CD4⁺, CD8⁺, double negative (DN) and double positive (DP) T lymphocytes. Statistical analyses were performed by ANOVA test and Dunn`s post test. The bars represent the mean ± standard error. Results were considered significant with P<0.05. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

Figure 5: Analysis of frequency of cytotoxic-CD107a⁺-cell populations on cutaneous leishmaniasis lesions. NK, NKT, CD4⁺, CD8⁺, double negative (DN) and double positive (DP) T lymphocytes. Statistical analyses were performed by ANOVA test and Dunn's post test. The bars represent the median ± standard error. Results were considered significant with P<0.05. *P<0.05, **P<0.01 and ***P<0.001.

Figure 6: Distributions of cytotoxic cell populations. The pie graph shows the mean of data observed in CD107a⁺ cells: NK, NKT cells, CD4⁺ T lymphocytes, double positive (DP) T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes and double negative (DN) T lymphocytes.

Figure 7: Correlations analysis between granzyme B production, frequency of CD107⁺ cells and lesion size from cutaneous leishmaniasis (CL) lesions. Positive correlation between (A) frequency of CD107a⁺ cells and granzyme B production; (B) Lesion size and granzyme B production; and (C) lesion size and frequency of CD107a⁺ cells in CL lesions. The central line represents medians values and the graph show best fitted lines with 95% confidence interval. Statistical analyses were performed by Spearman test. Results were considered significant with P<0.05. Each point represent CL lesion. r: correlation coefficient.

Figures

Figure 1

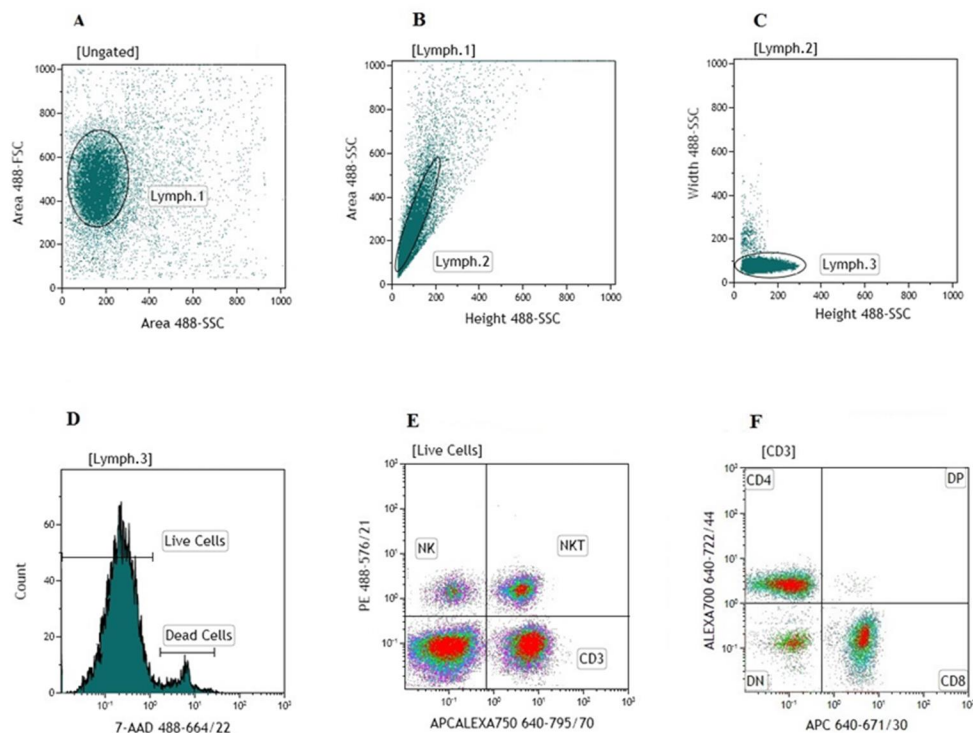


Figure 2

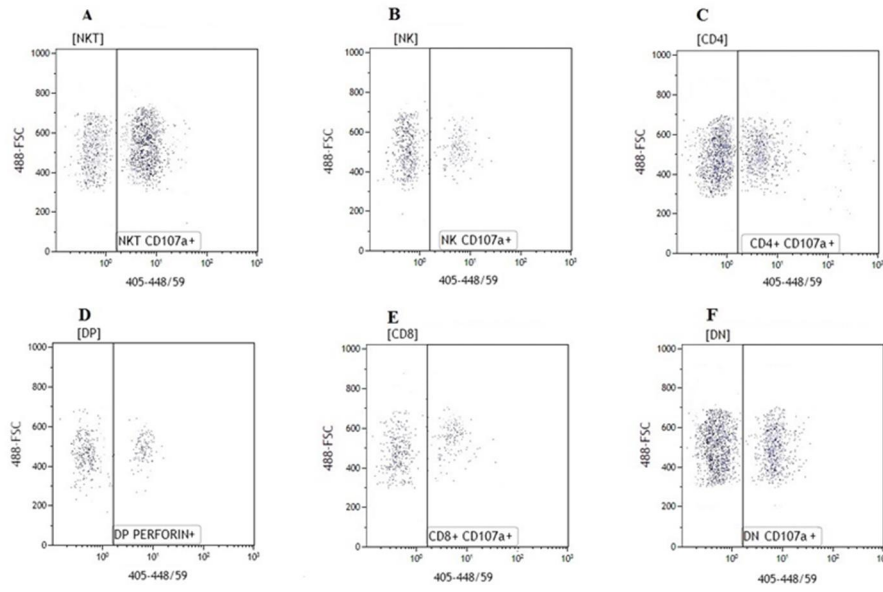


Figure 3

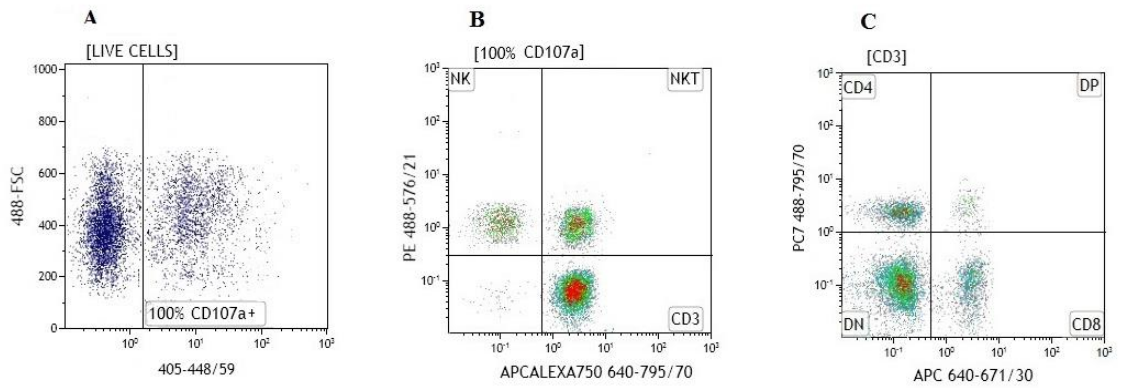


Figure 4

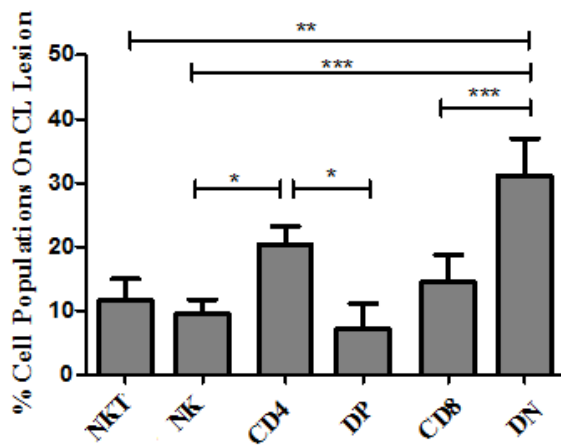


Figure 5

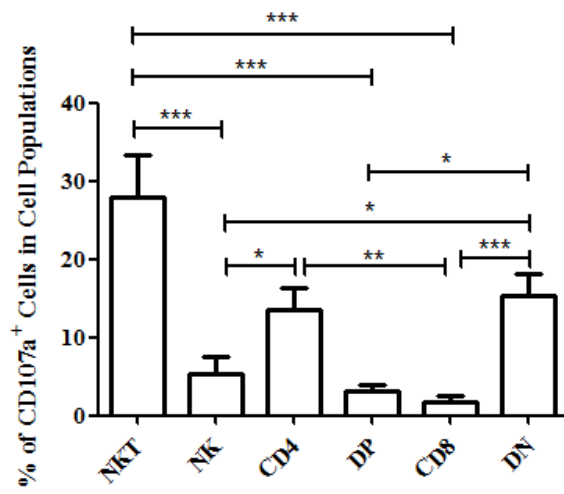
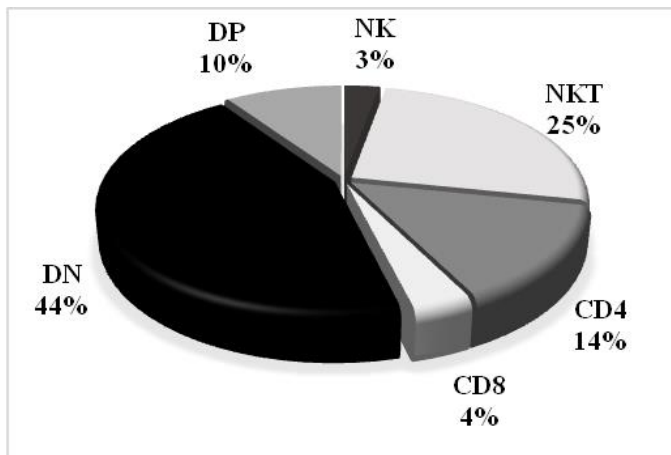


Figure 6



6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde uma das doenças tropicais de maior importância para a saúde pública (WHO, 2015). A estratégia mais expressiva para o controle desta doença seria o desenvolvimento de uma vacina capaz de promover uma resposta imunológica que controle a replicação parasitária e previna o dano tecidual. Na ausência de uma vacina eficaz, o controle das leishmanioses é dependente apenas da terapia antimonial que, embora tenha uma boa taxa de eficácia em pacientes com leishmaniose cutânea (LC), é extremamente tóxica. O balanço entre a eficiência da resposta imune do hospedeiro e a capacidade de evasão do parasito e sua virulência, determina o tipo de evolução e a gravidade da infecção. Assim, o estudo dos mecanismos imunoregulatórios induzidos na infecção humana natural, associados com a progressão e a cura da doença, assim como com os mecanismos de proteção à mesma, são fundamentais para o desenvolvimento de uma vacina eficaz ou imunoterapia no futuro.

Os avanços no entendimento das leishmanioses estão direcionados para a relação parasito-hospedeiro, incluindo a virulência das diferentes espécies do parasito, as diretrizes da resposta imune e as manifestações clínicas da doença (de Mendonça *et al.*, 2015; Jones *et al.*, 1998; Silveira *et al.*, 2009). No que diz respeito à resposta imune, a maioria dos estudos tem sido baseados tanto em modelos animais como a partir de amostras de pacientes, sejam de sangue ou de tecido. Ensaio experimentais, *ex vivo* e *in vitro*, têm sido utilizados para avaliar as características fenotípicas e funcionais das células nestas respostas, principalmente macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e linfócitos T, contribuindo para uma melhor compreensão dos mecanismos imunorreguladores associados à resolução ou à manutenção/progressão da infecção (Carlsen *et al.*, 2015; Gollob *et al.*, 2014; Liu and Uzonna, 2012; Santiago *et al.*, 2000b; Silva *et al.*, 2015; Souza-Silva *et al.*, 2015).

A patogenia da LTA é dependente de uma resposta imune celular que influencia a evolução clínica da doença através das funções efetoras dos linfócitos T e da produção de um perfil de citocinas (Da-Cruz *et al.*, 2002; Gomes-Silva *et al.*, 2007; Pirmez *et al.*, 1993; Santiago *et al.*, 2000a). Embora as características genéticas do parasito também influenciem na evolução clínica da LC, a resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro pode ser crucial para os mecanismos de proteção, assim como para o dano tecidual e a persistência da lesão (Schriefer *et al.*, 2004; Silveira *et al.*, 2009). A LC é a forma benigna da LTA apresentando altas taxas de cura, seja espontânea ou

após a terapia e subsequente proteção imunológica na maioria dos casos. Sendo assim, os casos que evoluem para a cura representam um importante foco de investigação quanto à resposta imune associada ao controle da infecção (de Oliveira-Neto *et al.*, 2000; Pereira-Carvalho *et al.*, 2013; Vieira-Gonçalves *et al.*, 2015).

Vários trabalhos têm mostrado que os linfócitos T CD8⁺ têm um papel crucial na imunopatogênese da LC, e alguns autores sugerem que estas células sejam essenciais no processo de cura desta doença (Bertho *et al.*, 2000; S. G. Coutinho *et al.*, 1998; Da-Cruz *et al.*, 2005; Ferraz *et al.*, 2015; Nateghi Rostami *et al.*, 2010). Utilizando modelo murino, foi demonstrado que após a resolução da infecção primária, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos restritos ao MHC-I e específicos aos antígenos de *L. major*, podem ser expandidos quando reestimulados *in vitro* com estes antígenos (Conceição-Silva *et al.*, 1988). Em humanos, o aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ intralesionais reforça a hipótese de que estas células estariam envolvidas no processo de resolução das lesões (Da-Cruz *et al.*, 2005). Por outro lado, outros autores apontam para um papel deletério dos linfócitos T CD8⁺, o qual contribuiria para o dano tecidual e persistência da lesão (Brodskyn *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2013).

Com base nos conhecimentos obtidos acerca do papel-chave dos linfócitos T CD8⁺ na resposta imune da LC, torna-se importante a distinção entre as subpopulações *naïve*, efetora e de memória devido a suas funções distintas, as quais podem direcionar o curso da resposta imune. Além disto, estes tipos celulares funcionalmente distintos podem estar sujeitas à morte por apoptose de forma diferenciada, em razão de um estímulo antigênico (Brunner *et al.*, 1995; Grayson *et al.*, 2002). Neste contexto, nosso grupo demonstrou que os pacientes de LC que evoluíam para a cura espontânea apresentavam uma menor taxa de linfócitos T CD8⁺ em apoptose na lesão, mostrando que a maior frequência destas células apoptóticas estaria associada à persistência da doença (Bertho *et al.*, 2000).

Sabendo que na LC, a resposta imune é mediada principalmente por linfócitos T, a avaliação das características imunológicas tem sido baseada na determinação da frequência dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e da produção de citocinas pelos mesmos (Bomfim *et al.*, 2007; Da-Cruz *et al.*, 2002; Gomes-Silva *et al.*, 2007). Estas abordagens têm sido realizadas, predominantemente, a partir de amostra de sangue de pacientes antes e após o tratamento, e pouco se sabe a respeito das características da resposta imune desencadeada nos pacientes durante a terapia antimonial.

É provável que as espécies de *Leishmania* tenham influência na resposta ao tratamento com antimoniais devido a diferenças na susceptibilidade das mesmas às drogas leishmanicidas (Arevalo *et al.*, 2007), embora os antimoniais pareçam ser, direta ou indiretamente imunomodulatórios (Hartley *et al.*, 2013). Sabendo que o tratamento é eficaz na maioria dos casos de LC, principalmente no Estado do Rio de Janeiro, o mesmo estaria associado ao desenvolvimento de uma resposta imune eficaz o suficiente para controlar a infecção. No modelo murino, foi observado que, nos animais incapazes de produzir IFN- γ , o uso do antimonial foi ineficaz, sugerindo que a eficácia do antimonial seja dependente de uma imunocompetência (Murray and Delph-Etienne, 2000). Pouco se sabe a respeito dos mecanismos moleculares da ação dos antimoniais e um dos modelos de ação proposto é a ativação de células do sistema imune inato e adaptativo, induzindo uma resposta imune antileishmanicida que contribui não só para o controle da infecção mas também para a proteção. Já foi sugerido que os antimoniais induzem um aumento da expressão de MHC de classe I na superfície de macrófagos e que isto contribuiria para a apresentação dos antígenos de *Leishmania* para linfócitos T CD8⁺ (Halder *et al.*, 2011).

De acordo com esta perspectiva, na primeira etapa deste trabalho (**Artigo I**), nós avaliamos grupos de pacientes em três diferentes momentos: antes da terapia antimonial (PAT); durante a terapia (PDT) e após o tratamento antimonial (PPT). A partir de amostras de sangue periférico nós avaliamos a frequência de linfócitos T CD8⁺ totais e efetores, assim como a frequência destas células em apoptose, em ensaios *ex vivo* e *in vitro*. Embora os grupos estudados na primeira etapa deste trabalho não tenham sido formados pelos mesmos pacientes em sua totalidade, os resultados obtidos mostraram características associadas ao desenvolvimento de uma resposta imune que estaria levando os pacientes à cura clínica, na qual linfócitos T CD8⁺ efetores estariam envolvidos. Nossos dados mostram também que sob a influência da terapia há uma alteração da frequência dos linfócitos T CD8⁺ totais e efetores; da frequência destas células respondedoras aos LbAg; e da frequência de células em apoptose.

Embora a frequência de linfócitos T CD8⁺ totais seja semelhante entre os PAT e os PPT, a menor frequência destas células nos PDT pode ser associada a uma maior taxa de apoptose destas células. Os resultados obtidos *in vitro* confirmam que, durante a terapia os LbAg induziram apoptose dos linfócitos T CD8⁺ e aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ totais tanto durante como após a terapia, mas não induzem apoptose das células nos PPT. Estes dados sugerem que a menor indução de apoptose

de linfócitos T CD8⁺ nos PPT pode estar associada à cura destes indivíduos. Estes dados estão de acordo com resultados obtidos anteriormente pelo nosso grupo, nos quais a cicatrização das lesões estava associada a uma menor frequência de linfócitos T CD8⁺ em apoptose (Bertho *et al.*, 2000).

Assim, a terapia antimonial parece induzir uma alteração na frequência total de linfócitos T CD8⁺, a qual se mostra recuperada após o tratamento. Além disso, ao final da terapia os linfócitos T CD8⁺ parecem responder mais intensamente aos LbAg, visto que há aumento da frequência destas células respondedoras do PPT. Estes dados corroboram aqueles descritos por Da-Cruz e colaboradores (Da-Cruz *et al.*, 2002), os quais sugerem que o aumento da frequência destas células ao final do tratamento estaria associado à resolução da lesão. No entanto, neste trabalho, os autores comparam os dados obtidos antes e após a terapia. Sendo assim, nós avaliamos esta resposta durante a terapia e observamos que o aumento dos linfócitos T CD8⁺ respondedores aos LbAg só ocorre na fase final do processo de cura, sendo um processo tardio e podendo estar relacionado com o desenvolvimento de linfócitos T CD8⁺ de memória.

Apesar de estabelecermos associações entre a frequência da população total de linfócitos T CD8⁺, a taxa de apoptose e o potencial respondedor destas células aos LbAg, para melhor entender o papel destas células na resposta imune, nós decidimos avaliar células T CD8⁺ efectoras, utilizando os anticorpos anti-CD45RA e anti-CD27, como marcadores (CD45RA⁺ CD27⁻) (Hamann *et al.*, 1999). Ao avaliarmos a frequência de células T CD8⁺ efectoras durante o tratamento e ao final da terapia, observamos que os LbAg induzem um aumento da frequência destas células. Já foi demonstrado que durante a terapia antimonial os pacientes de LC apresentam uma resposta proliferativa de linfócitos frente a LbAg, superior àquela observada nos pacientes antes do tratamento (Mendonça *et al.*, 1986). Neste estudo, o alto índice de proliferação de linfócitos de pacientes em tratamento foi relacionado à destruição de parasitos, assim como os efeitos benéficos da terapia foram associados a uma indução de células T específicas aos LbAg. Outros autores sugeriram que a persistência de uma resposta proliferativa de linfócitos, após o início do tratamento convencional com Glucantime®, estava associada à presença *in vivo* do antígeno e que, no decorrer da evolução para a cura, este estímulo *in vivo* teria uma tendência a diminuir (Toledo *et al.*, 2001). Estes dados mostram que a terapia antimonial altera a resposta imune desencadeada pelo

hospedeiro, a qual acompanha o processo de destruição do parasito desencadeado pelo medicamento.

Considerando que o Glucantime® é uma droga leishmanicida, a maior frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores poderia ser decorrente de uma grande quantidade de antígenos circulantes que contribuiria para a indução destas células. Um estudo recente mostrou que durante a terapia antimonial há uma diminuição da carga parasitária associada a um aumento de linfócitos T na lesão de LC, sugerindo uma imunomodulação destas células durante o tratamento (Meymandi *et al.*, 2011). Assim, a menor frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores observada nos PPT parece estar associada a redução da estimulação antigênica devido ao controle da parasitemia após a terapia. A maior liberação de antígenos durante o tratamento pode ser responsável pela indução de linfócitos T CD8⁺ efetores, mas também pela indução de apoptose destas células, observada nos PDT, sugerindo que ocorra uma morte celular induzida por ativação (AICD - do inglês *activation-induced cell death*). A apoptose de linfócitos T tem sido observada durante as infecções por *Trypanosoma cruzi* (DosReis and Lopes, 2009), *Plasmodium sp.* (Matsumoto *et al.*, 2000) e *Leishmania sp.* (Bertho *et al.*, 2000; Das *et al.*, 1999). A morte destas células parece modular o processo de expansão clonal e diferenciação celular, resultando em produção insuficiente de citocinas (Guillermo *et al.*, 2009).

Tanto em pacientes infectados por *Leishmania* como em modelos experimentais, tem sido descrita e discutida a influência da apoptose na imunopatogenia da doença. Em camundongos suscetíveis a *L. donovani*, foi observado um aumento da apoptose de linfócitos T CD4⁺ após a ativação destas células com conseqüente redução da produção de IL-2 e IFN- γ (Das *et al.*, 1999). A resposta do tipo Th1 em camundongos infectados por *L. major* ou por *L. donovani* parece ser modulada pela indução do processo apoptótico em linfócitos T CD4⁺ e modulação da produção de IFN- γ por estas células (Huang *et al.*, 1998). Além disso, a anergia celular induzida por antígenos de *L. amazonensis*, principal agente etiológico da leishmaniose cutânea difusa, está associada à apoptose de linfócitos T, que prejudicaria a apresentação antigênica pelos macrófagos, resultando em uma ativação reduzida da resposta imune celular (Pinheiro *et al.*, 2004). Em camundongos suscetíveis à infecção por *L. major* (BALB/c) foi observado um aumento progressivo deste processo de morte celular programada nos órgãos linfóides, enquanto nos camundongos resistentes a esta infecção, havia apenas uma apoptose transitória (Desbarats *et al.*, 2000).

A maioria dos resultados que descrevem a apoptose como fenômeno imunomodulador da resposta imune celular na LC foram obtidos em modelos experimentais. Sendo assim, nosso grupo vem mostrando a influência deste fenômeno na LC humana causada por *L. braziliensis*. Nossos resultados mostram que os PPT apresentam uma menor frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores em apoptose, comparados com os indivíduos em tratamento. Em resposta aos LbAg, há um aumento da indução de linfócitos T CD8⁺ efetores durante e após a terapia. No entanto, essa indução é acompanhada do aumento da frequência de células apoptóticas, que ocorre mais intensamente durante a terapia. Estes dados sugerem que haja uma apoptose de linfócitos T CD8⁺ transitória, que acompanha a indução de linfócitos T CD8⁺ efetores e que parece ser diminuída com a evolução para a cura.

A severidade da LC é caracterizada pelo tamanho da lesão e do infiltrado inflamatório (Oliveira *et al.*, 2011) e alguns autores mostraram que o tamanho da lesão estava relacionado com a frequência de linfócitos T ativados antes da terapia (Schriefer *et al.*, 2008). Nossas análises de correlação entre o tamanho das lesões e a frequência das populações celulares estudadas mostrou que os PDT que apresentaram as maiores frequências de linfócitos T CD8⁺ apoptóticos eram aqueles que apresentavam as maiores lesões, sugerindo que a apoptose destas células esteja associada a um efeito deletério. Por outro lado, os PDT e os PPT que apresentavam uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ efetores eram aqueles com as menores lesões, sugerindo que os linfócitos T CD8⁺ possam ter um papel protetor.

Resultados do nosso grupo também mostraram que as maiores lesões estavam correlacionadas com uma menor frequência de clones de linfócitos T CD8⁺ efetores e de memória central que expressam V_H2, sugerindo que uma modulação negativa destes clones esteja associada a um maior dano tecidual, e que os mesmos possam ter um papel protetor. Além disso, nós sugerimos que os clones de linfócitos T CD8⁺ que expressam V_H12 ou V_H22 possam estar envolvidos em uma resposta imune efetora anti-*Leishmania* (Ferraz *et al.*, 2015). Estes dados reforçam o papel dos linfócitos T CD8⁺ na evolução para a cura e destaca que alguns clones possam ser preferencialmente selecionados durante a doença ativa e após a cura clínica, podendo ainda participar da manutenção da resposta protetora.

Dados da literatura mostram que a infecção por *Leishmania* induz uma imunidade duradoura através, principalmente, de células de memória central, sendo capaz de controlar o patógeno e proteger os indivíduos de uma reativação ou reinfecções

(Coutinho *et al.*, 2002; Gollob *et al.*, 2005; Okwor and Uzonna, 2008; Zaph *et al.*, 2004). Com a persistência parasitária após cicatrização da lesão, o sistema immune pode permanecer em constante estimulação, de forma a manter o *pool* de células efetoras específicas aos antígenos de *Leishmania*. Deste modo, os linfócitos T CD8⁺ que permanessem na circulação após a remissão parecem exercer relevante papel no estabelecimento da cura clínica e controle da parasitemia. Uma avaliação criteriosa dos perfis da resposta immune estabelecida desde a doença ativa até o fim do tratamento, se faz de grande valia para a definição de parâmetros imunológicos associados ao desenvolvimento para a cura clínica da LC. Sabendo que os pacientes curados de LC apresentam cura clínica estável mesmo longo tempo após a cicatrização, é importante considerar que este fenômeno parece ser decorrente de uma resposta imunológica que permanece eficiente em controlar a parasitemia sem, no entanto, apresentar níveis de ativação desregulados a ponto de levar a destruição tecidual e conseqüente recidiva da lesão ou evolução para a forma mucosa. Assim, é possível que a resposta immune desencadeada a partir do tratamento seja aquela montada em favor do equilíbrio parasito/hospedeiro e seja mantida após a terapia, ao longo dos anos.

Assim, na primeira etapa do nosso trabalho, nós mostramos importantes diferenças entre a frequência de linfócitos T CD8⁺ nos grupos estudados, caracterizando fases iniciais e finais do processo de cura clínica. Estes dados sugerem que o desenvolvimento de uma resposta imune que leve à cicatrização da lesão possa envolver a modulação de linfócitos T CD8⁺ durante e após a terapia. Ruiz e Becker (2007) sugerem que os linfócitos T CD8⁺ estejam implicados no controle da infecção através dos mecanismos de citotoxicidade e de produção de IFN- γ , sendo estas as principais funções destas células. Enquanto alguns autores sugerem que na LC humana os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos sejam importantes na destruição de macrófagos infectados (Bousoffara *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 1991), outros apontam para um papel destas células citotóxicas no dano tecidual (Cardoso *et al.*, 2015; Santos *et al.*, 2013). Outros estudos sugerem que a presença de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos estaria associada ao dano tecidual na leishmaniose mucocutânea (Brodskyn *et al.*, 1997), assim como na progressão das lesões de pacientes de LC (Faria *et al.*, 2009). No entanto, neste último trabalho, os autores sugeriram que além dos linfócitos T CD8⁺, outras populações citotóxicas estariam presentes nas lesões de LC e LM. Em um estudo de populações celulares em lesão de LC, os autores sugerem que o dano tecidual é mais influenciado pela resposta citotóxica por linfócitos T do que pela

presença dos parasitos (Esterre *et al.*, 1992). Outros autores mostraram que a produção de granzima B é uma via importante na lise de células infectadas por *L. braziliensis*, embora induza dano tecidual (Cardoso *et al.*, 2015). Devido ao fato dos mecanismos que medeiam a citotoxicidade ainda não estarem totalmente definidos na LC, nós hipotetizamos que além dos linfócitos T CD8⁺, as células NK, que são classicamente citotóxicas, as células NKT, e os linfócitos T CD4⁺, T CD4⁺CD8⁺ (duplo-positivos, DP) e T CD4⁻CD8⁻ (duplo negativos, DN) também poderiam atuar como células citotóxicas exercendo um papel imunomodulador nesta doença.

Apesar da lesão estar primordialmente confinada à pele, a repercussão sistêmica pode oferecer importantes características imunológicas. Assim, além de explorar a distribuição de populações celulares citotóxicas na resposta imune localizada, nós também avaliamos o potencial citotóxico de células obtidas de sangue periférico, quanto à produção de perforina em resposta aos antígenos de *L. braziliensis*. Avaliamos também se esta resposta era diferente em três momentos distintos da doença: antes, durante e após a terapia antimonial, através de um estudo longitudinal.

Os padrões de frequência de células citotóxicas observados a partir de amostras do sangue periférico foram bastante diferentes daqueles observados nas lesões. Nós mostramos que após o cultivo *in vitro* das CMSP, as células NK e NKT apresentavam as maiores frequências de células citotóxicas, enquanto os linfócitos T DN foram os menos frequentes, em todas as etapas da infecção. Os indivíduos sadios também apresentaram uma distribuição de células citotóxicas semelhantes aos pacientes, embora em frequências mais baixas. Sendo assim, na ausência ou na presença de infecção o comprometimento citotóxico das células NK, NKT, linfócitos T CD4⁺, linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T DN obtidos do sangue periférico, não se altera entre as populações celulares estudadas. Isto nos leva a hipotetizar um recrutamento seletivo destas diferentes populações celulares para a lesão, principalmente de linfócitos T DN e células NKT, os quais no sangue periférico são pouco frequentes, mas foram as mais prevalentes nas lesões de LC.

Em relação a resposta aos LbAg ao longo do processo de cura, nós observamos que a frequência de linfócitos T CD4⁺ citotóxicos não aumenta em nenhuma das fases da terapia e a média entre a frequência destas células é semelhante à observada nos IS. Embora possa ser observado um aumento ou diminuição da frequência destas células citotóxicas respondedoras ao LbAg em alguns pacientes, tanto durante como

após o tratamento, nossos dados não indicam um padrão de indução de citotoxicidade pelos linfócitos T CD4⁺.

Os pacientes que apresentavam as maiores frequências de linfócitos T DN citotóxicos respondedores aos LbAg apresentaram uma diminuição gradual da frequência destas células ao longo do processo de cura. Enquanto os PAT apresentam uma variação da frequência destas células DN respondedoras aos LbAg, com alguns PAT apresentando baixas frequências, ao final da terapia há uma homogeneidade destes valores e todos os pacientes apresentam baixa frequência de linfócitos T DN citotóxicos que respondem aos LbAg, semelhante aos IS. Estes dados sugerem que a uma modulação destas células citotóxicas a níveis basais esteja envolvida no processo de cura clínica esteja, indicando que os linfócitos T DN citotóxicos tenham um papel associado à patogênese. Pouco se sabe a respeito da indução de linfócitos T citotóxicos e do recrutamento destas células para as lesões de LC. No entanto, nossos dados nos leva a questionar se esta modulação de linfócitos T DN citotóxicos não estaria associada a um menor recrutamento destas células para o sítio da lesão, diminuindo a influência destas células citotóxicas no dano tecidual?

Independente da fase da doença os LbAg induziram as células NK a produzirem perforina. Embora tenhamos observado uma diminuição da frequência das células NK nos PDT, não identificamos nenhum padrão associado à doença ativa ou à evolução para cura. Apesar da maioria dos pacientes apresentar altas frequências de células NK citotóxicas respondedoras aos LbAg nos três grupos, as células NK não parecem ser recrutadas para o sítio da lesão, visto que a frequência das mesmas é inversamente proporcional à frequência de células NK citotóxicas na lesão.

Durante o tratamento, a diminuição da frequência de linfócitos T CD8⁺ e células NKT respondedoras produzindo perforina sugere que haja uma modulação da resposta citotóxica por estas células, a qual estaria associada à evolução para a cura. Assim, tanto as células NKT quanto os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos teriam um potencial deletério na LC, embora as células NKT tenha uma maior influência sob a resposta citotóxica nas lesões. A especificidade antigênica das células NKT é pouco elucidada, embora acredita-se que a maioria destas células, as chamadas NKT invariáveis reconheça antígenos lipídicos através da molécula CD1d. É possível, que além de responder aos LbAg, estas células também possam atuar de forma inespecífica. Por outro lado, já foi sugerido que a ativação de células NKT pode contribuir para a ativação de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e produtores de IFN- γ (Nishimura *et al.*, 2000). Assim é

possível que as células NKT tenham um papel antígeno-específico na resposta anti-*Leishmania* que pode ser coordenado aos linfócitos T CD8⁺, no que diz respeito à citotoxicidade. Embora o papel citotóxico dos linfócitos T CD8⁺ pareça ser pouco influente nas lesões ativas, não podemos excluir a hipótese de que estas células podem contribuir para o dano tecidual. Por outro lado, mesmo os PPT apresentam frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de perforina em resposta aos LbAg superior aos IS. Estes dados sugerem que uma citotoxicidade moderada dos linfócitos T CD8⁺ poderia estar relacionada ao controle da parasitemia e resolução da lesão. Com base em ensaio *in vitro* de infecção de macrófagos, Cardoso e colaboradores (2015) mostram que os linfócitos T CD8⁺ de indivíduos com a forma subclínica eram menos citotóxicos quando comparados com pacientes de LC (Cardoso *et al.*, 2015). A partir dos nossos resultados, sugerimos que, embora haja uma modulação destas células, é possível que uma resposta citotóxica moderada pelas células NKT e pelos linfócitos T CD8⁺ esteja associada com a evolução para a cura. Assim, os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos participariam da evolução para a cura através de uma resposta citotóxica moderada que contribuiria para a destruição de macrófagos infectados sem causar dano tecidual, embora na doença ativa possam exercer uma resposta citotóxica exacerbada.

Sendo assim, para melhor compreender o papel dos linfócitos T CD8⁺ efetores no processo de cura da LC, nós também avaliamos seu potencial de produção de IFN- γ em resposta aos LbAg. Esta avaliação nos mostrou uma relação inversa comparada a indução de células citotóxicas. Enquanto os LbAg induzem uma modulação dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos durante a terapia, esses antígenos induzem um aumento de células produtoras de IFN- γ . Ao final da terapia também há uma maior indução destes linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ , quando comparados com os pacientes com doença ativa, antes do início da terapia. Enquanto a frequência dos linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ é maior nos PDT e PPT, quando comparados aos PAT, a média da frequência destas células é semelhante entre os PAT e os IS, sugerindo que a baixa frequência destas células antes do tratamento contribua para a persistência da lesão. Outros autores já mostraram que após estímulo *in vitro* com antígenos solúveis de *Leishmania*, os linfócitos T CD8⁺ eram as maiores fontes de IFN- γ em indivíduos com infecção subclínica, sugerindo um papel protetor destas células (Cardoso *et al.*, 2015). Assim, nós reforçamos que os linfócitos T CD8⁺ desempenham um papel anti-*Leishmania* no processo de evolução para a cura, através da modulação das células citotóxicas e a indução de células produtoras de IFN- γ .

É possível que a apoptose de linfócitos T CD8⁺ esteja associada a modulação destas células CD8⁺ citotóxicas. A indução de linfócitos T CD8⁺ efetores e o aumento da apoptose destas células durante a terapia, observados na primeira etapa deste trabalho, poderia estar associada à indução de células produtoras de IFN- γ e à modulação das células citotóxicas, respectivamente. Ainda, a diminuição destas células CD8⁺ apoptóticas ao final da terapia pode ser representada pela manutenção de uma baixa frequência de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos.

Após o início do tratamento também há uma maior indução de linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e ao final da terapia ainda há uma maior frequência destes linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ comparados com os PAT e com os IS. Em conjunto, estes dados mostram que o processo de cicatrização é acompanhado por uma maior indução de linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e que estes eventos possam ser parte do processo de controle da parasitemia e de resolução da lesão. A participação dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e produtores de IFN- γ já foi demonstrada na patogênese da Doença de Chagas durante a infecção experimental de *Trypanosoma cruzi*, suportando a hipótese de que os linfócitos T CD8⁺ desempenham um duplo papel na patogênese de infecções intracelulares (Silverio *et al.*, 2012). Já foi sugerido também, que os linfócitos T CD4⁺ produtores de IFN- γ e citotóxicos, façam parte de subpopulações diferentes, e exerçam um papel duplo na resposta imune, já que não foi observado linfócitos T CD4⁺ com dupla marcação para IFN- γ e granzima B (Naouar *et al.*, 2014). Nossos dados reforçam esta hipótese, já que não observamos células que apresentassem concomitantemente produção de perforina e de IFN- γ , apontando para a participação de diferentes subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺.

É possível que as células NKT produtoras de IFN- γ estejam envolvidas na fase final do processo de cura, já que há uma maior indução destas células quando estimuladas com LbAg após o tratamento. É importante ressaltar, que todos os pacientes apresentaram aumento da frequência de células NKT produtoras de IFN- γ durante ou após o tratamento, enquanto a frequência destas células nos PAT foi semelhante à dos IS.

Embora alguns trabalhos mostrem que as células NK desempenham um papel principalmente através da produção de IFN- γ na LC (Maasho *et al.*, 1998; Nylén *et al.*, 2003), nós não observamos um padrão definido quanto a produção de IFN- γ por células NK respondedoras aos LbAg.

Em relação às células DN produtoras de IFN- γ , Gollob e colaboradores mostraram que as células DN produzem 20 vezes mais IFN- γ do que IL-10, após estímulo com antígenos solúveis de *Leishmania* (Gollob *et al.*, 2008). Embora nós não tenhamos analisado as subpopulações de células DN separadamente (CD4⁺ e CD4⁻), respondedoras aos LbAg, todos os pacientes apresentaram um aumento da frequência de células DN produtoras de IFN- γ durante ou após a terapia, embora nós não possamos sugerir que o aumento da frequência destas células caracterize um evento associado à evolução para a cura.

Ainda nesta segunda etapa do trabalho, o estudo longitudinal nos permitiu acompanhar o comportamento imunológico de cada paciente, ao longo da doença e do processo de cura, importantes para estabelecermos parâmetros associados à patogenia e à proteção. Nós reforçamos a importância de incluirmos pacientes durante o tratamento nos estudos de resposta imune na LC visto que existem alterações imunológicas entre a fase ativa da doença e a fase de tratamento que podem representar eventos críticos no processo de indução da cicatrização, controle da parasitemia e evolução para a cura clínica. Como conclusão desta etapa, sugerimos que a doença ativa esteja associada a uma maior indução de linfócitos T DN, células NKT e linfócitos T CD8⁺ citotóxicos e menor produção de IFN- γ por estas células e pelos linfócitos T CD4⁺. Após o início da terapia, estes eventos imunológicos parecem ser alterados e acompanham o processo de cura.

Na terceira etapa do presente estudo (**Artigo II**) nós avaliamos o comprometimento e a distribuição de populações celulares citotóxicas na lesão de pacientes de LC. Considerando as seis diferentes populações potencialmente citotóxicas, não há relatos na literatura da distribuição das mesmas em lesões de LC. Já foi sugerido que os antígenos de *Leishmania* podem modular as moléculas responsáveis pela migração de células para a lesão influenciando a composição do infiltrado inflamatório a até a severidade da LC (Mendes-Aguiar *et al.*, 2009). A infecção por *Leishmania* induz um remodelamento constante do tecido e a organização do infiltrado inflamatório parece ser influenciada pela resposta imune, favorecendo o recrutamento e a proliferação *in situ* de linfócitos na pele (Da-Cruz *et al.*, 2005; Nylén and Eidsmo, 2012). Dados histopatológicos de lesões de LC mostram um padrão celular transitório e reversível, que pode ser alterado de acordo com a progressão da doença (Barral *et al.*, 1987). Em um estudo de populações celulares em lesão de LC, os autores sugerem que o dano tecidual é uma consequência da resposta imune

citotóxica mediada por células T (Nylén and Eidsmo, 2012), embora só tenham considerado os linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺. Por outro lado, outros autores sugerem que a produção de granzima B seja uma importante via envolvida na lise de monócito infectados por *L. braziliensis* (Cardoso *et al.*, 2015). Assim, o recrutamento de diferentes populações celulares com potencial citotóxico para a lesão poderia influenciar o efeito localizado da citotoxicidade exercido pelas mesmas.

As células efetoras específicas aos antígenos de *Leishmania* estão concentradas nos sítios inflamatórios e devem participar dos mecanismos imunológicos necessários para conter a replicação do parasito, podendo também gerar eventos patogênicos que resultam em dano tecidual (Conceição-Silva *et al.*, 1990; Da-Cruz *et al.*, 2010). Nós mostramos que a frequência das células citotóxicas na lesão de pacientes com a fase ativa de LC é diretamente proporcional à frequência destas mesmas populações celulares obtidas do sangue periférico, nos pacientes com a forma ativa, sendo respondedoras aos LbAg. Sendo assim, a atividade citotóxica das diferentes populações celulares nas lesões de LC parecem representar uma atividade efetora em resposta aos antígenos de *L. braziliensis*, com excessão das células NK, cuja frequência na lesão e no sangue apresentou uma correlação negativa. Por outro lado, a frequência de linfócitos T DN citotóxicos respondedores aos LbAg foi diretamente proporcional a frequência de células DN citotóxicas na lesão, sugerindo esta população possa exercer uma resposta citotóxica anti-*Leishmania* nas lesões ativas.

Nós observamos que nas lesões de LC a frequência de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺ são semelhantes, corroborando os dados encontrados por outros autores (Da-Cruz *et al.*, 2005). No entanto, a população de linfócitos mais frequente nas lesões de LC foram os linfócitos T duplo-negativos (DN). Antonelli e colaboradores (2006) sugerem um recrutamento de células DN do sangue para a lesão de pacientes de LC, visto que estes apresentam menores frequências destas células no sangue quando comparados a indivíduos saudáveis. Já foi demonstrado que em pacientes de LC, a frequência de células DN que expressam TCR $\alpha\beta$ estariam aumentadas, enquanto que em indivíduos saudáveis, 80% das células DN expressam TCR $\gamma\delta$, sugerindo que os linfócitos T DN participam de uma resposta anti-*Leishmania*, principalmente aqueles que expressam o TCR $\alpha\beta$ (Antonelli *et al.*, 2006). Em modelo murino o papel dos linfócitos T DN em uma resposta anti-*Leishmania* foi recentemente demonstrado por Mou e colaboradores (2014). Neste trabalho foi mostrado que em camundongos

infectados com *L. major* a maioria das células DN também expressam TCR $\gamma\delta$ as quais apresentam funções semelhantes às células de memória, proliferando rapidamente e produzindo granzima B, IFN- γ e TNF- α . Além disso, os autores também mostraram que os linfócitos T DN migram para a lesão e proliferam no local (Mou *et al.*, 2014). Com base nestes trabalhos, nós sugerimos que haja um recrutamento de células T DN para lesões de LC humana e uma possível proliferação das mesmas que explicaria a alta frequência destas células observada nas lesões dos pacientes de LC. Embora não tenha sido o foco do nosso trabalho, nós observamos que aproximadamente 15% dos linfócitos T DN presentes nas lesões de LC expressavam TCR $\alpha\beta$ (dados não mostrados), sugerindo que a maioria destas células expresse TCR $\alpha\beta$ corroborando os dados na literatura (Antonelli *et al.*, 2006; Mou *et al.*, 2014). Assim, é possível que haja um intenso recrutamento de linfócitos DN para a lesão e que sua ação citotóxica tem um efeito prejudicial, sendo controlado quando os pacientes entram em tratamento.

As células NK, NKT e os linfócitos T DP também foram encontrados nas lesões, porém em frequências mais baixas do que os linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e T DN. Alguns autores mostraram uma heterogeneidade na distribuição de linfócitos T nas lesões de leishmaniose, embora não tenha avaliado a distribuição destas seis populações. Outros estudos *in situ* mostraram que os padrões histopatológicos podem ser diferentes, dependendo do local da lesão e da duração da mesma (Amato *et al.*, 2003; Bittencourt and Barral, 1991). As lesões estudadas no presente trabalho variavam de 1 a 6 meses e eram localizadas em sua maioria na perna e no braço. Entretanto, nenhuma associação entre a frequência de células e o local ou a duração da lesão foi encontrada.

Nós investigamos um possível papel da citotoxicidade na imunopatogenia da LC e observamos que quanto maior a frequência total de células citotóxicas e a quantidade de granzima B liberada nas lesões, maior o tamanho da lesão, sugerindo que a citotoxicidade influencie no dano tecidual. Interessantemente, nós não observamos correlação entre o tamanho da lesão e a frequência de uma população citotóxica específica, sugerindo que o dano tecidual associado à citotoxicidade seja influenciado por um conjunto de populações citotóxicas e não apenas por uma população celular. As maiores lesões também foram associadas a maior quantidade de IFN- γ e de TNF- α liberados na lesão. Estes dados corroboram aqueles encontrados por outros autores, no qual também mostraram que a produção de IFN- γ e TNF- α após estímulo de CMSP *in vitro* com antígenos solúveis de *Leishmania* estava associada ao tamanho da lesão

e (Antonelli *et al.*, 2005), sugerindo que o dano tecidual esteja associado a atividade pró-inflamatória. Embora a produção de IFN- γ e TNF- α seja crucial para a ativação da maquinaria leishmanicida nos macrófagos, alguns estudos associaram a alta produção destas citocinas à exacerbação das lesões de LC e principalmente na LM, onde observou-se uma alta produção destas citocinas no soro de pacientes e baixa atividade de citocinas anti-inflamatórias (Castés and Tapia, 1998; Da-Cruz *et al.*, 1996; Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998). A produção exacerbada de IFN- γ poderia induzir uma estimulação intensa de macrófagos, os quais são fontes de agentes oxidativos e enzimas relacionadas à destruição de queratinócitos e ao dano tecidual. Embora a atividade pró inflamatória seja necessária no controle da parasitemia, nós reforçamos a hipótese de que o dano tecidual durante a doença ativa esteja associado a uma intensa atividade inflamatória, adicionando a citotoxicidade como um fenômeno que pode estar associado a este efeito deletério.

Embora as células citotóxicas tenham a capacidade de destruir macrófagos infectados, as amastigotas presentes nos macrófagos podem ser liberadas podendo invadir outras células, dando continuidade a infecção (Smith *et al.*, 1991). Sob esta perspectiva o dano tecidual associado à citotoxicidade poderia ser explicado por esta persistência do parasito e infecção de novas células. Assim, tornou-se importante no nosso estudo, avaliarmos a participação de diferentes populações citotóxicas na resposta imune que acontece no microambiente das lesões de LC. Através de uma análise por citometria de fluxo nós mostramos a frequência destas células (células NK, NKT, linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, DP e DN) em amostras teciduais obtidas de pacientes, a qual representa o comprometimento de cada uma destas populações celulares com a citotoxicidade. Uma outra abordagem de análise citofluorimétrica que utilizamos foi avaliar, a partir do total de células citotóxicas, a distribuição das diferentes populações celulares a fim de determinar quais predominam nas lesões de LC.

Tem sido mostrado que os linfócitos T DN desempenham tanto um papel associado à patogênese como um papel regulador na LC, através da produção de citocinas (Gollob *et al.*, 2008). Por outro lado, estas células ainda não foram descritas nas lesões de LC e seu potencial citotóxico é pouco explorado nos estudos em leishmaniose. Assim, mostramos pela primeira vez que os linfócitos T DN estão presentes nas lesões como a população de linfócitos mais frequente, e como as células citotóxicas em maior distribuição. Estas análises mostraram que os linfócitos T DN representam mais de 40% de todas as células citotóxicas estudadas, dez vezes mais

do que os linfócitos T CD8⁺. Diante desta proporção de distribuição, as células DN podem exercer um papel crítico no dano tecidual, apresentando um importante papel na patogênese da LC.

As células NKT representam a população mais comprometida com a citotoxicidade e a segunda população citotóxica mais presente nas lesões. Em modelo murino foi mostrado que as células NKT bloqueiam a expansão dos parasitos e direcionam a resposta imune através da produção de citocinas (Ishikawa *et al.*, 2000; Joyee *et al.*, 2010). Em humanos foi mostrado que estas células têm um importante papel na resposta imune inata na malária, na proteção contra neoplasia e no controle de infecções virais (Smyth *et al.*, 2002; Vasan and Tsuji, 2010; Wu and Van Kaer, 2009). Em leishmaniose, seu papel só foi descrito na leishmaniose visceral, desempenhando um papel duplo, dependendo do subset de células NKT, podendo ser CD4⁺ ou CD8⁺. Nossos resultados, mostram, pela primeira vez, a presença e o papel de células NKT citotóxicas em lesão de LC. Nossos dados apontam para uma participação crítica das células NKT citotóxicas na resposta imune localizada, podendo contribuir para o dano tecidual. Resultados semelhantes foram observados recentemente pelo nosso grupo através de um estudo baseado em amostras de sangue periférico de pacientes de LC, no qual observou-se uma menor frequência de células NKT citotóxicas em pacientes clinicamente curados quando comparados com pacientes antes do tratamento, sugerindo que uma alta frequência destas células estaria relacionada com a fase ativa da LC (Cunha CF, comunicação pessoal). Interessantemente, tanto as células NKT, como os linfócitos T DN, já foram descritos como células altamente ativadas (Gapin *et al.*, 2013; Gollob *et al.*, 2008). Esta característica compartilhada pelas células NKT e DN poderia contribuir para sua intensa participação na resposta citotóxica na LC.

Já foi mostrado que na LM há uma maior frequência de células NK nas lesões que recidivam, quando comparadas com os casos de cura, sugerindo que a frequência destas células seja um marcador de prognóstico (Tuon *et al.*, 2008). Nós observamos uma baixa frequência de células NK nas lesões de LC, principalmente quando comparada com a frequência de linfócitos T CD4⁺ e DN. Sabendo que os pacientes avaliados no presente estudo apresentaram cura clínica após o tratamento, a baixa frequência de células NK nas lesões ativas poderia contribuir para a proteção e evitar casos de recidiva. No entanto, o papel das células NK citotóxicas na LC tem sido associado tanto a patologia como à proteção. Alguns autores sugerem que o papel protetor destas células estaria associado à lise de promastigotas celulares e

macrófagos infectados (Aranha *et al.*, 2005; Lieke *et al.*, 2011; Maasho *et al.*, 1998). Por outro lado, outros autores postulam que estas células não sejam essenciais para o controle da LC e que as células mielóides são resistentes à lise induzida por células NK (Bogdan, 2012). Também há evidências de que as células NK citotóxicas contribuem para a exacerbação do dano tecidual (Machado *et al.*, 2002b). Nós observamos que somente 5% das células NK apresentaram perfil citotóxico, o que representa apenas 3% do total de células citotóxicas nas lesões de LC estudadas. Estes dados sugerem que as células NK exerçam pouca influência sobre o perfil citotóxico observado nas lesões de LC.

Até o momento, as células DP têm sido pouco estudadas nas leishmanioses. Na presente tese, nós observamos a presença de linfócitos T DP, embora esta tenha sido a população celular menos frequente nas lesões de LC. Outros autores sugerem que os linfócitos T DP são encontrados no sangue, na pele e em tecidos linfóides como células maduras altamente ativadas (Overgaard *et al.*, 2015). De acordo com este artigo recente de revisão, os autores descrevem uma heterogeneidade da população de células DP, as quais podem desempenhar papéis supressores e citotóxicos. Estas células já foram descritas em lesões de esclerose múltipla, apresentando funções regulatórias (Eljaafari *et al.*, 2013; Parel *et al.*, 2007), e na infecção pelo HIV apresentam uma alta capacidade proliferativa e efectora (Frahm *et al.*, 2012). Nosso trabalho mostra que estas células tem um potencial citotóxico, apresentando uma frequência de células CD107a⁺ semelhante a frequência de linfócitos T CD8⁺ e células NK citotóxicas. Embora o recrutamento destas células para a lesão não esteja elucidado, nossos dados sugerem que os linfócitos T DP citotóxicos possam participar dos eventos imunológicos que ocorrem nas lesões de pacientes com a fase ativa da LC.

O papel crucial dos linfócitos T CD4⁺ em direcionar a resposta imune anti-*Leishmania* através de um perfil de citocinas está bem definido (Carvalho *et al.*, 2012; Da-Cruz *et al.*, 2002). No entanto, o papel dos linfócitos T CD4⁺ citotóxicos na LC ainda é pouco explorado (Naouar *et al.*, 2014; Nylén and Eidsmo, 2012).

Nylén e Eidsmo (2012) indicam que a degeneração basal de queratinócitos pode ser resultado da interação dos linfócitos T CD4⁺ citotóxicos com as células epidermais expressando antígenos de *Leishmania* (Nylén and Eidsmo, 2012). Recentemente, nosso grupo também observou que os linfócitos T CD4⁺ citotóxicos obtidos do sangue periférico podem participar da resposta imune de pacientes de LC (Cunha CF, comunicação pessoal). No atual trabalho, nós mostramos que estas células T CD4⁺

citotóxicas se encontram presentes na lesão e produzem perforina em resposta aos antígenos de *L.braziliensis*. Os linfócitos T CD4⁺ parecem estar envolvidos na reposta imune localizada, uma vez que apresentam uma frequência de células citotóxicas significativa na lesão, quando comparada com a frequência das células NK e de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos.

Os linfócitos T CD8⁺ apresentaram as menores frequência de células citotóxicas nas lesões de LC. Faria e colaboradores sugerem que a frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima B estaria diretamente associado à intensidade da reação inflamatória das lesões ulceradas de LC. Santos *et al.* (2013) mostraram que há um recrutamento de linfócitos T CD8⁺ de memória para a lesão de pacientes de LC causada por *L.braziliensis* e persistência dos mesmos no local. Estes autores também mostraram que a maioria das células CD8⁺ na lesão apresentavam fenótipo de células de memória efetora e eram predominantemente citotóxicas. De fato, nós observamos que a maioria dos linfócitos T CD8⁺ encontrados na lesão apresentavam fenótipo de células de memória efetora (CD45RA⁻ CD27⁻), porém apenas 1,8% do total de linfócitos T CD8⁺ na lesão eram citotóxicos dados não mostrados). Vale destacar que Santos *et al.* não avaliaram os linfócitos T CD8⁺ como células CD3⁺ e CD56⁻ em seu protocolo por citometria de fluxo, possibilitando a inclusão de outras populações linfocitárias, como células NK e NKT nesta análise, o que poderia acarretar em resultados diferentes em relação a frequência de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos na lesão.

Embora outros trabalhos da literatura enfatizem o papel dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos no dano tecidual da LC (Brodskyn *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2009; Novais e Scott, 2015), os nossos resultados mostram que os linfócitos T CD8⁺ são pouco comprometidos com a citotoxicidade que ocorre na lesão de LC se comparados com a frequência de outras células citotóxicas. Os linfócitos T CD8⁺ citotóxicos representam apenas 4% do total de linfócitos T CD8⁺ nas lesões de LC, e apenas 3% do total de células citotóxicas. Com base nestes dados, nós sugerimos que o dano tecidual associado à atividade citotóxica observado nas lesões dos pacientes de LC, não é causado pelos linfócitos T CD8⁺, embora nós não possamos excluir a possibilidade desta população citotóxica exercer um papel deletério.

Nesta terceira etapa do trabalho, nós nos concentramos na investigação da atividade citotóxica que ocorre no microambiente das lesões de pacientes na fase ativa de LC. Nós concluímos que a maior fonte de citotoxicidade nestas lesões são as células DN, sugerindo que estariam associadas ao dano tecidual, assim como as

células NKT e linfócitos T CD4⁺. Estas três populações, representam mais de 80% da atividade citotóxica observada nestas lesões e, por isso, os linfócitos T DP, linfócitos T CD8⁺ e as células NK, embora também participem dessa resposta, parecem ter pouca participação na mesma.

Estes dados abrem caminho para uma visão mais ampla da citotoxicidade como fenômeno imunomodulador, o qual pode ser exercido por populações distintas, com papéis específicos de cada uma delas na resposta imune.

A reunião dos nossos resultados reforça o papel crucial dos T CD8⁺ na imunopatogenia da LC, mostrando que a indução de apoptose destas células, a modulação da citotoxicidade e a indução da produção de IFN- γ são eventos críticos na resolução da lesão. A citotoxicidade mostrou-se como um fenômeno imunomodulador associado ao dano tecidual. No entanto, apesar do efeito deletério dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos, os linfócitos T DN e as células NKT parecem ser responsáveis pela intensidade da atividade citotóxica observada nas lesões ativas. Por fim, enquanto a evolução para a cura envolve a moderação da resposta citotóxica das células NKT e dos linfócitos T CD8⁺, os linfócitos T DN citotóxicos apresentam baixas frequências nos pacientes que apresentam cura clínica, sugerindo que um processo de regulação desta população esteja associado à cura.

Embora tenhamos contribuído com alguns esclarecimentos a respeito da resposta imune por linfócitos T CD8⁺ e por populações citotóxicas na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, os resultados obtidos geraram outros questionamentos: as células T DN e as células NKT citotóxicas atuam de forma antígeno-específica? Estas populações citotóxicas destroem macrófagos e células dendríticas infectadas por *Leishmania*? A destruição tecidual poderia ser decorrente da liberação de proteases por macrófagos hiperativados ou por linfócitos T citotóxicos que atuam na destruição de células epiteliais?

Devido à complexidade da interação entre o hospedeiro humano e o parasito, torna-se de grande importância o estudo dos fenômenos imunológicos que ocorrem em uma infecção natural por *Leishmania*, no caso de enxergarmos a possibilidade do desenvolvimento de uma vacina eficaz e tratamentos alternativos no futuro. O presente estudo apresentou características da resposta imune localizada e sistêmica, os quais nos permitiu estabelecer parâmetros associados à doença ativa e à evolução para a cura, principalmente no que diz respeito ao papel dos linfócitos T CD8⁺ e da

citotoxicidade, abrindo novas perspectivas para futuras abordagens que poderiam contribuir para um maior esclarecimento quanto a imunopatogenia da LC.

7. CONCLUSÕES

- A intensidade da resposta citotóxica parece estar associada ao dano tecidual na LC causada por *Leishmania braziliensis*.
- As alterações imunológicas que ocorrem durante o tratamento parecem representar eventos críticos da fase inicial do processo que leva à cura clínica.
- Os linfócitos T CD8⁺ tem um papel protetor na LC, através da produção de IFN- γ e um papel citotóxico que seria prejudicial, sendo a modulação das células citotóxicas e indução das células produtoras de IFN- γ fenômenos marcantes da evolução para a cura.
- A indução de linfócitos T CD8⁺ efetores durante a terapia pode estar associada a uma maior frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ ; enquanto a indução de apoptose de linfócitos T CD8⁺ efetores pode estar associada à modulação dos linfócitos T CD8⁺ citotóxicos.
- A modulação dos linfócitos T CD8⁺ e das células NKT citotóxicas parece ser um evento crítico para o processo de cicatrização, embora uma indução moderada destas células seja necessária para a manutenção da cura clínica.
- Apesar do papel prejudicial de uma resposta citotóxica exacerbada de linfócitos T CD8⁺, a citotoxicidade associada ao dano tecidual parece ser exercida principalmente pela atividade de linfócitos T DN e células NKT na lesão, assim como pelos linfócitos T CD4⁺.
- O papel citotóxico dos linfócitos T DN foi associado à patogênese da LC e a manutenção destas células citotóxicas em níveis basais pode contribuir para a evolução para a cura clínica.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilar, C.M., Rangel, E.F., 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, U.C., Bilgic, S., Erten, G., Deniz, G., 2009. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. Cell. Immunol. 254, 149-154.
- Alvar, J., Vélez, I.D., 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.
- Amato, V.S., de Andrade, H.F., Duarte, M.I.S., 2003. Mucosal Leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. Acta Trop. 85, 39-49.
- Amato, V.S., Tuon, F.F., Bacha, H.A., Neto, V.A., Nicodemo, A.C., 2008. Mucosal Leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. Acta Trop. 105, 1-9.
- Amato, V.S., Tuon, F.F., Imamura, R., Abegão de Camargo, R., Duarte, M.I., Neto, V.A., 2009. Mucosal Leishmaniasis: description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol. JEADV 23, 1026-1034.
- Anderson, C.F., Stumhofer, J.S., Hunter, C.A., Sacks, D., 2009. IL-27 regulates IL-10 and IL-17 from CD4+ cells in nonhealing *Leishmania major* infection. J. Immunol. Baltim. Md 1950 183, 4619-4627.
- Antonelli, L.R.V., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., Gollob, K.J., 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous Leishmaniasis. Immunol. Lett. 101, 226-230.
- Antonelli, L.R.V., Dutra, W.O., Oliveira, R.R., Torres, K.C.L., Guimarães, L.H., Bacellar, O., Gollob, K.J., 2006. Disparate Immunoregulatory Potentials for Double-Negative (CD4⁻ CD8⁻) and CD4⁺ T Cells from Human Patients with Cutaneous Leishmaniasis. Infect. Immun. 74, 6317-6323.

- Aranha, F.C.S., Ribeiro, U., Jr, Basse, P., Corbett, C.E.P., Laurenti, M.D., 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.
- Arevalo, J., Ramirez, L., Adai, V., Zimic, M., Tulliano, G., Miranda-Verástegui, C., Lazo, M., Loayza-Muro, R., De Doncker, S., Maurer, A., Chappuis, F., Dujardin, J.-C., Llanos-Cuentas, A., 2007. Influence of *Leishmania* (Viannia) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 195, 1846-1851.
- Azeredo-Coutinho, R.B.G., Mendonça, S.C.F., Callahan, H., Portal, A.C., Max, G., 2007. Sensitivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes to meglumine antimoniate (glucantime) is higher than that of other *Leishmania* species and correlates with response to therapy in American tegumentary Leishmaniasis. *J. Parasitol.* 93, 688-693.
- Baars, P.A., Ribeiro Do Couto, L.M., Leusen, J.H., Hooibrink, B., Kuijpers, T.W., Lens, S.M., van Lier, R.A., 2000. Cytolytic mechanisms and expression of activation-regulating receptors on effector-type CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ human T cells. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 1910-1917.
- Bacellar, O., Faria, D., Nascimento, M., Cardoso, T.M., Gollob, K.J., Dutra, W.O., Scott, P., Carvalho, E.M., 2009. IL-17 Production in Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 200, 75-78.
- Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Carvalho, E.M., 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal Leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 70, 6734-6740.
- Baldé, A.T., Sarthou, J.L., Roussilhon, C., 1995. Acute Plasmodium falciparum infection is associated with increased percentages of apoptotic cells. *Immunol. Lett.* 46, 59-62.
- Barral, A., Jesus, A.R., Almeida, R.P., Carvalho, E.M., Barral-Netto, M., Costa, J.M., Badaro, R., Rocha, H., Johnson, W.D., 1987. Evaluation of T-cell subsets in the lesion infiltrates of human cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 9, 487-497.

- Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., Carvalho, E.M., Reed, S.G., 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 17, 21-28.
- Belkaid, Y., Mendez, S., Lira, R., Kadambi, N., Milon, G., Sacks, D., 2000. A natural model of *Leishmania major* infection reveals a prolonged "silent" phase of parasite amplification in the skin before the onset of lesion formation and immunity. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 165, 969-977.
- Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M.C., Sacks, D., 2002. CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 168, 3992-4000.
- Bertho, A.L., Santiago, M.A., Coutinho, S.G., 2000. Flow cytometry in the study of cell death. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 429-433.
- Bertho, A.L., Santiago, M.A., Da-Cruz, A.M., Coutinho, S.G., 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., Debrabant, A., Afrin, F., Caler, E., Mendez, S., Tabbara, K.S., Belkaid, Y., Sacks, D.L., 2005. Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*-infected dendritic cells. *Infect. Immun.* 73, 6620-6628.
- Berzins S.P., Ritchie D.S., 2014. Natural killer T cells: drivers or passengers in preventing human disease? *Nat. Rev. Immunol.* 14(9), 640-6.
- Betts, M.R., Koup, R.A., 2004. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol.* 75, 497-512.
- Bittencourt, A.L., Barral, A., 1991. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous Leishmaniasis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86, 51-56.
- Bogdan, C., 2012. Natural killer cells in experimental and human Leishmaniasis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2.
- Bomfim, G., Andrade, B.B., Santos, S., Clarêncio, J., Barral-Netto, M., Barral, A., 2007. Cellular analysis of cutaneous Leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 854-859.

- Bottrel, R.L., Dutra, W.O., Martins, F.A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R.P., Mayrink, W., Locksley, R., Gollob, K.J., 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 69, 3232-3239.
- Boussoffara, 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.
- Brandonisio, O., Panaro, M.A., Sisto, M., Acquafredda, A., Fumarola, L., Leogrande, D., Mitolo, V., 2001. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. *Parassitologia* 43 Suppl 1, 1-6.
- Brelaz-de-Castro, M.C.A., de Almeida, A.F., de Oliveira, A.P., de Assis-Souza, M., da Rocha, L.F., Pereira, V.R.A., 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.
- Brodskyn, C.I., 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. Baltim. Md* 159, 4467-4473.
- Brown, D.M., 2010. Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell. Immunol.* 262, 89-95.
- Brunner, T., Mogil, R.J., LaFace, D., Yoo, N.J., Mahboubi, A., Echeverri, F., Martin, S.J., Force, W.R., Lynch, D.H., Ware, C.F., 1995. Cell-autonomous Fas (CD95)/Fas-ligand interaction mediates activation-induced apoptosis in T-cell hybridomas. *Nature* 373, 441-444.
- Campbell, J.P., Riddell, N.E., Burns, V.E., Turner, M., van Zanten, J.J.C.S.V., Drayson, M.T., Bosch, J.A., 2009. Acute exercise mobilises CD8+ T lymphocytes exhibiting an effector-memory phenotype. *Brain. Behav. Immun.* 23, 767-775.

- Cardoso, T.M., Machado, Á., Costa, D.L., Carvalho, L.P., Queiroz, A., Machado, P., Scott, P., Carvalho, E.M., Bacellar, O., 2015. Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect. Immun.* 83, 898–906.
- Carlsen, E.D., Liang, Y., Shelite, T.R., Walker, D.H., Melby, P.C., Soong, L., 2015. Permissive and protective roles for neutrophils in Leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 182, 109–118.
- Carvalho, L.P., Passos, S., Schriefer, A., Carvalho, E.M., 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary Leishmaniasis. *Front. Immunol.* 3, 301.
- Castellano, L.R., Llaguno, M., Silva, M.V., Machado, J.R., Correia, D., Silva-Vergara, M.L., Rodrigues, V., 2011. Immunophenotyping of circulating T cells in a mucosal Leishmaniasis patient coinfecting with HIV. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 44, 520–521.
- Castés, M., Tapia, F.J., 1998. [Immunopathology of American tegumentary Leishmaniasis]. *Acta Científica Venez.* 49, 42–56.
- Castillo, L., MacCallum, D.M., 2012. Cytokine measurement using cytometric bead arrays. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 845, 425–434.
- Clarêncio, J., de Oliveira, C.I., Bomfim, G., Pompeu, M.M., Teixeira, M.J., Barbosa, T.C., Souza-Neto, S., Carvalho, E.M., Brodskyn, C., Barral, A., Barral-Netto, M., 2006. Characterization of the T-cell receptor Vbeta repertoire in the human immune response against *Leishmania* parasites. *Infect. Immun.* 74, 4757–4765.
- Colmenares, M., Kima, P.E., 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.
- Conceição-Silva, F., Dórea, R.C., Pirmez, C., Schubach, A., Coutinho, S.G., 1990. Quantitative study of *Leishmania braziliensis braziliensis* reactive T cells in peripheral blood and in the lesions of patients with American mucocutaneous Leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 79, 221–226.
- Conceição-Silva, F., Dórea, R., Pirmez, C., Schubach, A.O., Cysne, L., Coutinho, S.G., 1988. Frequency of *Leishmania*-reactive T cells in lesions of American

mucocutaneous Leishmaniasis (AMCL) patients. Its relevance in the process of healing or aggravation of the disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83 Suppl 1, 403-406.

Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Santiago, M.A., De-Luca, P., 1998. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous Leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica AI 31, 139-142.

Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Santiago, M.A., De-Luca, P., 1998. Immunologic patterns associated with cure in human American cutaneous Leishmaniasis. Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica AI 31, 139-142.

Coutinho, S.G., Pirmez, C., Da-Cruz, A.M., 2002. Parasitological and immunological follow-up of American tegumentary Leishmaniasis patients. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 96 Suppl 1, S173-178.

Da Conceição-Silva, F., Perlaza, B.L., Louis, J.A., 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.

Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G., 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary Leishmaniasis lesions. Br. J. Dermatol. 153, 537-543.

Da-Cruz, A.M., Bittar, R., Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Nogueira, R., Pinho-Ribeiro, V., Azeredo-Coutinho, R.B., Coutinho, S.G., 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, A.M., Conceição-Silva, F., Bertho, A.L., Coutinho, S.G., 1994. *Leishmania*-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous Leishmaniasis. Infect. Immun. 62, 2614-2618.

Da-Cruz, A.M., de Oliveira, M.P., De Luca, P.M., Mendonça, S.C., Coutinho, S.G., 1996. Tumor necrosis factor-alpha in human American tegumentary Leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91, 225-229.

- Da-Cruz, A.M., Oliveira-Neto, M.P., Bertho, A.L., Mendes-Aguiar, C.O., Coutinho, S.G., 2010. T cells specific to *Leishmania* and other nonrelated microbial antigens can migrate to human Leishmaniasis skin lesions. *J. Invest. Dermatol.* 130, 1329–1336.
- Da-Cruz, A.M., Pirmez, C., 2005. Leishmaniose Tegumentar Americana, in: *Dinâmica Das Doenças Infecciosas E Parasitárias*. Coura, JR, Rio de Janeiro - Guanabara Koogan.
- Darzynkiewicz, Z., Juan, G., Li, X., Gorczyca, W., Murakami, T., Traganos, F., 1997. Cytometry in cell necrobiology: analysis of apoptosis and accidental cell death (necrosis). *Cytometry* 27, 1–20.
- Das, G., Vohra, H., Rao, K., Saha, B., Mishra, G.C., 1999. *Leishmania donovani* infection of a susceptible host results in CD4+ T-cell apoptosis and decreased Th1 cytokine production. *Scand. J. Immunol.* 49, 307–310.
- Debatin, K.-M., 2009. Growth control of normal and malignant lymphocytes--cell death research from basic concepts to signal pathways and translation into the clinic. *Klin. Pädiatr.* 221, 332–338.
- Debatin, K.M., Goldman, C.K., Waldmann, T.A., Krammer, P.H., 1993. APO-1-induced apoptosis of leukemia cells from patients with adult T-cell leukemia. *Blood* 81, 2972–2977.
- De Meis, J., Ferreira, L.M.S., Guillermo, L.V.C., Silva, E.M., Dosreis, G.A., Lopes, M.F., 2008. Apoptosis differentially regulates mesenteric and subcutaneous lymph node immune responses to *Trypanosoma cruzi*. *Eur. J. Immunol.* 38, 139–146.
- De Mendonça, S.C.F., Cysne-Finkelstein, L., Matos, D.C. de S., 2015. Kinetoplastid Membrane Protein-11 as a Vaccine Candidate and a Virulence Factor in *Leishmania*. *Front. Immunol.* 6, 524.
- De Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M. da S., 2006. 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, M.P., Mattos, M.S., Perez, M.A., Da-Cruz, A.M., Fernandes, O., Moreira, J., Gonçalves-Costa, S.C., Brahin, L.R., Menezes, C.R., Pirmez, C., 2000. American tegumentary Leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State,

- Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int. J. Dermatol.* 39, 506-514.
- Desbarats, J., Stone, J.E., Lin, L., Zakeri, Z.F., Davis, G.S., Pfeiffer, L.M., Titus, R.G., Newell, M.K., 2000. Rapid early onset lymphocyte cell death in mice resistant, but not susceptible to *Leishmania major* infection. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 5, 189-196.
- Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., Srinivasan, S., 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factors-beta 1 -beta 2 and -beta 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN-gamma. *J. Immunol. Baltim. Md* 150, 940-944.
- Donskoi, B.V., Chernyshov, V.P., Osypchuk, D.V., 2011. Measurement of NK activity in whole blood by the CD69 up-regulation after co-incubation with K562, comparison with NK cytotoxicity assays and CD107a degranulation assay. *J. Immunol. Methods* 372, 187-195.
- DosReis, G.A., Fonseca, M.E., Lopes, M.F., 1995. Programmed T-cell death in experimental chagas disease. *Parasitol. Today Pers. Ed* 11, 391-394.
- DosReis, G.A., Lopes, M.F., 2009. The importance of apoptosis for immune regulation in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 259-262.
- Eljaafari, A., Yurker, O., Ferrand, C., Farre, A., Addey, C., Tartelin, M.-L., Thomas, X., Tiberghien, P., Simpson, E., Rigal, D., Scott, D., 2013. Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cells and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone. *J. Immunol. Baltim. Md* 190, 184-194.
- Esterre, P., Dedet, J.P., Frenay, C., Chevallier, M., Grimaud, J.A., 1992. Cell populations in the lesion of human cutaneous Leishmaniasis: a light microscopical, immunohistochemical and ultrastructural study. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* 421, 239-247.
- Faria, D.R., Souza, P.E.A., Durães, F.V., Carvalho, E.M., Gollob, K.J., Machado, P.R., Dutra, W.O., 2009. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31, 432-439.

- Ferraz, R., Cunha, C.F., Pimentel, M.I., Lyra, M.R., Schubach, A.O., Mendonça, S.C.F. de, Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., 2015. T-cell receptor V β repertoire of CD8+ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous Leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*.
- Fesq, H., Bacher, M., Nain, M., Gemsa, D., 1994. Programmed cell death (apoptosis) in human monocytes infected by influenza A virus. *Immunobiology* 190, 175–182.
- Fleischer, B., 1984. Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4+ T lymphocytes in culture. *Nature* 308, 365–367.
- Frahm, M.A., Picking, R.A., Kuruc, J.D., McGee, K.S., Gay, C.L., Eron, J.J., Hicks, C.B., Tomaras, G.D., Ferrari, G., 2012. CD4+CD8+ T cells represent a significant portion of the anti-HIV T cell response to acute HIV infection. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 188, 4289–4296.
- Gagnon, S.J., Ennis, F.A., Rothman, A.L., 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., Godfrey, D.I., Rossjohn, J., 2013. Natural Killer T cell obsession with self-antigens. *Curr. Opin. Immunol.* 25, 168–173.
- Giaccoia-Gripp, C.B.W., Neves, I., Jr, Galhardo, M.C., Morgado, M.G., 2005. Flow cytometry evaluation of the T-cell receptor V β repertoire among HIV-1 infected individuals before and after antiretroviral therapy. *J. Clin. Immunol.* 25, 116–126.
- Gollob, K.J., Antonelli, L.R.V., Dutra, W.O., 2005. Insights into CD4+ memory T cells following *Leishmania* infection. *Trends Parasitol.* 21, 347–350.
- Gollob, K.J., Antonelli, L.R.V., Faria, D.R., Keesen, T.S.L., Dutra, W.O., 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous Leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1338–1343.
- Gollob, K.J., Viana, A.G., Dutra, W.O., 2014. Immunoregulation in human American Leishmaniasis: balancing pathology and protection. *Parasite Immunol.* 36, 367–376.

- Gomes-Silva, A., Da-Cruz, A.M., Pirmez, C., Pinto, E.F., Pereira-Olivera, M., 2014. Resposta Imune Celular no Processo de Cura da Leishmaniose Tegumentar Americana, in: *Leishmanioses do Continente Americano*. Editora Fiocruz, Rio de Janeiro, pp. 381-388.
- Gomes-Silva, A., de Cássia Bittar, R., Dos Santos Nogueira, R., Amato, V.S., da Silva Mattos, M., Oliveira-Neto, M.P., Coutinho, S.G., Da-Cruz, A.M., 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin. Exp. Immunol.* 149, 440-444.
- Gougeon, M.L., Montagnier, L., 1993. Apoptosis in AIDS. *Science* 260, 1269-1270.
- Graça GC, Volpini AC, Romero GA, Oliveira Neto MP, Hueb M, Porrozzi R, Boité MC, Cupolillo E., 2012. Development and validation of PCR-based assays for diagnosis of American cutaneous leishmaniasis and identification of the parasite species. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 107(5):664-74.
- Grayson, J.M., Harrington, L.E., Lanier, J.G., Wherry, E.J., Ahmed, R., 2002. Differential sensitivity of naive and memory CD8+ T cells to apoptosis in vivo. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 169, 3760-3770.
- Grimaldi, G., Tesh, R.B., 1993. *Leishmaniases of the New World: current concepts and implications for future research*. *Clin. Microbiol. Rev.* 6, 230-250.
- Guerra, J.A. de O., Maciel, M.G., Guerra, M.V. de F., Talhari, A.C., Prestes, S.R., Fernandes, M.A., Da-Cruz, A.M., Martins, A., Coelho, L.I. de A.R.C., Romero, G.A.S., Barbosa, M. das G.V., 2015. Tegumentary Leishmaniasis in the State of Amazonas: what have we learned and what do we need? *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48 Suppl 1, 12-19.
- Guillermo, L.V.C., Pereira, W.F., De Meis, J., Ribeiro-Gomes, F.L., Silva, E.M., Kroll-Palhares, K., Takiya, C.M., Lopes, M.F., 2009. Targeting caspases in intracellular protozoan infections. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 31, 159-173.
- Hagh, T.A., Lin, X., Jia, H., Hui, E.P., Chan, A.T.C., Rickinson, A.B., Taylor, G.S., 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. Baltim. Md* 1950 180, 1643-1654.

- Haldar, A.K., Sen, P., Roy, S., 2011. Use of antimony in the treatment of Leishmaniasis: current status and future directions. *Mol. Biol. Int.* 2011, 571242.
- Hamann, D., Baars, P.A., Rep, M.H.G., Hooibrink, B., Kerkhof-Garde, S.R., Klein, M.R., Lier, R.A.W. van, 1997. Phenotypic and Functional Separation of Memory and Effector Human CD8⁺ T Cells. *J. Exp. Med.* 186, 1407-1418.
- Hamann, D., Kostense, S., Wolthers, K.C., Otto, S.A., Baars, P.A., Miedema, F., van Lier, R.A., 1999. Evidence that human CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int. Immunol.* 11, 1027-1033.
- Hartley, M.-A., Kohl, K., Ronet, C., Fasel, N., 2013. The therapeutic potential of immune cross-talk in Leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 19, 119-130.
- Henriques-Pons, A., DeMeis, J., Cotta-De-Almeida, V., Savino, W., Araújo-Jorge, T.C., 2004. Fas and perforin are not required for thymus atrophy induced by *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp. Parasitol.* 107, 1-4.
- Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A., Becker, I., 2010a. 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.
- Hernández-Ruiz, J., Salaiza-Suazo, N., Carrada, G., Escoto, S., Ruiz-Remigio, A., Rosenstein, Y., Zentella, A., Becker, I., 2010b. 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, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.
- Hodge, G., Mukaro, V., Holmes, M., Reynolds, P.N., Hodge, S., 2012. Enhanced cytotoxic function of NK and NKT-like cells associated with decreased CD94 (Kp43) in the COPD airway. *Respirol. Carlton Vic.*
- Huang, F.P., Xu, D., Esfandiari, E.O., Sands, W., Wei, X.Q., Liew, F.Y., 1998. Mice defective in Fas are highly susceptible to *Leishmania major* infection despite elevated IL-12 synthesis, strong Th1 responses, and enhanced nitric oxide production. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 160, 4143-4147.

- 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.
- Jirmanus, L., Glesby, M.J., Guimarães, L.H., Lago, E., Rosa, M.E., Machado, P.R., Carvalho, E.M., 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary Leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 86, 426-433.
- Jones, D.E., Elloso, M.M., Scott, P., 1998. Host susceptibility factors to cutaneous Leishmaniasis. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 3, D1171-1180.
- Joyee, A.G., 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. Baltim. Md 1950* 184, 2095-2106.
- Keesen, T.S.L., Gomes, J.A.S., Fares, R.C.G., de Araújo, F.F., Ferreira, K.S., Chaves, A.T., Rocha, M.O.C., Correa-Oliveira, R., 2012. Characterization of CD4(+) Cytotoxic Lymphocytes and Apoptosis Markers Induced by Trypanosoma cruzi Infection. *Scand. J. Immunol.* 76, 311-319.
- Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R., 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26, 239-257.
- Kevric, I., Cappel, M.A., Keeling, J.H., 2015. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. *Dermatol. Clin.* 33, 579-593.
- Gollob, Lis R. V. Antonelli, Daniela R. Faria, Tatjana S. L. Keesen, Walderez O. Dutra, 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous Leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int. Immunopharmacol.* 8, 1338-1343.
- Korn, T., Oukka, M., Kuchroo, V., Bettelli, E., 2007. Th17 cells: effector T cells with inflammatory properties. *Semin. Immunol.* 19, 362-371.
- Krammer, P.H., 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407, 789-795.
- Lainson, R., 1983. The American *Leishmaniases*: some observations on their ecology and epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 569-596.

- Libri, V., Azevedo, R.I., Jackson, S.E., Di Mitri, D., Lachmann, R., Fuhrmann, S., Vukmanovic-Stejic, M., Yong, K., Battistini, L., Kern, F., Soares, M.V.D., Akbar, A.N., 2011. Cytomegalovirus infection induces the accumulation of short-lived, multifunctional CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ T cells: the potential involvement of interleukin-7 in this process. *Immunology* 132, 326–339.
- 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.
- Liew, F.Y., Hodson, K., Lelchuk, R., 1987. Prophylactic immunization against experimental Leishmaniasis. VI. Comparison of protective and disease-promoting T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 139, 3112–3117.
- Lima, H.C., Vasconcelos, A.W., David, J.R., Lerner, E.A., 1994. American cutaneous Leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 50, 743–747.
- Liu, D., Uzonna, J.E., 2012. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 2, 83.
- Locksley, R.M., Heinzl, F.P., Holaday, B.J., Mutha, S.S., Reiner, S.L., Sadick, M.D., 1991. Induction of Th1 and Th2 CD4⁺ subsets during murine *Leishmania major* infection. *Res. Immunol.* 142, 28–32.
- Lopes, M.F., DosReis, G.A., 1995. Apoptosis as a cause of T-cell unresponsiveness in experimental Chagas disease. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 28, 913–918.
- Lüder, C.G., Campos-Salinas, J., Gonzalez-Rey, E., van Zandbergen, G., 2010. Impact of protozoan cell death on parasite-host interactions and pathogenesis. *Parasit. Vectors* 3, 116.
- Lukacher, A.E., Morrison, L.A., Braciale, V.L., Malissen, B., Braciale, T.J., 1985. Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restricted, influenza virus-specific T lymphocyte clones. *J. Exp. Med.* 162, 171–187.

- 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., Araújo, C., Da Silva, A.T., Almeida, R.P., D'Oliveira Jr, A., Bittencourt, A., Carvalho, E.M., 2002a. Failure of early treatment of cutaneous Leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 34, E69-73.
- Machado, P., Kanitakis, J., Almeida, R., Chalon, A., Araújo, C., Carvalho, E.M., 2002b. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous Leishmaniasis. *Eur. J. Dermatol. EJD* 12, 449-451.
- Maimone, M.M., Morrison, L.A., Braciale, V.L., Braciale, T.J., 1986. Features of target cell lysis by class I and class II MHC-restricted cytolytic T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 137, 3639-3643.
- Mancianti, F., 2004. [Feline Leishmaniasis: what's the epidemiological role of the cat?]. *Parassitologia* 46, 203-206.
- Marsden, P.D., 1986. Mucosal Leishmaniasis (Espundia- Escomel, 1911). *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 80, 859-876.
- Marsden, P.D., Tada, M.S., Barreto, A.C., Cuba, C.C., 1984. Spontaneous healing of *Leishmania braziliensis* skin ulcers. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 78, 561-562.
- Matsumoto, J., Kawai, S., Terao, K., Kirinoki, M., Yasutomi, Y., Aikawa, M., Matsuda, H., 2000. Malaria infection induces rapid elevation of the soluble Fas ligand level in serum and subsequent T lymphocytopenia: possible factors responsible for the differences in susceptibility of two species of Macaca monkeys to Plasmodium coatneyi infection. *Infect. Immun.* 68, 1183-1188.
- Matsumoto M, Yasukawa M, Inatsuki A, Kobayashi Y. 1991. Human double-negative (CD4-CD8-) T cells bearing alpha beta T cell receptor possess both helper and cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol.* 85(3):525-30.
- Maurer, M., Dondji, B., von Stebut, E., 2009. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from Leishmaniasis. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 198, 137-146.

- Mendes-Aguiar, C. de O., Gomes-Silva, A., Nunes, E., Pereira-Carvalho, R., Nogueira, R.S., Oliveira-Neto, M. de P., Bertho, A.L., Da-Cruz, A.M., 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, M.G., de Brito, M.E.F., Rodrigues, E.H.G., Bandeira, V., Jardim, M.L., Abath, F.G.C., 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, S.C., Coutinho, S.G., Amendoeira, R.R., Marzochi, M.C., Pirmez, C., 1986. Human american cutaneous Leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. Clin. Exp. Immunol. 64, 269–276.
- Mendonça, S.C., Russell, D.G., Coutinho, S.G., 1991. Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp 63). Clin. Exp. Immunol. 83, 472–478.
- Menezes, C.A.S., Rocha, M.O.C., Souza, P.E.A., Chaves, A.C.L., Gollob, K.J., Dutra, W.O., 2004. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and CD28- cells from chagasic patients: distinct repertoire and cytokine expression. Clin. Exp. Immunol. 137, 129–138.
- Meymandi, S.S., Javadi, A., Dabiri Shahriar, S., Meymandi, M.S., Nadji, M., 2011. Comparative Histological and immunohistochemical Changes of Dry Type Cutaneous Leishmaniasis after Administration of Meglumine Antimoniate, Imiquimod or Combination Therapy. Archives of Iranian Medicine 14, 238–243.
- Morgado, F.N., Schubach, A., Vasconcellos, E., Azeredo-Coutinho, R.B., Valet-Rosalino, C.M., Quintella, L.P., Santos, G., Salgueiro, M., Palmeiro, M.R., Conceição-Silva, F., 2010. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary Leishmaniasis. Parasite Immunol. 32, 285–295.
- Mou, Z., Liu, D., Okwor, I., Jia, P., Orihara, K., Uzonna, J.E., 2014. MHC Class II Restricted Innate-Like Double Negative T Cells Contribute to Optimal Primary and Secondary Immunity to *Leishmania major*. PLoS Pathog. 10.

- Mukherjee, P., Sen, P.C., Ghose, A.C., 2006. Lymph node cells from BALB/c mice with chronic visceral Leishmaniasis exhibiting cellular anergy and apoptosis: involvement of Ser/Thr phosphatase. *Apoptosis Int. J. Program. Cell Death* 11, 2013–2029.
- Murray, H.W., Delph-Etienne, S., 2000. Roles of endogenous gamma interferon and macrophage microbicidal mechanisms in host response to chemotherapy in experimental visceral Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 68, 288–293.
- Naik, S., Bouladoux, N., Wilhelm, C., Molloy, M.J., Salcedo, R., Kastenmuller, W., Deming, C., Quinones, M., Koo, L., Conlan, S., Spencer, S., Hall, J.A., Dzutsev, A., Kong, H., Campbell, D.J., Trinchieri, G., Segre, J.A., Belkaid, Y., 2012. Compartmentalized control of skin immunity by resident commensals. *Science* 337, 1115–1119.
- Naouar, I., Boussoffara, T., Ben Ahmed, M., Belhaj Hmida, N., Gharbi, A., Gritli, S., Ben Salah, A., Louzir, H., 2014. Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. *Mediators Inflamm.* 2014, 636039.
- Nascimento, T., 2009. Estudo clínico-laboratorial de casos de insucesso terapêutico durante o uso de antimonial pentavalente no tratamento de portadores de leishmaniose tegumentar Americana. *Dissertação de Mestrado*, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- Nateghi Rostami, M., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T., Mahboudi, F., Khamesipour, A., 2010. CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e845.
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M.C., Grignani, F., Riccardi, C., 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139, 271–279.
- Nikolova, M., Lelievre, J.-D., Carriere, M., Bensussan, A., Lévy, Y., 2009. Regulatory T cells differentially modulate the maturation and apoptosis of human CD8+ T-cell subsets. *Blood* 113, 4556–4565.
- Nishimura, T., Kitamura, H., Iwakabe, K., Yahata, T., Ohta, A., Sato, M., Takeda, K., Okumura, K., Van Kaer, L., Kawano, T., Taniguchi, M., Nakui, M., Sekimoto, M., Koda, T., 2000. The interface between innate and acquired immunity: glycolipid

- antigen presentation by CD1d-expressing dendritic cells to NKT cells induces the differentiation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes. *Int. Immunol.* 12, 987-994.
- Novais, F.O., Scott, P., 2015. CD8(+) T cells in cutaneous Leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin. Immunopathol.*
- Nylén, S., Eidsmo, L., 2012. Tissue damage and immunity in cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 34, 551-561.
- Nylén, S., Maasho, K., Söderstrom, K., Ilg, T., Akuffo, H., 2003. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin. Exp. Immunol.* 131, 457-467.
- Okwor, I., Uzonna, J., 2008. Persistent parasites and immunologic memory in cutaneous Leishmaniasis: implications for vaccine designs and vaccination strategies. *Immunol. Res.* 41, 123-136.
- Oliveira, L.F., Schubach, A.O., Martins, M.M., Passos, S.L., Oliveira, R.V., Marzochi, M.C., Andrade, C.A., 2011. Systematic review of the adverse effects of cutaneous Leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 118, 87-96.
- Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M., Pirmez, C., Fernandes, O., Gonçalves-Costa, S.C., Souza, C.F., 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. São Paulo* 42, 321-325.
- Oliveira-Neto, M.P., Mattos, M., Souza, C.S., Fernandes, O., Pirmez, C., 1998. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous Leishmaniasis. *Int. J. Dermatol.* 37, 846-849.
- Oliveira Neto, M.P., Schubach, A., Araujo, M.L., Pirmez, C., 1996. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous Leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 91, 207-209.
- Oliveira-Neto, M.P., Schubach, A., Mattos, M., Gonçalves-Costa, S.C., 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. (Paris)* 45, 496-499.
- O'Reilly, V., Zeng, S.G., Bricard, G., Atzberger, A., Hogan, A.E., Jackson, J., Feighery, C., Porcelli, S.A., Doherty, D.G., 2011. Distinct and Overlapping Effector

Functions of Expanded Human CD4⁺, CD8⁺ and CD4-CD8⁺ Invariant Natural Killer T Cells. PLoS ONE 6.

Ouellette, M., Drummel-Smith, J., Papadopoulou, B., 2004. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. Drug Resist. Updat. Rev. Comment. Antimicrob. Anticancer Chemother. 7, 257-266.

Overgaard, N.H., Jung, J.-W., Steptoe, R.J., Wells, J.W., 2015. CD4⁺/CD8⁺ double-positive T cells: more than just a developmental stage? J. Leukoc. Biol. 97, 31-38.

Pantaleo, G., Demarest, J.F., Soudeyns, H., Graziosi, C., Denis, F., Adelsberger, J.W., Borrow, P., Saag, M.S., Shaw, G.M., Sekaly, R.P., 1994. Major expansion of CD8⁺ T cells with a predominant V beta usage during the primary immune response to HIV. Nature 370, 463-467.

Parel, Y., Aurrand-Lions, M., Scheja, A., Dayer, J.-M., Roosnek, E., Chizzolini, C., 2007. Presence of CD4⁺CD8⁺ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. Arthritis Rheum. 56, 3459-3467.

Pereira-Carvalho, R., Mendes-Aguiar, C.O., Oliveira-Neto, M.P., Covas, C.J.F., Bertho, A.L., Da-Cruz, A.M., Gomes-Silva, A., 2013. *Leishmania braziliensis*-reactive T cells are down-regulated in long-term cured cutaneous Leishmaniasis, but the renewal capacity of T effector memory compartments is preserved. PloS One 8, e81529.

Peters, P.J., Borst, J., Oorschot, V., Fukuda, M., Krähenbühl, O., Tschopp, J., Slot, J.W., Geuze, H.J., 1991. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. J. Exp. Med. 173, 1099-1109.

Picker, L.J., Singh, M.K., Zdraveski, Z., Treer, J.R., Waldrop, S.L., Bergstresser, P.R., Maino, V.C., 1995. Direct demonstration of cytokine synthesis heterogeneity among human memory/effector T cells by flow cytometry. Blood 86, 1408-1419.

Pinheiro, R.O., Pinto, E.F., Benedito, A.B., Lopes, U.G., Rossi-Bergmann, B., 2004. The T-cell anergy induced by *Leishmania amazonensis* antigens is related with defective antigen presentation and apoptosis. An. Acad. Bras. Ciênc. 76, 519-527.

- Pirmez, C., Yamamura, M., Uyemura, K., Paes-Oliveira, M., Conceição-Silva, F., Modlin, R.L., 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. *J. Clin. Invest.* 91, 1390-1395.
- Pompeu, M.M., Brodskyn, C., Teixeira, M.J., Clarêncio, J., Van Weyenberg, J., Coelho, I.C., Cardoso, S.A., Barral, A., Barral-Netto, M., 2001. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. *Infect. Immun.* 69, 7453-7460.
- Quintella, L.P., Passos, S.R.L., de Miranda, L.H.M., Cuzzi, T., Barros, M.B. de L., Francesconi-do-Vale, A.C., Galhardo, M.C.G., Madeira, M. de F., Figueiredo de Carvalho, M.H., Schubach, A. de O., 2012. Proposal of a histopathological predictive rule for the differential diagnosis between American tegumentary Leishmaniasis and sporotrichosis skin lesions. *Br. J. Dermatol.* 167, 837-846.
- Rangel, E.F., Lainson, R., 2009. Proven and putative vectors of American cutaneous Leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104, 937-954.
- Reithinger, R., Dujardin, J.-C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7, 581-596.
- Rey, L., 2008. Parasitologia - Parasitos e Doenças Parasitárias do Homem nos Trópicos Ocidentais, 4ª ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- Ria, F., van den Elzen, P., Madakamutil, L.T., Miller, J.E., Maverakis, E., Sercarz, E.E., 2001. Molecular characterization of the T cell repertoire using immunoscope analysis and its possible implementation in clinical practice. *Curr. Mol. Med.* 1, 297-304.
- Ribeiro-de-Jesus, A., Almeida, R.P., Lessa, H., Bacellar, O., Carvalho, E.M., 1998. Cytokine profile and pathology in human Leishmaniasis. *Braz. J. Med. Biol. Res. Rev. Bras. Pesqui. Médicas E Biológicas Soc. Bras. Biofísica* 31, 143-148.
- Rojas, R., Valderrama, L., Valderrama, M., Varona, M.X., Ouellette, M., Saravia, N.G., 2006. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania* (Viannia) infection. *J. Infect. Dis.* 193, 1375-1383.
- Ruiz, J.H., Becker, I., 2007. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 29, 671-678.

- Sacks, D., Noben-Trauth, N., 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 845–858.
- Saha, S., Mondal, S., Ravindran, R., Bhowmick, S., Modak, D., Mallick, S., Rahman, M., Kar, S., Goswami, R., Guha, S.K., Pramanik, N., Saha, B., Ali, N., 2007. IL-10- and TGF-beta-mediated susceptibility in kala-azar and post-kala-azar dermal Leishmaniasis: the significance of amphotericin B in the control of *Leishmania donovani* infection in India. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 179, 5592–5603.
- Sallusto, F., Lenig, D., Förster, R., Lipp, M., Lanzavecchia, A., 1999. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature* 401, 708–712.
- Santiago, M.A., Luca, P.M., Bertho, A.L., Azeredo-Coutinho, R.B., Coutinho, S.G., 2000a. Detection of intracytoplasmic cytokines by flow cytometry. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 95, 401–402.
- Santiago, M.A., Luca, P.M., Bertho, A.L., Azeredo-Coutinho, R.B., Coutinho, S.G., 2000b. 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, M.J., Noronha, A., Costa, J., Borges, V.M., de Oliveira, C.I., Van Weyenbergh, J., Barral, A., Barral-Netto, M., Brodskyn, C.I., 2013. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN- γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous Leishmaniasis. *J. Invest. Dermatol.* 133, 1533–1540.
- Santos, D.O., Coutinho, C.E.R., Madeira, M.F., Bottino, C.G., Vieira, R.T., Nascimento, S.B., Bernardino, A., Bourguignon, S.C., Corte-Real, S., Pinho, R.T., Rodrigues, C.R., Castro, H.C., 2008. Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol. Res.* 103, 1–10.
- Schmid, I., Uittenbogaart, C.H., Keld, B., Giorgi, J.V., 1994. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 170, 145–157.
- Schmid, I., Uittenbogaart, C., Jamieson, B.D., 2007. Live-cell assay for detection of apoptosis by dual-laser flow cytometry using Hoechst 33342 and 7-amino-actinomycin D. *Nat. Protoc.* 2, 187–190.

- Schriefer, A., Schriefer, A.L.F., Góes-Neto, A., Guimarães, L.H., Carvalho, L.P., Almeida, R.P., Machado, P.R., Lessa, H.A., de Jesus, A.R., Riley, L.W., Carvalho, E.M., 2004. Multiclonal *Leishmania braziliensis* Population Structure and Its Clinical Implication in a Region of Endemicity for American Tegumentary Leishmaniasis. *Infect. Immun.* 72, 508–514.
- Schriefer, A., Wilson, M.E., Carvalho, E.M., 2008. Recent developments leading toward a paradigm switch in the diagnostic and therapeutic approach to human Leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 21, 483–488.
- Schubach, A., Haddad, F., Oliveira-Neto, M.P., 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.
- Shaha, C., 2006. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J. Med. Res.* 123, 233–244.
- Silva, H.A.L. da, Lima, G.S. de, Boité, M.C., Porrozzi, R., Hueb, M., Damazo, A.S., 2015. Expression of annexin A1 in *Leishmania*-infected skin and its correlation with histopathological features. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 48, 560–567.
- Silveira, F.T., Lainson, R., De Castro Gomes, C.M., Laurenti, M.D., Corbett, C.E.P., 2009. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and L. (L.) *amazonensis* in American cutaneous Leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 31, 423–431.
- Silverio, J.C., Pereira, I.R., Cipitelli, M. da C., Vinagre, N.F., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., Lannes-Vieira, J., 2012. CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog.* 8, e1002645.
- Sloand, E.M., Young, N.S., Kumar, P., Weichold, F.F., Sato, T., Maciejewski, J.P., 1997. Role of Fas ligand and receptor in the mechanism of T-cell depletion in acquired immunodeficiency syndrome: effect on CD4+ lymphocyte depletion and human immunodeficiency virus replication. *Blood* 89, 1357–1363.
- Smith, L.E., Rodrigues, M., Russell, D.G., 1991. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. *J. Exp. Med.* 174, 499–505.

- Smyth, M.J., Crowe, N.Y., Hayakawa, Y., Takeda, K., Yagita, H., Godfrey, D.I., 2002. NKT cells - conductors of tumor immunity? *Curr. Opin. Immunol.* 14, 165-171.
- Sommer, F., Meixner, M., Mannherz, M., Ogilvie, A.L., Röllinghoff, M., Lohoff, M., 1998. Analysis of cytokine patterns produced by individual CD4+ lymph node cells during experimental murine Leishmaniasis in resistant and susceptible mice. *Int. Immunol.* 10, 1853-1861.
- Souza-Silva, F., Bourguignon, S.C., Pereira, B.A.S., Côrtes, L.M. de C., de Oliveira, L.F.G., Henriques-Pons, A., Finkelstein, L.C., Ferreira, V.F., Carneiro, P.F., de Pinho, R.T., Caffarena, E.R., Alves, C.R., 2015. Epoxy-lapachone has in vitro and in vivo anti-*Leishmania (Leishmania) amazonensis* effects and inhibits serine proteinase activity in this parasite. *Antimicrob. Agents Chemother.* 59, 1910-1918.
- Souza, W.J., Sabroza, P.C., Santos, C.S., de Sousa, E., Henrique, M.F., Coutinho, S.G., 1992. Montenegro skin tests for American cutaneous Leishmaniasis carried out on school children in Rio de Janeiro, Brazil: an indicator of transmission risk. *Acta Trop.* 52, 111-119.
- Stenger, S., Hanson, D.A., Teitelbaum, R., Dewan, P., Niazi, K.R., Froelich, C.J., Ganz, T., Thoma-Uszynski, S., Melián, A., Bogdan, C., Porcelli, S.A., Bloom, B.R., Krensky, A.M., Modlin, R.L., 1998. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 282, 121-125.
- Sun, J.C., Lanier, L.L., 2011. NK cell development, homeostasis and function: parallels with CD8+ T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 11, 645-657.
- SVS, S. de V. em S., Ministério da Saúde, 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [WWW Document]. URL http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_Ita_2ed.pdf (accessed 11.13.12).
- Toledo, V.P., Mayrink, W., Gollob, K.J., Oliveira, M.A., Costa, C.A., Genaro, O., Pinto, J.A., Afonso, L.C., 2001. Immunochemotherapy in American cutaneous Leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 96, 89-98.
- Trapani J.A. & Smyth M.J., 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 735-747

- Tuon, F.F., Gomes-Silva, A., Da-Cruz, A.M., Duarte, M.I.S., Neto, V.A., Amato, V.S., 2008. Local immunological factors associated with recurrence of mucosal Leishmaniasis. *Clin. Immunol. Orlando Fla* 128, 442-446.
- Uzonna, J.E., Joyce, K.L., Scott, P., 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J. Exp. Med.* 199, 1559-1566.
- Van Leeuwen, E.M.M., Remmerswaal, E.B.M., Vossen, M.T.M., Rowshani, A.T., Wertheim-van Dillen, P.M.E., van Lier, R.A.W., ten Berge, I.J.M., 2004. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 173, 1834-1841.
- Vasan, S., Tsuji, M., 2010. A double-edged sword: the role of NKT cells in malaria and HIV infection and immunity. *Semin. Immunol.* 22, 87-96.
- Vega-López, F., 2003. Diagnosis of cutaneous Leishmaniasis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 16, 97-101.
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H., Reutelingsperger, C., 1995. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184, 39-51.
- Vieira-Gonçalves, R., Nogueira, R.S., Heringer, J.F., Mendes-Aguiar, C.O., Gomes-Silva, A., Santos-Oliveira, J.R., Oliveira-Neto, M.P., Da-Cruz, A.M., 2015. Clinical and immunological evidence that low doses of pentavalent antimonials are effective in maintaining long-term cure of *Leishmania (Viannia) braziliensis* cutaneous lesions. *Br. J. Dermatol.* 173, 571-573.
- Vieira-Gonçalves, R., Pirmez, C., Jorge, M.E., Souza, W.J.S., Oliveira, M.P., Rutowitsch, M.S., Da-Cruz, A.M., 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.
- Wagner, H., Starzinski-Powitz, A., Jung, H., Röllinghoff, M., 1977. Induction of I region-restricted hapten-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 119, 1365-1368.

- Walker, N.I., Harmon, B.V., Gobé, G.C., Kerr, J.F., 1988. Patterns of cell death. *Methods Achiev. Exp. Pathol.* 13, 18–54.
- Weiss, L., Roux, A., Garcia, S., Demouchy, C., Haeffner-Cavaillon, N., Kazatchkine, M.D., Gougeon, M.L., 1998. Persistent expansion, in a human immunodeficiency virus-infected person, of V beta-restricted CD4+CD8+ T lymphocytes that express cytotoxicity-associated molecules and are committed to produce interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J. Infect. Dis.* 178, 1158–1162.
- WHO, 2015. WHO Leishmaniasis [WWW Document]. WHO. URL <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> (accessed 11.5.15).
- Wu, L., Van Kaer, L., 2009. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr. Mol. Med.* 9, 4–14.
- Wyllie, A., 1998. Apoptosis. An endonuclease at last. *Nature* 391, 20–21.
- Zaph, C., Uzonna, J., Beverley, S.M., Scott, P., 2004. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat. Med.* 10, 1104–1110.
- Zaritskaya, L., Shurin, M.R., Sayers, T.J., Malyguine, A.M., 2010. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev. Vaccines* 9, 601–616.
- Zaunders, J.J., Dyer, W.B., Wang, B., Munier, M.L., Miranda-Saksena, M., Newton, R., Moore, J., Mackay, C.R., Cooper, D.A., Saksena, N.K., Kelleher, A.D., 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.
- Zimmermann, M., Meyer, N., 2011. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* 740, 57–63.