

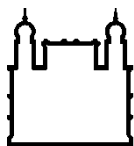
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

PARTICIPAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES CITOTÓXICAS NA
IMUNOPATOGENIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA
CAUSADA POR *Leishmania (V.) braziliensis*:
AVALIAÇÕES NA FASE ATIVA DA DOENÇA, DURANTE E APÓS A
TERAPIA ANTIMONIAL E EM EPISÓDIOS DE FALHA TERAPÊUTICA.

CLARISSA FERREIRA CUNHA

Rio de Janeiro
Julho de 2017



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CLARISSA FERREIRA CUNHA

PARTICIPAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES CITOTÓXICAS NA IMUNOPATOGENIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA CAUSADA POR *Leishmania (V.) braziliensis*: AVALIAÇÕES NA FASE ATIVA DA DOENÇA, DURANTE E APÓS A TERAPIA ANTIMONIAL E EM EPISÓDIOS DE FALHA TERAPÊUTICA.

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz
como parte dos requisitos para obtenção do título
de Doutor em Ciências.

Orientador (es): Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos

Prof. Dra. Alda Maria da Cruz

RIO DE JANEIRO

Julho de 2017

FERREIRA CUNHA, CLARISSA .

PARTICIPAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES CITOTÓXICAS NA IMUNOPATOGENIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA CAUSADA POR *Leishmania (V.) braziliensis* : AVALIAÇÕES NA FASE ATIVA DA DOENÇA, DURANTE E APÓS A TERAPIA ANTIMONIAL E EM EPISÓDIOS DE FALHA TERAPÊUTICA / CLARISSA FERREIRA CUNHA. - Rio de janeiro, 2017.

202 f.

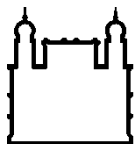
Tese (Doutorado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Parasitária, 2017.

Orientador: ALVARO LUIZ BERTHO DOS SANTOS.

Co-orientadora: ALDA MARIA DA CRUZ.

Bibliografia: f. 108-128

1. LEISHMANIOSE TEGUMENTAR. 2. CITOTOXICIDADE. 3. LINFOCITOS. 4. NK. 5. NKT. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

CLARISSA FERREIRA CUNHA:

**PARTICIPAÇÃO DAS POPULAÇÕES CELULARES CITOTÓXICAS NA
IMUNOPATOGENIA DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA HUMANA CAUSADA POR
Leishmania (V.) braziliensis: AVALIAÇÕES NA FASE ATIVA DA DOENÇA,
DURANTE E APÓS A TERAPIA ANTIMONIAL E EM EPISÓDIOS DE FALHA
TERAPÊUTICA.**

**ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Álvaro Luiz Bertho dos Santos
Prof. Dra. Alda Maria da Cruz**

Aprovada em: ____/____/____

EXAMINADORES:

Dra. Kátia da Silva Calabrese – Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

Dra. Walderez Ornelas Dutra – Laboratório de Biologia das Interações Celulares, Instituto de Ciências Biológicas/ UFMG.

Dra. Carmem Beatriz Wagner Giacoia Gripp – Laboratório de AIDS e Imunologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

Dra. Joanna Reis Santos de Oliveira – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro/ IFRJ.

Dra. Andrea Henriques Pons – Laboratório de Inovações em Terapias, Ensino e Bioprodutos, Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

Rio de Janeiro, 14 de julho de 2017

Aos meus pais, que sempre acreditaram em mim e se dedicaram na realização dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores, que me apoiaram e permitiram que eu chegasse até aqui. Obrigada Dr. Álvaro, pela oportunidade concedida, por todos os ensinamentos, pela confiança, por me ajudar a trilhar uma carreira e ser a base para meu crescimento profissional e pessoal. Obrigada Dra. Alda, por todo o apoio e carinho nestes anos. Muito obrigada!

À Raquel Ferraz, amiga que fiz desde o primeiro dia de laboratório. Obrigada pela amizade, pelo companheirismo, pelas lições, por todos os minutos de trabalho, de cumplicidade, de tristeza, de frustrações e alegrias compartilhadas.

Aos meus pais, pelo amor e apoio incondicionais. Vocês são meu chão, meu porto seguro. Obrigada por sempre acreditarem em mim. Faltam-me palavras para expressar a minha eterna gratidão. Aos meus irmãos, Felipe e Clara, pelo amor e pela alegria! Cada passo dado é impulsionado por vocês.

Ao Victor, pelo amor acima de tudo, pela paciência e apoio durante todos esses anos.

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

À todos os meus amigos, tão fundamentais em toda a minha vida! Obrigada por estarem presentes mesmo quando distantes. Em especial à Marina, por dividir comigo a rotina, as horas difíceis, as noites de estudo e luz acesa e, principalmente, os dias de sucesso e as felicidades. Em especial também aos meus “presentes de Oswaldo”: obrigada Marcela, Nathália e Carol! Pela amizade diária e por tornarem estes anos tão felizes!

À toda a equipe do LIP! Em especial à Dra. Léa e ao Dr. Josué, pelos ensinamentos e carinho; à Aline, Virgínia e Dr. Juan, pela amizade, companheirismo e por estarem sempre presentes me apoiando.

À toda a equipe do VigiLeish e ao Ambulatório do INI, pela preciosa colaboração, em especial ao Dr. Armando Schubach, Dr. Marcelo Rosandisky Lyra, Dra. Maria Inês Pimentel, Michelle Moreira e Liliane Antônio, pessoas que confiaram no meu trabalho e estiveram à disposição para toda a ajuda necessária.

Aos pacientes e aos voluntários que aceitaram participar deste estudo.

À Plataforma Multiusuário de Citometria de Fluxo do IOC, Núcleo de Purificação Celular, em especial ao Alessandro Marins e Thaize Quiroga, por compartilharem os dias, os trabalhos e os ensinamentos. À Plataforma de Citometria de Fluxo do PDTIS, em especial à Dra. Íris Marins Peixoto.

À equipe da Pós-graduação em Biologia Parasitária e aos professores que enriqueceram minha jornada profissional. Em especial à Rita, que esteve sempre disponível e auxiliando nestes anos.

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

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudos e oportunidade de alcançar este tão sonhado título.

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

Albert Einstein

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Aspectos epidemiológicos	19
1.2. Ciclo de vida do protozoário	24
1.3. Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana	26
1.3.1. Leishmaniose Cutânea Inaparente ou Subclínica	26
1.3.2. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)	26
1.3.3. Leishmaniose Recidiva Cútis (LRC)	27
1.3.4. Leishmaniose Disseminada (Ldiss)	27
1.3.5. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)	28
1.3.6. Leishmaniose Mucosa (LM)	28
1.4. Diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana	29
1.5. Imunopatogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana	32
2. JUSTIFICATIVA	44
3. OBJETIVO GERAL	45
3.1. Objetivos Específicos	45
4. MATERIAL E MÉTODOS	47
4.1. Casuística	47
4.2. Coleta do Material Biológico	49
4.3. Obtenção, Criopreservação e Recuperação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)	49
4.4. Parte 1 – Ensaios <i>ex vivo</i>	50
4.4.1. Citometria de Fluxo	52
4.5. Parte 2 – Ensaios <i>in vitro</i>	53
4.5.1. Citometria de Fluxo	55
4.5.2. Cinética de padronização do tempo de cultivo <i>in vitro</i>	56
4.5.3. Preparo do antígeno particulado de <i>L. (V.) braziliensis</i> (Lb-Ag)	57
4.6. Parte 3	58
4.6.1. Experimentos <i>in vitro</i>	58
4.6.1.1. Expressão de CLA	58
4.6.1.2. Grupo de Pacientes com Falha Terapêutica (FT)	58
4.6.2. Quantificação de IL-15	59

4.7.	Análise Estatística	60
5.	RESULTADOS	61
5.1.	Parte 1 – Artigo I (Publicado; anexo 2)	61
5.1.1.	Frequencia de linfócitos T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ , células NK e NKT.	61
5.1.2.	Expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ , células NK e NKT.	63
5.1.3.	Densidade de expressão de CD8.	65
5.1.4.	Densidade de expressão de CD56.	66
5.1.5.	Subpopulações de células NKT	66
5.2.	Parte 2 – Artigo II (Submetido; anexo 3)	69
5.2.1.	Características dos pacientes.	69
5.2.2.	Os antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> induzem expansão das células T CD8 ⁺ , NK e CD3 ⁺ CD56 ⁺ NKT e contração de linfócitos T CD4 ⁺ em pacientes de LC.	69
5.2.3.	A maioria das células NKT CD3 ⁺ CD56 ⁺ não expressa TCR invariante.	72
5.2.4.	Os antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> induzem aumento de células T CD4 ⁺ , NK e NKT CD3 ⁺ CD56 ⁺ ativadas e em degranulação em todos os grupos de pacientes de LC.	73
5.2.5.	Os antígenos de <i>L. (V.) braziliensis</i> induzem a exaustão de células NK nos pacientes de LC.	76
5.2.6.	Os linfócitos T CD4 ⁺ representam a maior proporção de células que expressam os biomarcadores CD107a, CD38 e CD279.	76
5.3.	Parte 3	80
5.3.1.	Expressão de CLA	80
5.3.2.	Grupo de Pacientes com Falha Terapêutica (FT)	89
5.3.3.	Quantificação de IL-15	90
6.	DISCUSSÃO	93
7.	CONCLUSÕES	107
8.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108
9.	ANEXOS	129
9.1.	ANEXO 1	129
9.2.	ANEXO 2	130

9.3.	ANEXO 3	142
9.4.	ANEXO 4	178
9.5.	ANEXO 5	191

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Mapa da endemicidade mundial da Leishmaniose Tegumentar	20
Figura 2: Densidade de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana	21
Figura 3: Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar por unidade federada do território brasileiro.....	22
Figura 4: Ciclo de vida de <i>Leishmania spp.</i>	25
Figura 5. Experimento de cinética	57
Figura 6. Protocolo citofluorimétrico representativo.....	62
Figura 7. Frequências de linfócitos T CD8 ⁺ , linfócitos T CD4 ⁺ e células NK	63
Figura 8. Expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8 ⁺ , linfócitos T CD4 ⁺ , células NK e células NKT	64
Figura 9. Distribuição de linfócitos T CD8 ⁺ e T CD4 ⁺ , células NK e NKT a partir do <i>gate</i> de células CD107a ⁺	65
Figura 10. Análise da frequência e expressão de CD107a de subpopulações de células NKT.....	68
Figura 11. Protocolo citofluorimétrico representativo.....	71
Figura 12. Comparação entre as células estimuladas com antígeno de <i>L. (V.) braziliensis</i> (<i>Lb-Ag</i>) e não estimuladas (<i>background – BG</i>)	72
Figura 13. Comparação da expressão de CD107a pelas células T CD4 ⁺ , NK e NKT CD3 ⁺ CD56 ⁺ estimuladas (<i>Lb-Ag</i>) e não estimuladas (<i>BG – background</i>)	74
Figura 14. Comparação entre as culturas estimuladas (<i>Lb-Ag</i>) e não estimuladas (<i>BG – background</i>) em relação à expressão de CD38.....	75
Figura 15. Comparação da expressão de CD279 entre as células estimuladas (<i>Lb-Ag</i>) e não estimuladas (<i>BG – background</i>)	78
Figura 16. Expressão total de CD107a, CD38 e CD279	79
Figura 17. Percentual de linfócitos T CD4 ⁺ CLA ⁺ nas culturas não estimuladas (<i>BG: background</i>) e estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> (<i>Lb-Ag</i>)	81
Figura 18. Percentual de linfócitos T CD8 ⁺ CLA ⁺ nas culturas não estimuladas (<i>BG: background</i>) e estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> (<i>Lb-Ag</i>)	82

Figura 19. Percentual de células NK CLA ⁺ nas culturas não estimuladas (BG: <i>background</i>) e estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> (<i>Lb-Ag</i>)	82
Figura 20. Percentual de células NKT CLA ⁺ nas culturas não estimuladas (BG: <i>background</i>) e estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> (<i>Lb-Ag</i>)	83
Figura 21. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em pacientes com leishmaniose cutânea ativa	85
Figura 22. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em pacientes sob a terapia antimonial	86
Figura 23. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em pacientes com cura clínica	87
Figura 24. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em indivíduos sadios.....	88
Figura 25. Avaliação da expressão de CD107a específica ao <i>Lb-Ag</i>	89
Figura 26. Comparação da concentração de IL-15 no sobrenadante das culturas de CMSP estimuladas com antígenos de <i>L. braziliensis</i> (<i>Lb-Ag</i>) e das culturas não estimuladas (BG: <i>background</i>)	91
Figura 27. Concentração de IL-15 no sobrenadante das culturas de CMSP.....	91
Figura 28. Concentração de IL-15 plasmática.....	92
Figura 29. Concentração de IL-15 no sobrenadante de macerado de amostras de biopsia de lesão	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Casos confirmados no Brasil por forma clínica segundo unidade federada de notificação no ano de 2015.	23
Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes de LC	48
Tabela 3: Combinação de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores para avaliar diferentes características celulares por citometria de fluxo nos ensaios experimentais <i>ex vivo</i>	52
Tabela 4: Combinação de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores para avaliar diferentes características celulares por citometria de fluxo nos ensaios experimentais <i>in vitro</i>	55
Tabela 5. Principais características clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos na segunda etapa do estudo.	70

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

7AAD – 7 aminoactinomicina D

AcMo – anticorpo monoclonal

AD – pacientes com a doença ativa, do inglês *active disease*

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

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

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

BT – pacientes antes do início da terapia antimonial, do inglês *Before Treatment*

CC – pacientes com cura clínica recente, do inglês *Clinically Cured*

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

CEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CLA – do inglês *Cutaneous Lymphocyte-associated Antigen* (receptor antígeno linfocitário cutâneo)

CMSP – Células Mononucleares de Sangue Periférico

DMSO – Dimetilsulfóxido

DN – duplo-negativas

DP – duplo-positivas

DT – pacientes durante o tratamento antimonial, do inglês *During Treatment*

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

Fas-L – receptor Fas ligante

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

FMO – do inglês *Fluorescence Minus One*

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

FT – pacientes com Falha Terapêutica

GIPLs – glico-inositol-fosfolipídeos

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

GPI – glicosil-fosfatidil-inositol

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

HI – indivíduos saudáveis, do inglês *Healthy Individuals*

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

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

IDRM – Intradermorreação de Montenegro

IFI – Imunofluorescência Indireta

IFN- γ – Interferon-gamma
IgG – Imunoglobulina G
IL – Interleucina
INI – Instituto Nacional de Infectologia
iNKT – células *Natural Killer T* invariáveis
IOC – Instituto Oswaldo Cruz
KIR – do inglês *Killer Immunoglobulin-like Receptors*
L. – *Leishmania*
LAMP – do inglês *Lysosomal-Associated Membrane Proteins* (proteínas de membrana associadas à lisossomos)
Lb-Ag – antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*
LC – Leishmaniose Cutânea
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
Ldiss – Leishmaniose Disseminada
LFA – do inglês *Lymphocyte Function-Associated Antigen* (antígeno associado à função leucocitária)
LIT – Meio de cultura *Liver Infusion Triptose*
LM – Leishmaniose Mucosa
LPG – Lipofosfoglicano
LRC – Leishmaniose Recidiva Cútis
LT – Leishmaniose Tegumentar
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
Lu. – *Lutzomyia*
LV – Leishmaniose Visceral
MHC – do inglês *Major Histocompatibility Complex* (complexo principal de histocompatibilidade)
MIP – do inglês *Macrophage Inflammatory Protein* (proteína inflamatória de macrófagos)
MS – Ministério da Saúde
n.d. – não determinado
NETs – do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*
NK – células *Natural Killer*
NKT – células *Natural Killer T*
NNN – Meio de cultura *Neal, Novy, Nicolle*
NO – do inglês *Nitric oxide* (óxido nítrico)
NR – doença não-relacionada
OMS – Organização Mundial da Saúde

OX40L – OX40 ligante

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

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

PD-1 – do inglês *Programmed Death-1* (receptor de morte programada-1)

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

PFA – Paraformaldeído

PHA – do inglês *Phytohemagglutinin* (fitohemaglutinina)

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

ROS – do inglês *Reactive Oxygen Species* (espécies reativas de oxigênio)

rpm – Rotações por Minuto

RPMI – do inglês *Roswell Park Memorial Institute medium*

Sb⁺⁵ – antimônio pentavalente

SFB – Soro Fetal Bovino

SSC – do inglês *Side Scatter* (parâmetro que avalia a granularidade celular)

SVS – Secretaria de Vigilância em Saúde

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

Tfh – células T foliculares

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

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

TIA-1 – do inglês *T-cell Intracytoplasmic Antigen* (antígeno intracitoplasmático de células T)

TLRs – do inglês *Toll-like Receptors* (receptores do tipo *Toll*)

TNF – do inglês *Tumor Necrosis Factor* (fator de necrose tumoral)

Treg – células T reguladoras

V. – *Viannia*

VigiLeish – Laboratório de Vigilância em Leishmanioses

vNKT – células *Natural Killer T* variantes

αGalCer - alfa-galactosilceramida

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania* que possuem uma grande variabilidade de espécies de vetores e reservatórios envolvidos em sua transmissão (1). Constituem um importante problema de saúde pública, com incidência crescente na última década e está relacionada à pobreza, mas fatores sociais, ambientais e climatológicos influenciam diretamente a epidemiologia da doença (2). As leishmanioses são classificadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como doenças tropicais negligenciadas e são classificadas em duas formas principais: Leishmaniose Tegumentar (LT) e Leishmaniose Visceral (LV), que variam em gravidade desde lesões da pele a desfigurações graves e infecção sistêmica fatal (3).

1.1. Aspectos epidemiológicos

As leishmanioses são endêmicas em mais de 90 países, os quais apresentam uma estimativa de 0,2 a 0,4 milhões de novos casos de LV e 0,7 a 1,2 milhões de casos de LT por ano (3). A LV registra altas taxas de morbidade e mortalidade, com epidemias recorrentes principalmente na África Oriental (Etiópia, Quênia, Sudão do Sul e Sudão). Da mesma forma, grandes epidemias de LT têm afetado diferentes partes do mundo, mas a maioria dos novos casos se concentra em apenas seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã e República Árabe Síria (3). É difícil a obtenção de números precisos sobre a incidência da doença. Acredita-se que a subnotificação seja resultante de diversos fatores, como a escassez de técnicas diagnósticas precisas e simplificadas, grande parte dos pacientes residir em locais de difícil acesso, a doença não ser de notificação compulsória em muitos países e também devido a muitos casos serem subclínicos (4,5).

Apesar de mais de dois terços dos casos de LT se concentrarem em apenas seis países, a distribuição da doença é ampla. Normalmente os surtos são detectados em cidades densamente povoadas, associados à migração de populações (6). A figura 1 ilustra o mapa de distribuição mundial da LT referente aos dados epidemiológicos do ano de 2015 (7). A LT é endêmica em quase todo o continente Americano, aonde é denominada Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), e se registram casos desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina, com exceção do Chile, Uruguai e El Salvador (9,10) (Figura 2). A epidemiologia da LTA é complexa devido a variações intra e interespecíficas nos ciclos de transmissão: diversidade de hospedeiros reservatórios e vetores, múltiplas espécies de *Leishmania* circulantes na mesma área geográfica, além de ampla variedade de manifestações clínicas e diferentes perfis de resposta à terapia (6).



Figura 1: Mapa da endemicidade mundial da Leishmaniose Tegumentar baseada em dados referentes ao ano de 2015. Adaptado de WHO, 2016 (7).

No Brasil, a LTA era inicialmente considerada uma zoonose de animais silvestres, devido à detecção de casos restrita às pessoas em contato com florestas. Entretanto, com os processos de migração e urbanização das últimas décadas, o padrão epidemiológico da doença se modificou (8). Três perfis epidemiológicos principais são observados no país: silvestre, no qual a transmissão está relacionada

apenas às áreas de matas e os animais silvestres são os reservatórios envolvidos; ocupacional ou de lazer, que é o perfil associado às atividades de comércio, desmatamento, urbanização e ecoturismo; e rural ou periurbano, onde são detectados animais domésticos participando do ciclo (8). A LTA representa um grande problema de saúde pública do Brasil e sua incidência gera reflexos no campo social e econômico, devido ao risco de ocorrência de deformidades físicas e psicológicas (8).

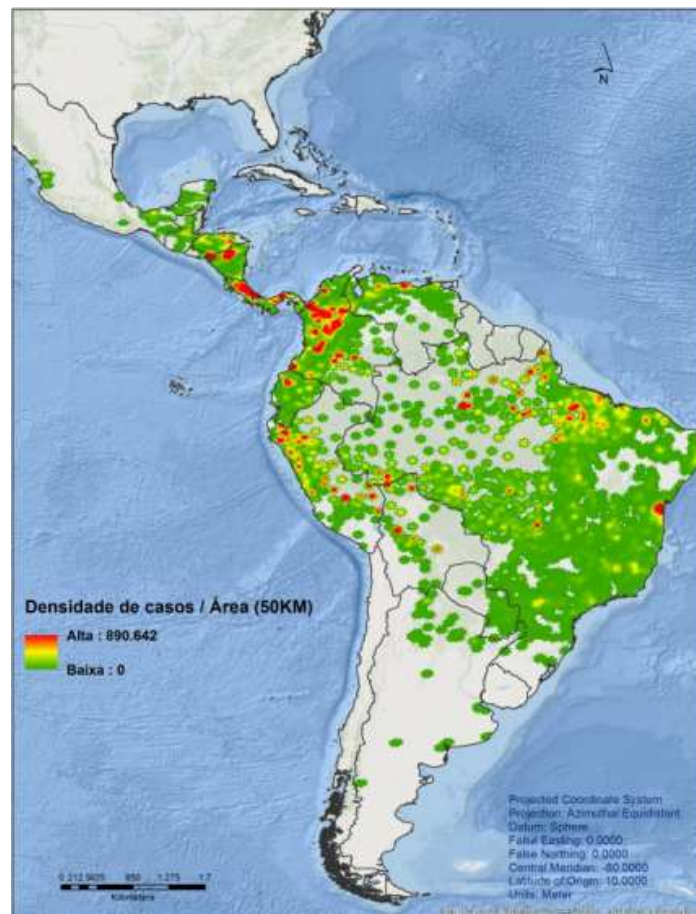


Figura 2: Densidade de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana em 2014. Adaptado de PAHO, 2016 (9).

Nos últimos anos, vêm sendo notificados casos de LTA em todos os estados brasileiros, com um registro de 20.161 casos em 2015 (11,12). As regiões Norte e Nordeste são as regiões mais endêmicas, com registro em 2015 de 9.664 (45,66%) e 5.671 (26,79%) casos, respectivamente (12). Apesar de números mais baixos de casos registrados na região Sudeste, o estado do Rio de Janeiro é considerado endêmico, apresentando uma incidência de 30 casos em 2015. A figura 3 ilustra o mapa de distribuição de casos de LT por estado no Brasil (13) e a tabela 1

discrimina o número de casos registrados em cada unidade federada referentes ao ano de 2015 (12).

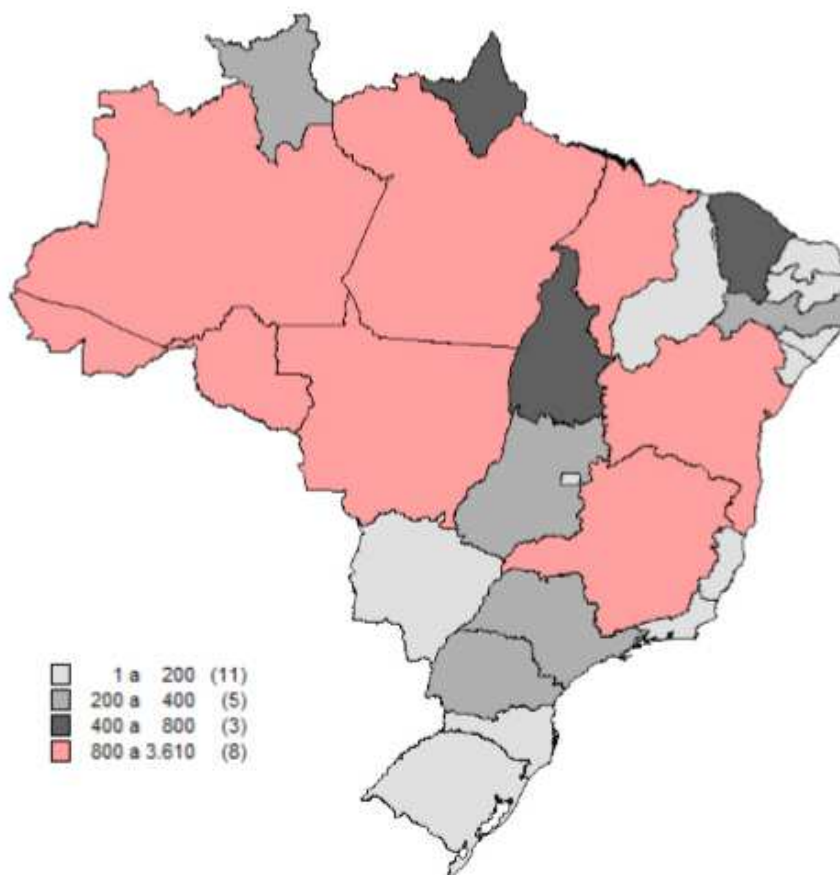


Figura 3: Distribuição dos casos de Leishmaniose Tegumentar por unidade federada do território brasileiro baseada em dados do ano de 2015. Adaptado de SVS/MS, 2016 (13).

Tabela 1. Casos confirmados no Brasil por forma clínica segundo unidade federada de notificação no ano de 2015.

UF de notificação	Ign/Branco	Cutânea	Mucosa	Total
TOTAL	4	19.847	1.310	21.161
11 Rondônia	-	1.007	132	1.139
12 Acre	-	1.001	180	1.181
13 Amazonas	-	1.670	53	1.723
14 Roraima	-	501	8	509
15 Pará	-	3.760	88	3.848
16 Amapá	-	599	16	615
17 Tocantins	-	608	45	653
21 Maranhão	-	1.736	65	1.801
22 Piauí	-	80	9	89
23 Ceará	-	578	31	609
24 Rio Grande do Norte	-	4	-	4
25 Paraíba	-	81	4	85
26 Pernambuco	-	437	5	442
27 Alagoas	-	195	6	201
28 Sergipe	-	6	1	7
29 Bahia	-	2.350	83	2.433
31 Minas Gerais	1	1.278	113	1.392
32 Espírito Santo	-	110	34	144
33 Rio de Janeiro	-	26	4	30
35 São Paulo	-	409	73	482
41 Paraná	-	471	60	531
42 Santa Catarina	-	11	3	14
43 Rio Grande do Sul	-	2	3	5
50 Mato Grosso do Sul	-	118	25	143
51 Mato Grosso	3	2.231	210	2.444
52 Goiás	-	527	46	573
53 Distrito Federal	-	51	13	64

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net

UF: unidade federada; Ign: ignorado.

Atualmente, 53 espécies de *Leishmania* são conhecidas e pelo menos 21 espécies são patogênicas ao ser humano (14). De acordo com a classificação taxonômica mais utilizada, as espécies de *Leishmania* são divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia* (15). Os agentes etiológicos da LTA pertencem aos dois subgêneros, em contraste com a leishmaniose cutânea do Velho Mundo, onde apenas o subgênero *Leishmania* está representado (14). Nas regiões do país em que a LTA é endêmica, a espécie mais envolvida é a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que está presente tanto em áreas de colonização antigas quanto recentes (8,16,17). Pelo menos sete espécies patogênicas ao homem já foram

identificadas no país, sendo seis do subgênero *Viannia* [*L. (V.) braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) lainsoni*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenberg*; e *L. (V.) shawi*] e uma do subgênero *Leishmania* [*L. (L.) amazonensis*] (8). Com exceção das espécies *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, que apresentam ampla distribuição no território nacional, as outras espécies são encontradas em regiões características. No estado do Rio de Janeiro são descritos casos desde o início do século XX (18) e são associados a um perfil rural e periurbano de transmissão, causados pela espécie *L. (V.) braziliensis* (19,20). São encontrados focos da doença principalmente em regiões dos municípios do Rio de Janeiro, Paraty, Mesquita, Ilha Grande e Paracambi (8,21–23).

1.2. Ciclo de vida do protozoário

A *Leishmania* é um protozoário parasito unicelular pertencente ao gênero *Leishmania* (Trypanosomatida: Trypanosomatidae) (24). Sua morfologia varia de acordo com a fase do ciclo biológico e se apresenta sob duas formas evolutivas principais: amastigota, encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados; e promastigota, observada no tubo digestivo do inseto vetor (8). A divisão nos subgêneros *Viannia* ou *Leishmania* foi definida de acordo com a localização em que se desenvolvem no intestino do hospedeiro invertebrado (15). As espécies do subgênero *Viannia* colonizam a região posterior do estômago do flebotomíneos, enquanto as espécies do subgênero *Leishmania* colonizam a porção anterior (15).

Os hospedeiros invertebrados, ou vetores, são as fêmeas hematófagas de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae), que podem ser do gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo, ou do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo (25). São mais de 500 espécies de flebotomíneos identificadas e, destas, cerca de 40 espécies participam do ciclo da *Leishmania* como vetores, indicando que as espécies de *Leishmania* parecem ter preferência por espécies particulares de vetores (22,26). A *L. (V.) braziliensis* é transmitida por diferentes espécies de flebotomíneos, principalmente *Lutzomyia intermedia*, *Lu. whitmani* e *Lu. wellcomei*, e seus grandes reservatórios potenciais são os animais domésticos (27–29). Os hospedeiros vertebrados incluem o homem; animais domésticos, como cães, gatos e equinos; e animais silvestres, como marsupiais, roedores, preguiças, tamanduás (15,30,31).

O ciclo tem início quando fêmeas de flebotomíneos transmitem a forma infectante de *Leishmania* (promastigota metacíclica) ao hospedeiro vertebrado durante o repasto sanguíneo. As promastigotas, que são formas alongadas e com flagelo livre, são então fagocitadas por macrófagos e células dendríticas. No interior destas células, as promastigotas se localizam em vacúolos parasitóforos, onde se diferenciam em amastigotas (formas ovoides e com flagelo interiorizado). As amastigotas se multiplicam por divisão binária, levando à lise celular, quando são então liberadas, permitindo a infecção de outras células. Quando um flebótomo realiza o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, ingere, juntamente com o sangue, macrófagos infectados com as formas amastigotas. Estas amastigotas se diferenciam em promastigotas no intestino do hospedeiro invertebrado, se multiplicam por divisão binária e passam por um processo de metaciclogênese, onde deixam de se reproduzir e tornam-se infectantes. Nesta forma evolutiva, a *Leishmania* perde a capacidade de adesão ao epitélio do intestino e realiza migração para a probóscida do inseto, onde permanece apta a infectar um novo hospedeiro vertebrado, reiniciando seu ciclo (32,33) (Figura 4). A infecção também pode ser transmitida através do compartilhamento de agulhas, transfusão de sangue com produtos sanguíneos infectados e até via transplacentária, embora estes tipos de transmissão sejam raros (34,35).

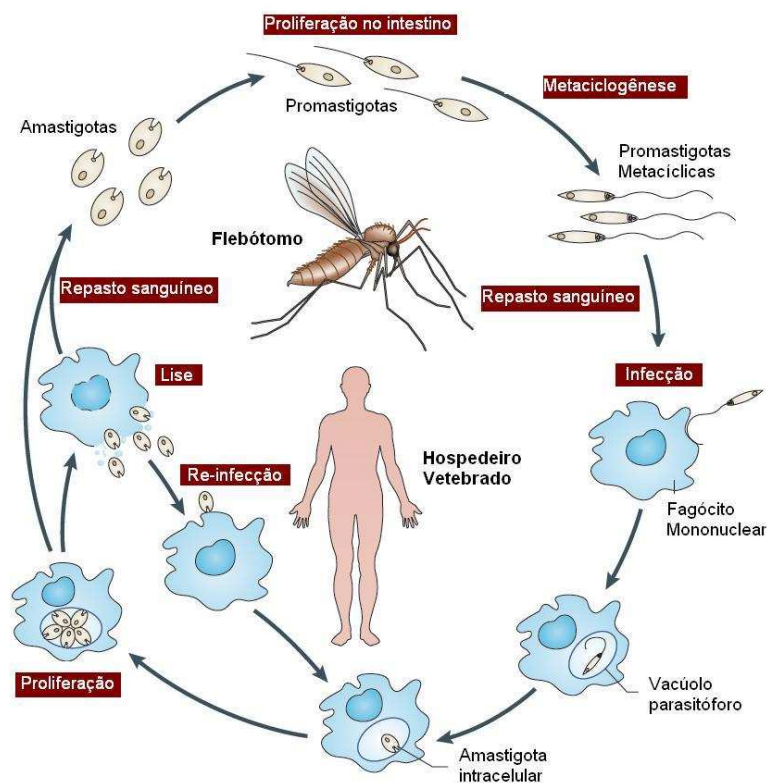


Figura 4: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.. Adaptado de Kaye & Scott, 2011 (36).

1.3. Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana

A LTA apresenta uma variedade de manifestações clínicas, alterações histopatológicas e imunológicas que caracterizam as diferentes formas desta doença: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose recidiva cútis (LRC), leishmaniose disseminada (Ldiss), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucosa (LM) (8,37). O amplo espectro de formas e de gravidade da doença são reflexos da contribuição de diferentes fatores de virulência do parasito e respostas do hospedeiro, alguns dos quais atuam de maneira a proteger o hospedeiro, enquanto outros exacerbam a doença (10). Apesar de algumas manifestações clínicas serem mais frequentemente associadas a uma determinada espécie ou subgênero, nenhuma é única para uma espécie (38). Felizmente, uma parte substancial das infecções é assintomática (forma subclínica) e a cura espontânea é comum. Em contrapartida, uma resposta imunológica inadequada resulta em uma replicação descontrolada do parasito e a subseqüentes formas não curativas (5).

1.3.1. Leishmaniose Cutânea Inaparente ou Subclínica

Em áreas endêmicas de leishmaniose são observados indivíduos infectados por *Leishmania* que não apresentam manifestações clínicas aparentes, sendo capazes de controlar a infecção, dispensando assim o tratamento medicamentoso (39,40). Em áreas endêmicas de *L. (V.) braziliensis*, aproximadamente 10% dos indivíduos possuem teste intradérmico positivo, mas nenhuma história prévia de leishmaniose ou lesões típicas, caracterizando a forma subclínica da leishmaniose (39). Os indivíduos com esta forma da doença geralmente apresentam positividade também nos testes sorológicos (39).

1.3.2. Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

A LCL, comumente denominada apenas leishmaniose cutânea (LC), é a forma mais prevalente e pode ser causada por todas as espécies dermatrópicas de *Leishmania*. É caracterizada por lesões únicas ou escassas (no máximo 10 lesões) ulceradas na pele, com bordas bem delimitadas, margens em relevo e fundo granuloso (19,41,42). As úlceras são tipicamente indolores, exceto quando há

infecção bacteriana ou fúngica secundária. A linfadenopatia regional é frequente e geralmente associada à apresentação inicial, mas pode persistir mesmo após as lesões cutâneas terem cicatrizado (42). A doença geralmente evolui de forma crônica e a lesão cicatriza após a terapia, podendo cicatrizar de forma espontânea em alguns casos (10,43). Em casuística no estado do Rio de Janeiro, durante um período de um ano, 8% dos pacientes evoluíram para a cura espontânea (44).

As lesões cicatrizadas são em geral lisas, finas e hipopigmentadas e a ocorrência de traumatismo na cicatriz pode conduzir a um ressurgimento da lesão leishmaniótica, levando à reativação da infecção, provavelmente devido à persistência do parasito após o tratamento clínico (42,45,46). Nesta forma da doença, geralmente a intradermoreação de Montenegro (IDRM) e os testes sorológicos são positivos (8). A infecção primária pode ainda evoluir para a forma mucosa, mesmo após a cura clínica (47).

1.3.3. Leishmaniose Recidiva Cútis (LRC)

A LRC é um quadro de recidiva da LCL, que é raro e apresenta características clínicas e evolução específicas (48). É mais prevalente no Velho Mundo, onde está associada com a infecção por *L. (L.) tropica*, mas também é observada no Novo Mundo, associada com infecção por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* no Brasil; e *L. (V.) panamensis* no Equador (48–50). Após um período variável de tempo, a cicatriz clinicamente curada de LCL apresenta complicações pelo desenvolvimento periférico de placas infiltradas e crostosas, mimetizando clinicamente e histologicamente a infecção por *lupus vulgaris* (51,52). É considerada uma forma hiperérgica de leishmaniose cutânea devido aos pacientes apresentarem forte resposta na IDRM e uma reação granulomatosa bem organizada histologicamente, com parasitos escassos ou ausentes (53). A persistência do parasito por muito tempo, mesmo após a cura clínica, é uma explicação plausível para os casos de recorrência de LRC (45,46,54).

1.3.4. Leishmaniose Disseminada (Ldiss)

A forma disseminada é uma rara manifestação da LT que acomete cerca de 2% dos casos e é clinicamente caracterizada pela presença de múltiplas lesões pleomórficas (mais de dez lesões) em duas ou mais áreas não contíguas do corpo,

que são provavelmente causadas por disseminação linfática ou hematogênica (55,56). As lesões podem ser acneiformes, nodulares, papulares, verrucosas e ulceradas, podendo sofrer necrose central e formar crosta (55,57). Sintomas constitucionais como febre, astenia e mal-estar estão presentes em alguns pacientes no início da disseminação das lesões e em quase 29% dos casos é observado acometimento da mucosa (55,58). Os pacientes geralmente apresentam resposta positiva na IDRM e aos testes de proliferação linfocitária (37), entretanto há relatos de pacientes com Ldiss causada por *L. (L.) amazonensis* que apresentaram resposta negativa a estes testes (55). No Brasil, a incidência desta forma é de 2,4%, sendo atribuída principalmente à infecção por *L. (V.) braziliensis*, embora já tenha sido observada associação com *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (21,55,58–60).

1.3.5. Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD)

A LCD é uma manifestação clínica grave e rara da LC. É caracterizada pela presença de múltiplas lesões nodulares não-ulcerativas, ricas em formas amastigotas, difundidas por quase todo o corpo (61). Imunologicamente parece haver uma falha na resposta imune celular aos antígenos de *Leishmania*, levando ao crescimento descontrolado do parasito (62). Deste modo, os pacientes anérgicos apresentam uma evolução crônica, IDRM negativa devido à fraca resposta celular e má resposta ao tratamento (55,63). Lesões ósseas como osteopenia, lesões osteolíticas ou osteomielite podem ocorrer (64). Esta forma da doença é associada com a infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) mexicana* no Novo Mundo e *L. (L.) aethiopica* no Velho Mundo (38).

1.3.6. Leishmaniose Mucosa (LM)

A LM pode apresentar acometimento unicamente mucoso, surgindo geralmente meses ou anos após uma lesão cutânea inicial, ou ocorrer simultaneamente com a LC, sendo usualmente denominada leishmaniose mucocutânea (8). É uma forma agressiva da doença, com curso crônico, caracterizada por múltiplas ou extensas lesões destrutivas na cavidade oral ou nasofaríngea, podendo ainda afetar laringe e traqueia, causando severa deformação facial e distúrbios respiratórios (65,66). Tal patogênese tem sido associada a uma

hiperatividade da resposta imune celular mediada por linfócitos T, com uma forte e progressiva resposta inflamatória, que resultam em dano tecidual (67). Os pacientes apresentam uma intensa resposta na IDR, denotando uma hipersensibilidade aos antígenos de *Leishmania* (37). Os pacientes de LM não curam espontaneamente, apresentam comumente co-infecções bacterianas e maiores índices de falha terapêutica e recidiva são detectados (68). A *L. (V.) braziliensis* é a principal espécie responsável pela LM no Novo Mundo, embora casos por *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis* e *L. (V.) guyanensis* também sejam descritos (65,69–72).

1.4. Diagnóstico e tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana

A complexidade das leishmanioses impõe que o diagnóstico seja baseado em critérios que considerem dados epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Os dados epidemiológicos são importantes no auxílio ao diagnóstico tanto de indivíduos que residem em áreas endêmicas, como de viajantes que não residem nestas áreas (73–75). O diagnóstico clínico é realizado a partir das características clínicas (lesões leishmanióticas típicas e localização destas) apresentadas pelos pacientes. Entretanto, a confirmação do diagnóstico por métodos laboratoriais é essencial e de extrema importância, tendo em vista as muitas doenças que fazem diagnóstico diferencial com a LTA, como paracoccidiodomicose, carcinoma epidermóide, carcinoma basocelular, linfomas, rinofima, rinosporidiose, entomoforomicose, hanseníase, sífilis terciária, perfuração septal, rinite alérgica, sinusite, sarcoidose, granulomatose de Wegner e outras doenças mais raras (8,41,76).

O “padrão-ouro” de diagnóstico laboratorial para LTA ainda são os exames parasitológicos diretos e indiretos para demonstração do parasito (8). Os exames diretos constituem em escarificação e biópsia de lesão. Entretanto, a possibilidade de encontro do parasito é diminuída com o tempo de evolução, ficando a sensibilidade destes testes entre 15 e 30% apenas, principalmente devido aos frequentes casos crônicos e de LM (8,77,78). Os exames indiretos constituem em isolamento do parasito em cultivo *in vitro*, onde fragmentos obtidos por biópsia da lesão são cultivados em meios apropriados (geralmente NNN ou LIT), e *in vivo*, onde o fragmento é triturado em solução salina estéril e inoculado por via intradérmica em hamster (*Mesocricetus auratus*). Entretanto, apesar de uma maior sensibilidade, este último é pouco utilizado devido à sua dificuldade de manuseio e manutenção (8).

Testes imunológicos (IDRM e testes sorológicos) também são comumente realizados. A IDRM é realizada rotineiramente e fundamenta-se na visualização da resposta de hipersensibilidade celular tardia. Neste, uma preparação de antígenos de *Leishmania* (a espécie utilizada varia em diferentes laboratórios e localidades) é inoculada no antebraço do indivíduo com suspeita de leishmaniose e, após 48-72h, a reação é avaliada e considerada positiva quando a área de endurecimento for igual ou maior do que 5 mm (8,79). Porém, este teste não diferencia se a infecção é atual ou antiga, podendo se manter positivo mais de dois anos após cura clínica. A IDRM pode também ser positiva em indivíduos moradores de áreas endêmicas, além de apresentar diferenças de positividade entre as diferentes formas clínicas, como discutido anteriormente (39,80–82). Os testes sorológicos detectam anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes e são realizados pelas técnicas de imunofluorescência indireta (IFI) ou ensaio imunoenzimático (ELISA) (8). A sensibilidade destes testes também varia de acordo com a forma clínica (83,84) e com a espécie de *Leishmania* responsável pela infecção (85,86).

Desta forma, devido à variabilidade de sensibilidade e falta de métodos devidamente padronizados, indivíduos com diagnóstico clínico sugestivo de LTA e com IDRM positiva são normalmente submetidos ao tratamento medicamentoso, mesmo sem a confirmação parasitológica (8). Assim, existe a necessidade do emprego de métodos diagnósticos mais eficazes. Os métodos moleculares vêm surgindo para este fim por serem altamente específicos, sensíveis e rápidos; porém sua alta complexidade e custo elevado impedem sua utilização rotineira (79). Atualmente, são vários os alvos e métodos moleculares em estudo para a detecção de *Leishmania* e distinção das diferentes espécies. Entretanto, ainda é necessária a padronização dos protocolos e alvos moleculares, a fim de se obter resultados comparáveis e confiáveis (24).

Mesmo com a grande prevalência das leishmanioses e com os conhecimentos atuais sobre a relação entre o parasito e o hospedeiro, poucos avanços foram obtidos no tratamento da doença. Inicialmente foi empregado o antimônio trivalente para o tratamento das leishmanioses, que foi introduzido no Brasil em 1912 por Gaspar Vianna. Somente entre a década de 1935 e 1945 foram realizados os primeiros estudos clínicos com estes fármacos (87,88). Atualmente, a droga de primeira escolha é o antimônio pentavalente (Sb^{+5}), administrado por via intramuscular ou intravenosa. Dois tipos de antimônios pentavalentes podem ser

utilizados: o antimoniato de N-metilglucamina e o estibogluconato de sódio. No Brasil é utilizado somente o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime® Rhodia), que vem sendo produzido no país desde 2007 pela Sanofi-Aventis, e distribuído para a rede pública de saúde pela Secretaria de Vigilância em Saúde do Ministério da Saúde (SVS/MS) (8). A dose recomendada pelo MS varia de 10 a 20 mg Sb⁵⁺/kg/dia por um período mínimo de 20 dias (8,89,90). Entretanto, estudos têm sido realizados na tentativa de diminuir a dose administrada devido à alta toxicidade do medicamento. No Rio de Janeiro, a equipe do Laboratório de Vigilância em Leishmanioses (VigiLeish), do Instituto Nacional de Infectologia (INI/FIOCRUZ), tem demonstrado eficácia satisfatória na utilização de esquema de tratamento com baixa dose de antimônio pentavalente (5 mg Sb⁵⁺/kg/dia) por um período mais prolongado (30 dias) (91–96).

Os principais efeitos colaterais estão associados à toxicidade hepática e renal, e diversos sintomas são frequentes, como mialgias e artralgias, distúrbios gastrointestinais, dores de cabeça, anorexia, fadiga, febre, reações cutâneas, alterações comportamentais e alterações cardiovasculares e respiratórias (97). Embora os antimoniais pentavalentes sejam utilizados há décadas, seu mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido. Faltam elucidar detalhes da ação leishmanicida dessas drogas após sua conversão *in vivo* (95). Existe, ainda, o problema de resistência a estes fármacos, que é cada vez mais crescente, tendo sua administração já limitada em algumas áreas devido à falta de eficácia (98). Nos casos de resistência ou impedimento do emprego de antimoniais, outras classes de medicamentos são aplicadas no tratamento de segunda escolha, como anfotericina B, pentamidinas e miltefosina (8,97,99). Em outros países, são utilizadas ainda outras drogas, como paromomicina, sitamaquina e azóis (100).

O tratamento com antimonial pentavalente é eficaz na maioria dos casos e as lesões geralmente evoluem para a cura clínica com formação de cicatriz atrófica. Entretanto, a eficácia varia de acordo com a forma clínica da leishmaniose e a espécie do parasito (101,102). No estado do Rio de Janeiro, onde o agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis*, o tempo decorrido entre o início da terapia antimonial e a cura clínica da LC leva em torno de cem dias em média e há relato de taxas de cura de 75% a 95% (95,103). A cura clínica é considerada com a cicatrização das lesões, que é caracterizada pela total reconstituição do epitélio lesionado e ausência de hiperemia ou edema (104). É determinado, entretanto, que

esta cura pode ocorrer somente sob o ponto de vista clínico, pois a persistência parasitária já foi observada mesmo anos após a cicatrização da lesão (45,46,77,105).

Muitos são os esforços para desenvolver uma vacina eficaz contra as leishmanioses, entretanto até o momento esse objetivo não foi alcançado. Fatores como as características genéticas do hospedeiro e do parasito, virulência, cenários epidemiológicos e, principalmente, diferentes perfis de resposta imune desencadeados pelas espécies de *Leishmania* tornam a realização desse objetivo uma tarefa complexa (106). Além disso, a maior parte do conhecimento envolvendo o desenvolvimento de vacinas para LC provém do modelo de infecção por *L. (L.) major*, que não pode ser totalmente aplicado à leishmaniose do Novo Mundo (106). O fato de ainda não existir um tratamento satisfatório e uma vacina eficaz contra a leishmaniose leva à conclusão de que ainda é necessário uma melhor compreensão da resposta imune na patogênese da infecção e dos mecanismos relacionados à cura e proteção.

1.5. Imunopatogenia da Leishmaniose Tegumentar Americana

O espectro de manifestações clínicas observado na leishmaniose é determinado em grande parte pelo tipo e magnitude da resposta imune do hospedeiro (107). A resposta desencadeada na LTA se caracteriza por uma reação de hipersensibilidade tardia, que se inicia com o reconhecimento do patógeno, gerando inicialmente uma resposta imune inata e indução da produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (108,109). Assim, após a infecção por *Leishmania*, a ação coordenada de células da imunidade inata e adaptativa é determinante para o desenvolvimento de uma resposta imune protetora.

Quando as promastigotas são injetadas na pele do hospedeiro através do repasto sanguíneo dos flebotomíneos, vários tipos de células fagocíticas são recrutados para o local e iniciam sua atividade de fagocitose de promastigotas. Durante a infecção natural, fatores adicionais presentes na saliva do flebotomíneo são juntamente introduzidos na pele do hospedeiro e podem influenciar respostas imunes precoces (110). Dentro do fagolisossomo das células fagocíticas, as promastigotas se transformam então em formas amastigotas. Embora os macrófagos sejam a principal célula hospedeira para a *Leishmania*, monócitos, células dendríticas e neutrófilos recrutados para o local da infecção podem tornar-se

infectados e desempenhar papéis importantes e distintos na formação da resposta imune à infecção (107). Análises histopatológicas da lesão primária em modelo murino evidenciaram alta frequência de eosinófilos e mastócitos nas fases iniciais da infecção (111). Os diferentes tipos celulares da resposta imune inata interagem com moléculas do parasito (denominadas “PAMPs” – padrões moleculares associados a patógenos) através dos receptores do tipo *Toll* (TLRs). Estas interações são importantes no direcionamento da resposta imune na infecção por *Leishmania* por fornecerem estímulos necessários para ativação da transcrição de genes nas células do sistema imune inato, que são responsáveis pela produção de citocinas pró-inflamatórias e moléculas co-estimulatórias (112).

Os neutrófilos são rapidamente recrutados para o local da inoculação e possuem papel importante nos momentos iniciais da infecção. Eles atuam na tentativa de impedir a sobrevivência dos parasitos, através de mecanismos oxidantes e dependentes de proteases; e ao interagir com monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos T e B, direcionando as respostas inflamatórias envolvidas na defesa do hospedeiro e na reparação tecidual (113). Alguns estudos mostram a contribuição de NETs (*neutrophil extracellular traps*) na indução de morte da *Leishmania*, mas ainda não é bem determinado se as NETs possuem papel protetor *in vivo* (114,115). Neutrófilos necróticos podem ser fagocitados por macrófagos, induzindo a ativação destes através da produção de mediadores pró-inflamatórios. Entretanto, a cooperação entre macrófagos e neutrófilos pode contribuir para a susceptibilidade após infecção por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major*, limitando a ativação das células fagocíticas, o que leva a uma melhor sobrevivência do parasito (116–118). Os neutrófilos também influenciam na diminuição da ativação de células dendríticas, reduzindo a resposta do tipo Th1 e inibindo a apresentação cruzada para a ativação dos linfócitos T CD8⁺ (119,120).

Embora as formas amastigotas possam ser rapidamente encontradas no interior de neutrófilos após a infecção, no interior de fagócitos mononucleares a *Leishmania* encontra um ambiente mais adequado para sua replicação e sobrevivência a longo prazo. Monócitos inflamatórios e células dendríticas recrutados ao local de inoculação apresentam amastigotas em seu interior poucas horas após a infecção e, ao longo dos primeiros dias, passam a ser as populações predominantemente infectadas com os parasitos de *Leishmania* (119,121,122). A consequência da infecção de monócitos é distinta da infecção de macrófagos. Os

monócitos exibem um intenso *burst* respiratório imediatamente após a infecção, levando a um controle parasitário inicial, enquanto os macrófagos necessitam de ativação por IFN- γ para destruir os parasitos (122). Os macrófagos são as células mais importantes do sistema imune inato na infecção por *Leishmania*, por desempenharem um papel triplo: como células hospedeiras, como células apresentadoras de antígenos (APCs) e como células efetoras (123). Os macrófagos ativados classicamente secretam IL-2 e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS), geradas no *burst* respiratório durante a fagocitose, e óxido nítrico (NO), resultante da ativação via IFN- γ , as quais são capazes de eliminar os parasitos de forma eficaz (107). Os parasitos do gênero *Leishmania* são sensíveis às ROS, mas o *burst* respiratório que ocorre em macrófagos não-ativados é insuficiente para matar os parasitos. A ativação via IFN- γ é capaz de aumentar o *burst* respiratório nos macrófagos, levando à destruição mais eficaz do parasito (124). As citocinas IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) atuam sinergicamente promovendo a ativação ótima de macrófagos, que induz a produção de NO e consequente eliminação da *Leishmania* (125). Em condições alternativas ou desfavoráveis, porém, os macrófagos ativados preferencialmente ativam a via da arginase para produzir poliaminas, mecanismo este que favorece a replicação do parasito (126–128). Macrófagos infectados atuam ainda como APCs e apresentam o antígeno processado ao receptor de células T (TCR) dos linfócitos Th0 CD4⁺ através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II. O TCR reconhece o complexo peptídeo-MHC II e, simultaneamente, moléculas co-estimulatórias, como B7-1/B7-2, ICAM-1 e LFA-3 no macrófago são reconhecidas por seus receptores (CD28, LFA-1 e CD2, respectivamente) na superfície dos linfócitos, promovendo então a ativação destes (36,41,129). A presença de citocinas é fundamental para os processos de ativação e controle da disseminação parasitária e estas são inicialmente produzidas por células do sistema imune inato. No entanto, após esta resposta inicial inespecífica, uma resposta imune adquirida, específica aos antígenos de *Leishmania*, determina o curso da infecção.

O desenvolvimento da lesão e a evolução da doença são determinados pela natureza e magnitude da resposta imune mediada por linfócitos T. A atividade efetora mútua e a cooperação entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ parecem definir o curso da doença, responsável pela imunopatogenia da LTA (130). Após serem ativados, os linfócitos T CD4⁺ passam a ser responsáveis por orquestrar e direcionar a resposta imune adaptativa. Em modelo murino de infecção por *L. (L.) major* foi

evidenciado que uma resposta do tipo 1, com produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-2 e IFN- γ , está associada a um bom prognóstico e evolução para a cura; enquanto uma resposta do tipo 2, com produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4 e IL-5, é relacionada a uma anergia celular e progressão da doença (131). Entretanto, esta resposta de linfócitos T CD4⁺ polarizada não é evidente na leishmaniose humana e a importância da IL-4 como mediador primário de susceptibilidade à infecção não é corroborada nos ensaios clínicos (132). Na infecção humana por *L. (V.) braziliensis* é sugerido que elevados percentuais de linfócitos T CD4⁺ ativados produtores de IFN- γ são associados com maiores lesões e que uma resposta Th1 exacerbada é relacionada ao polo hiperérgico da doença, sendo observada em pacientes de LM (132,133).

Neste contexto, é bem determinado que os linfócitos T CD4⁺ são essenciais para o controle da *Leishmania* e seus perfis de citocinas vêm sendo bastante estudados. Estes linfócitos são divididos em subpopulações com base no perfil de citocinas produzidas e fatores de transcrição envolvidos, induzindo assim respostas específicas: Th1 secretam principalmente IFN- γ e são importantes contra infecções causadas por patógenos intracelulares; Th2 secretam principalmente IL-4 e IL-5 e fornecem proteção contra patógenos extracelulares; Th17 secretam principalmente IL-17 e são importantes em infecções fúngicas, na regulação da inflamação durante infecções e na autoimunidade; T reguladoras (Treg) secretam IL-10 e TGF- β e atuam na tolerância periférica e na regulação de respostas após infecções; e T foliculares (Tfh) secretam principalmente IL-21 e são especializadas em interagir com as células B (134–137). Ainda, em adição a estas funções auxiliares, os linfócitos T CD4⁺ são capazes de exercer um papel citotóxico, com a habilidade de lisar diretamente células infectadas ou alteradas (138). Entretanto, o papel da citotoxicidade na leishmaniose ainda não foi elucidado e tem sido frequentemente associado ao dano tecidual (130,139–144).

A função citotóxica dos linfócitos T CD4⁺ vem sendo observada há muitos anos, tanto em humanos quanto em camundongos, mas tais relatos eram isolados e geralmente associados a longos períodos de cultura, sendo então considerados por alguns autores como artefatos (145–150). Atualmente, são reconhecidos como uma subpopulação especializada de linfócitos T CD4⁺, possível de ser identificada por algumas proteínas marcadoras específicas ou fatores de transcrição (151). Linfócitos T CD4⁺ citotóxicos são detectados e estudados principalmente em infecções virais

(152), mas também têm sido descritos em respostas antitumorais e inflamatórias, como doenças autoimunes e infecções parasitárias, associados tanto à infecções agudas como crônicas (153–157). Entretanto, pouco ainda é conhecido sobre o papel dos linfócitos T CD4⁺ citotóxicos nas infecções não-virais e os fatores que levam à geração desta população.

Um marcador específico para os linfócitos T CD4⁺ citotóxicos ainda não foi determinado, mas alguns marcadores relacionados à função citotóxica podem ser empregados (158). Os linfócitos T CD4⁺, assim como outras células citotóxicas clássicas (como os linfócitos T CD8⁺ e células NK) exercem sua função citotóxica efetora principalmente através da via de exocitose de grânulos líticos (159–161). Por esta via, após a ativação das células citotóxicas, se inicia uma cascata de sinalização intracelular que rapidamente direciona os grânulos secretórios dispersos no citoplasma para o sítio da sinapse imunológica formada com a célula-alvo e liberam seu conteúdo tóxico (162,163). Estes grânulos secretórios possuem um denso núcleo onde são armazenadas proteínas que, cooperativamente, causam a morte da célula-alvo. Destas, as principais são perforinas e granzimas, mas também estão presentes granzima e catepsinas (164,165). Na superfície dos grânulos líticos são expressas proteínas de membrana associadas à lisossomos (LAMPs – *lysosomal-associated membrane proteins*), incluindo CD107a (LAMP-1), CD107b (LAMP-2) e CD63 (LAMP-3). Essas moléculas são encontradas na membrana interna dos grânulos e são expostas na superfície das células citotóxicas durante o processo de degranulação, que é um pré-requisito para a lise das células-alvo mediada por grânulos (166,167). Estas moléculas têm sido empregadas como marcadores de degranulação (167,168) e podem, desta forma, serem utilizadas para a identificar os linfócitos T CD4⁺ citotóxicos (158). Outros receptores característicos de células citotóxicas clássicas, como NKG2A e NKG2D, também são expressos pelos linfócitos T CD4⁺ citotóxicos, indicando similaridade de características e funções (169–171). Podem ainda produzir citocinas com perfil Th1, como IFN- γ , principalmente, TNF e IL-2 (172–174). Entretanto, apesar de compartilharem esta característica com os linfócitos Th1, uma condição polarizada por citocinas com este perfil não é ideal para a geração de T CD4⁺ citotóxicos, sendo melhores induzidos na presença de IL-2, IL-12 e IL-15 (151,175) .

Os linfócitos T CD8⁺ desempenham dois papéis principais na resposta imune adaptativa: como células citotóxicas e produtoras de citocinas. Através de seu TCR,

os linfócitos T CD8⁺ reconhecem os peptídeos que são apresentados no contexto MHC classe I. Geralmente, estes peptídeos são de origem endógena, entretanto também pode ocorrer via TCR a apresentação de peptídeos exógenos por um mecanismo de “apresentação cruzada”, como observado com antígenos de *Leishmania* (176). Ainda não é completamente compreendido como os linfócitos T CD8⁺ são ativados na leishmaniose, mas é bem estabelecido que eles respondem especificamente durante a infecção por *Leishmania*. Entretanto, se as funções que estas células adquirem após sua ativação são relacionadas a um papel protetor, patológico ou irrelevante na infecção tem sido discutido (177).

Já está claro que, após a ativação, os linfócitos T CD8⁺ se diferenciam em células efectoras e adquirem capacidade citotóxica e de produção de citocinas, principalmente IFN- γ , TNF- α e IL-2, mas também IL-4, IL-5, IL-10, IL-17 e TGF- β (129,178,179). Seu papel protetor tem sido associado principalmente à sua capacidade de produzir níveis elevados de IFN- γ (180–185). Foi sugerido que, em adição à produção de IFN- γ , a produção de perforina por linfócitos T CD8⁺ também é crucial para a imunidade induzida por vacina contra *L. (L.) amazonensis* (186). Alguns estudos sugeriram um papel protetor e benéfico dos linfócitos T CD8⁺ também na infecção por *L. (V.) braziliensis* (40,187–190). Entretanto, estudos mais recentes vêm relacionando a função citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ ao dano tecidual e exacerbação da doença, principalmente nas infecções por *L. (V.) braziliensis*. A caracterização genômica de lesões de pacientes de LC confirmou que a citotoxicidade é a principal característica de lesões de *L. braziliensis* (142). A expressão de genes associados à função citotóxica e dos genes envolvidos na função de barreira cutânea foram negativamente correlacionadas, sugerindo que a citotoxicidade e a perda de integridade da pele ocorrem concomitante na LC (142). A presença de linfócitos T CD8⁺ e células NK com forte expressão de TIA-1 (uma molécula associada com citotoxicidade) foi observada em lesões de pacientes de LC, sugerindo a participação destas células na patogenia da doença, podendo ser tanto na tentativa de eliminar o parasito, quanto estar contribuindo para o desenvolvimento da lesão (140). Linfócitos T CD8⁺ de pacientes de LC em estágio tardio apresentam maior expressão de granzima A que pacientes em estágio inicial. Esta expressão foi positivamente correlacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório nos pacientes em estágio tardio, mas não nos pacientes em estágio inicial, sugerindo que há um recrutamento de linfócitos T CD8⁺ com perfil citotóxico para a lesão, que foi associado com a progressão da infecção (Faria *et al*, 2009).

Linfócitos T CD8⁺ em degranulação foram observados em lesões cutâneas, o que foi associado com promoção de dano tecidual (142,143). A associação da ação citotóxica com o dano tecidual também foi observada em pacientes de LM (139,191,192). Neste contexto, os linfócitos T CD8⁺ parecem desempenhar papéis distintos em diferentes fases da leishmaniose e nas diferentes formas clínicas, sendo necessários mais estudos no intuito de desvendar os fatores que determinam quando esta resposta é protetora e quando contribui para a manutenção da infecção (177).

É conhecido que células NK representam uma das primeiras linhas de defesa contra a *Leishmania* e que sofrem uma ativação rápida e transiente nos momentos iniciais da infecção (193,194). Entretanto, o papel desempenhado por estas células ao longo da infecção não é bem definido (195). As células NK são uma população de linfócitos granulares componentes da resposta imune inata, mas que interagem com a resposta imune adaptativa, e estão envolvidas na resposta imune em vários tipos de tumores e infecções por patógenos, com capacidade de limitar sua propagação e o dano tecidual subsequente (196,197). Fenotipicamente, podem ser definidas por sua expressão de CD56 e CD16 e ausência de CD3 (198). Após ativação, as células NK adquirem a capacidade de exercer suas funções efetoras: produção de citocinas e quimiocinas; expressão de ligantes co-estimulatórios; e mecanismos de citotoxicidade. As células NK são especializadas na produção de IFN- γ e TNF, que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta tipo 1 e ativação de macrófagos para execução de mecanismos antimicrobicidas (125,199). Podem produzir também GM-CSF, IL-5, IL-13, MIP-1 e RANTES (200–202). Ainda, células NK adquirem capacidade de produzir IL-10 durante infecções sistêmicas, atuando como reguladores da resposta imune através da inibição de IL-12, como demonstrado em modelo experimental de infecção por *L. (L.) donovani*, agente etiológico da LV (203). A expressão de ligantes co-estimulatórios pelas células NK, como CD40L e OX40L, para linfócitos T ou B, representa uma ligação direta entre a imunidade inata e adaptativa. As APCs estimulam células NK, que, por sua vez, fornecem sinais co-estimulatórios para os linfócitos (204,205). Células NK são consideradas células citotóxicas clássicas, sendo seu principal mecanismo de citotoxicidade a via de exocitose de grânulos líticos (206). Ainda, as células NK possuem a capacidade de lisar diretamente células revestidas por anticorpos, através de um mecanismo denominado citotoxicidade anticorpo-dependente (ADCC

– *Antibody-dependent cell cytotoxicity*), por meio da ativação do receptor CD16 (207).

A interação entre *Leishmania*, macrófagos e a resposta imune adaptativa tem sido bastante estudada, contudo a informação sobre as células NK e NKT na infecção permanece escassa (208). Embora os linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺ e células NK, assim como as células NKT, exerçam atividade citotóxica comum, os mecanismos de reconhecimento são diferentes. Os linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ citotóxicos induzem apoptose da célula-alvo após o reconhecimento antigênico específico através do MHC classe I e classe II, respectivamente. Células NKT, por sua vez, reconhecem antígenos apresentados preferencialmente pela glicoproteína CD1d. Já as células NK são ativadas e destroem células-alvo através de mecanismos independentes de apresentação antigênica específica (209). Suas funções são reguladas pela integração de sinais de receptores de ativação e receptores inibitórios que reconhecem ligantes na superfície de células-alvo potenciais. A regulação positiva de ligantes para receptores de ativação na célula NK (por exemplo, NKG2D) ou a regulação negativa de ligantes para receptores de inibição (por exemplo, CD94-NKG2A) já são estímulos relevantes para a ativação destas células (210–212). Muitos dos receptores inibitórios expressos pelas células NK, como os KIR (*Killer Immunoglobulin-like Receptors*), reconhecem moléculas de MHC classe I. Deste modo, a ausência ou alteração da expressão de MHC classe I, geralmente observada em células infectadas, impede a ligação do sinal inibitório, resultando na ativação das células NK (210,213,214).

Alguns estudos apontam para um papel protetor das células NK na LT. Células NK de indivíduos curados ou indivíduos sadios moradores de área endêmica são capazes de uma proliferação mais acentuada e maior produção de IFN- γ após estimulação *in vitro* com antígenos de *Leishmania* quando comparados com pacientes com LC ativa (215,216). Experimentos *in vitro* demonstraram a importância das células NK devido a sua ação citotóxica, lisando macrófagos infectados e induzindo a morte de promastigotas extracelulares; e de produção de citocinas, direcionando a resposta imune para um perfil Th1 e ativando macrófagos (194,217–223). Foi possível detectar a atividade citotóxica e de produção de IFN- γ das células NK em linfonodos periféricos logo no primeiro dia de infecção por *L. (L.) major* em modelos experimentais de LC com cura espontânea (194,218). Entretanto, alguns estudos sugerem que o papel citotóxico das células NK na LT não seja

protetor, contribuindo para a progressão da lesão e gravidade da doença (139,140). Em resumo, as células NK são componentes importantes na resposta imune contra patógenos intracelulares, como a *Leishmania*, seja por sua ação citotóxica, pela produção de citocinas ou por suas funções regulatórias, sendo capazes de modular respostas imunes. Entretanto, ainda é necessário definir qual o papel destas células na infecção por *Leishmania* e se estas contribuem para cura ou progressão da patologia (224–226).

As células NKT são subtipos de linfócitos que expressam receptores de superfície característicos de linfócitos T (CD3) e de células NK (CD56 e CD16), promovendo uma interação entre o sistema imune inato e adaptativo (227). Apesar de apresentarem TCR, como os linfócitos T convencionais, nas células NKT estes receptores interagem com uma variedade limitada de antígenos, similarmente aos PAMPs da imunidade inata. Estes antígenos são de natureza lipídica ou glicolipídica e são apresentados exclusivamente pela glicoproteína CD1d, uma molécula semelhante ao MHC I, às células NKT. A CD1d é expressa predominantemente por células hematopoiéticas e mais abundantes nas APCs, timócitos CD4⁺CD8⁺ (duplo-positivos) e linfócitos B de zona marginal (228–230,227,231–233). A maioria das células NKT é denominada tipo I ou invariante (iNKT) e expressam um TCR semi-invariante composto das cadeias V α 24J α 18 e V β 11 em humanos (227,234–236). O outro subtipo, denominadas NKT variantes (vNKT) ou do tipo II, expressam TCRs mais diversos e frequentemente possuem função oposta ou regulatória às células iNKT (237). Outro parâmetro que é comumente utilizado para definir as células iNKT é sua habilidade de reconhecer e ser fortemente ativada por α -galactosilceramida (α GalCer) (227), que é um glicolípido com potentes efeitos anti-tumorais em camundongos (238). As células vNKT também são restritas à apresentação antigênica por CD1d, porém não possuem TCR semi-invariante e não são capazes de reconhecer α GalCer (227,239). As células vNKT expressam um repertório de TCR mais diverso, que é pouco conhecido, e são capazes de reconhecer uma variedade de antígenos hidrofóbicos, incluindo sulfatide, lisofosfatidilcolina e pequenas moléculas aromáticas (não-lipídicas) (240–244).

As células NKT se assemelham mais às células do sistema imune inato funcionalmente por exercerem suas funções efetoras rapidamente após ativação (245). São capazes de exercer funções citotóxicas, mas são mais estudadas por sua potente capacidade de produção de citocinas variadas, tanto pró- quanto anti-

inflamatórias, desempenhando principalmente papel regulador em uma ampla gama de respostas imunes (227,232,246). As células NKT humanas podem ser CD4⁺, CD8⁺ ou duplo-negativas (DN), apesar de se desenvolverem independente de sinalização de MHC I ou II. Diferenças funcionais têm sido observadas entre estes subtipos e existem evidências de que a molécula CD4 é a responsável por estas diferenças (247–251). As células NKT CD4⁺ produzem níveis mais elevados de IL-4, IL-13, GM-CSF e IL-2 do que as células NKT que não expressam CD4, enquanto a produção de TNF e IFN- γ é elevada em todos os subtipos. As células NKT CD8⁺ exibem atividade citotóxica mais potente do que as células NKT DN e CD4^{neg}, respectivamente (247,248,252). Células NKT murinas são bastante distintas das células NKT humanas, não sendo observadas subpopulações com expressão de CD8, além das iNKT apresentarem um TCR distinto (251,253).

As células NKT estão envolvidas em processos imunológicos em diversas doenças, como câncer e doenças auto-imunes, rejeição a transplantes e imunidade contra agentes infecciosos, como a *Leishmania* (232). Na leishmaniose, é sugerido que estas células sejam capazes de sofrer ativação por antígenos do glicocálix de *Leishmania* apresentados via CD1d, devido à sua semelhança com α -GalCer. Exemplos destes antígenos são o lipofosfoglicano (LPG) de *L. (L.) donovani*, glicoinositol-fosfolípídeos (GIPs) e glicosil-fosfatidil-inositol (GPI) (254,255). Outra via de ativação é de forma indireta, através de citocinas como IL-12 ou IL-18 produzidas por APCs (256,257). Foi demonstrado que células NKT são capazes de produzir IFN- γ após incubação com células dendríticas previamente ativadas por *L. (L.) mexicana* (208). Na infecção por *L. (L.) major*, células NKT apresentam ativação diminuída, devido à capacidade do parasito de inibir a expressão de CD1d nas células dendríticas (258). Ainda assim, estas células têm sido associadas a um papel crucial nos estágios iniciais da resposta imune protetora e no direcionamento para um perfil de resposta Th1 ou Th2 em infecções por *L. (L.) major* (259,260). Entretanto, os estudos sobre a atividade das células NKT na LT humana são ainda muitos escassos (261).

Neste contexto, os linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT compartilham a capacidade de atuarem como células citotóxicas, tendo como principal via a de exocitose de grânulos líticos (161). Entretanto, na LT, a função citotóxica ainda não é bem elucidada e vários estudos vêm tentando compreender tal função e sua relação com a cura ou a progressão da doença (107). Juntamente com a função

citotóxica, é de fundamental importância tentar entender os perfis de ativação das populações celulares. É conhecido que a persistência parasitária crônica tem profundo impacto na capacidade efetora de células T antígeno-específicas, induzindo uma perda gradual de função (262). A imunorregulação via receptores inibitórios é uma das principais vias de exaustão celular, que é um estado definido por pobre função efetora, expressão sustentada de receptores inibitórios e estado transcricional distinto das células efetoras ou de memória funcionais (262). O receptor inibitório CD279, também chamado receptor de morte programada-1 (PD-1 – *programmed death-1*), é o principal receptor inibitório envolvido na exaustão de células T (262). A identificação da via regulatória é importante para distinguir a exaustão de células T de outros tipos de defeitos, como a regulação negativa de CD3 ou de TCR (263,264). Linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ exaustos são comumente detectados em infecções virais crônicas e agudas. A perda de função normalmente ocorre de maneira gradual e as células podem perder completamente a habilidade de produzir citocinas e de degranular (265–268). Similarmente aos linfócitos T, células NK e NKT com expressão de CD279 foram detectadas em infecções virais e bacterianas e em tumores, nas quais apresentaram características de perda de função (269–274).

Ainda, é necessário a compreensão da relação dos fenômenos que ocorrem sistemicamente e no sítio da infecção pela *Leishmania*. A migração dos linfócitos da circulação para a lesão é um processo complexo que envolve muitas moléculas que os direcionam especificamente. Selectinas e integrinas são famílias de moléculas de adesão que medeiam este processo de migração e direcionam as células para os compartimentos apropriados (275). Para acesso ao compartimento de pele, as células utilizam um "código" de pele denominado receptor antígeno linfocitário cutâneo (CLA – *cutaneous lymphocyte-associated antigen*), que é um membro da família das selectinas expresso em células T de memória e que se liga ao receptor de E-selectina nas células endoteliais da pele inflamada (276). O CLA tem sido reconhecido como uma das mais importantes moléculas de *homing* para pele e sua expressão em linfócitos ativados pode afetar a composição celular do infiltrado inflamatório (276). Consequentemente, o CLA tem sido associado à patogênese ou gravidade de muitas doenças inflamatórias da pele, como dermatites e também na leishmaniose cutânea (277–279). O detalhamento dos processos de migração celular e formação do infiltrado inflamatório auxilia na compreensão dos eventos

imunopatogênicos que ocorrem *in situ*, que são determinantes para a progressão ou resolução da lesão.

2. JUSTIFICATIVA

A leishmaniose cutânea (LC) é uma das doenças negligenciadas de maior importância para a saúde pública, com registro de cerca de 20.000 novos casos anualmente no Brasil, a maioria causada pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que é a espécie responsável pela infecção no estado do Rio de Janeiro. O desfecho clínico da doença é determinado principalmente pela resposta imune desencadeada pelo hospedeiro. A obtenção de sucesso na cura de pacientes de LC parece estar associada ao desencadeamento de uma resposta imune eficaz o suficiente para levar à cicatrização da lesão, em contraste com a impotente resposta imune desenvolvida por pacientes que apresentam quadros de falha terapêutica. Apesar dos esforços dos grupos de pesquisa por todo o mundo, ainda não existe uma vacina eficaz contra as leishmanioses e os esquemas terapêuticos empregados apresentam taxas variáveis de cura e elevada toxicidade. Neste contexto, é urgente a necessidade da compreensão dos fenômenos imunológicos envolvidos na patogênese da infecção, bem como no desenvolvimento de cura e proteção.

A resposta imune mediada por células T é determinante no curso da infecção, entretanto não é bem estabelecido qual o perfil de células efetoras é responsável por levar à cura da doença. Uma forte resposta inflamatória e a presença de células citotóxicas na lesão são características da infecção por *L. (V.) braziliensis*. Sendo assim, com intuito de obter um maior entendimento acerca do papel das populações celulares potencialmente citotóxicas na imunopatogenia da LC, o desenho experimental deste trabalho visa avaliar a frequência e os perfis de degranulação, ativação, exaustão e endereçamento para a lesão dos linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT em um estudo de pacientes de LC na evolução para a cura clínica e em episódios de falha terapêutica. As informações obtidas através das análises fenotípico-funcionais das populações celulares citotóxicas certamente resultarão em novas perspectivas para estudos vacinais e terapias mais eficientes e menos agressivas.

3. OBJETIVO GERAL

Delimitar os perfis imunológicos das populações celulares potencialmente citotóxicas (linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT) na resposta imune de pacientes de leishmaniose cutânea, da fase ativa até a cura clínica e em episódios de falha terapêutica.

3.1. Objetivos Específicos

- Determinar a distribuição das populações de linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT no sangue periférico de pacientes com forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados;

- Verificar a atividade de degranulação de linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT do sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados;

- Estabelecer os perfis de distribuição e de citotoxicidade das diferentes subpopulações de linfócitos T CD8⁺ (T CD8^{dim} e T CD8^{bright}), células NK (NK CD56^{dim} e NK CD56^{bright}) e NKT (NK CD8⁺, NKT CD4⁺, NKT CD8^{neg}CD4^{neg}, NKT CD8⁺CD4⁺) do sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados;

- Avaliar a resposta de linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT do sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados, quando estimulados com antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*;

- Analisar o efeito do antígeno de *L. (V.) braziliensis* na frequência, ativação e atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺, T CD4⁺, células NK e NKT obtidos do sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados;

- Detectar um potencial comprometimento da funcionalidade dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺, células NK e NKT no sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados induzido pelo antígeno de *L. (V.) braziliensis*;

- Verificar a influência do antígeno *L. (V.) braziliensis* nos perfis de endereçamento para a lesão dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺, células NK e

NKT do sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados;

- Correlacionar os dados clínicos dos pacientes (tempo de evolução da doença, reatividade ao teste de Montenegro, número e tamanho das lesões) com os perfis de distribuição, citotoxicidade, ativação, exaustão e migração para a pele dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺, células NK e NKT do sangue periférico;

- Comparar a resposta antigênica quanto às características de distribuição, citotoxicidade, ativação, exaustão e migração para a pele dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺, células NK e NKT do sangue periférico de pacientes que evoluíram para a cura após a terapia com aqueles que apresentam quadro de falha terapêutica;

- Determinar a concentração de IL-15 produzida em resposta ao antígeno de *L. (V.) braziliensis*, correlacionando com o processo de doença e de cura clínica;

- Correlacionar a concentração de IL-15 com os perfis de distribuição, citotoxicidade, ativação, exaustão e migração para a lesão dos linfócitos T CD8⁺, linfócitos T CD4⁺, células NK e NKT do sangue periférico de pacientes com a forma ativa da leishmaniose cutânea, durante a terapia e clinicamente curados;

- Determinar a concentração de IL-15 no plasma sanguíneo e sua relação com o processo de doença e evolução para a cura clínica;

- Comparar a concentração de IL-15 no microambiente da lesão de leishmaniose cutânea com a concentração observada em doenças não-relacionadas, como a esporotricose.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Casuística

Foram incluídos neste estudo um total de trinta e dois pacientes de LC e catorze indivíduos sadios, com idade entre dezoito e setenta anos. Os indivíduos sadios não possuíam histórico prévio de leishmaniose e não residiam em áreas endêmicas da doença. Os pacientes eram residentes no estado do Rio de Janeiro e foram atendidos e diagnosticados para LC no Laboratório de Vigilância em Leishmanioses do INI/FIOCRUZ. O diagnóstico foi confirmado após serem realizadas as devidas avaliações da história clínica e epidemiológica dos pacientes; IDR; isolamento e caracterização do parasito; e diagnóstico diferencial com outras doenças através de exame micológico e bacteriológico. Os critérios de exclusão foram: idade inferior a dezoito anos e superior a setenta anos, presença de comorbidade e gravidez, tratamento prévio com drogas leishmanicidas e visita prévia à área endêmica fora do Estado do Rio de Janeiro.

Todos os pacientes diagnosticados positivamente para LC foram então submetidos a um ensaio clínico de tratamento, randomizado e duplo cego, com antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®). O critério de cura clínica foi definido por epitelização total das lesões após conclusão do esquema terapêutico (8). Em caso de ausência de cicatrização completa após uso do Glucantime®, o tratamento foi considerado insatisfatório, ou seja, determinado como “falha terapêutica”, sendo, nestes casos, necessário um esquema terapêutico alternativo ou a repetição de um ciclo da mesma terapia antimonial. A tabela 2 mostra as principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes incluídos no estudo.

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

Tabela 2. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes de LC.

Paciente	Idade (anos)	Sexo	Número de lesões	Tamanho da lesão (maior diâmetro) (mm) ^a	Tempo de evolução até início do tratamento	IDRM ^b (mm)	Desfecho
1	22	M ^c	1	34	40	24	Cura clínica
2	56	F ^d	1	36	60	36	Cura clínica
3	24	M	1	45	90	n.d. ^e	Cura clínica
4	28	M	1	20	30	11	Cura clínica
5	44	M	1	28	120	n.d.	Cura clínica
6	29	M	1	50	120	n.d.	Cura clínica
7	70	M	1	n.d.	15	25	Cura clínica
8	46	M	4	75	180	27	Cura clínica
9	52	M	1	24	90	47	Cura clínica
10	51	F	1	40	60	n.d.	Cura clínica
11	70	M	7	n.d.	210	10	Cura clínica
12	32	F	1	130	120	n.d.	Cura clínica
13	59	M	1	20	60	12	Cura clínica
14	30	M	5	n.d.	45	20	Cura clínica
15	52	M	1	22	120	n.d.	Cura clínica
16	31	M	1	47	330	n.d.	Cura clínica
17	59	M	1	60	120	11	Cura clínica
18	23	F	1	35	120	n.d.	Cura clínica
19	43	M	2	37	90	17	Cura clínica
20	31	M	1	58	150	19	Cura clínica
21	19	M	1	22	60	18	Cura clínica
22	26	M	4	n.d.	60	n.d.	Cura clínica
23	47	M	1	45	30	14	Cura clínica
24	18	F	1	50	60	pos ^f	Cura clínica
25	19	M	1	30	30	22	Cura clínica
26	30	M	4	n.d.	120	n.d.	Cura clínica
27	25	M	1	14	n.d.	n.d.	Cura clínica
28	57	F	1	21	60	n.d.	Cura clínica
29	42	F	1	35	90	10	Cura clínica
30*	48	M	9	24	180	n.d.	Falha terapêutica
31*	31	M	3	50	180	n.d.	Falha terapêutica
32*	38	M	1	70	40	3	Falha terapêutica

^amm: milímetros;^bIDRM: Intradermorreação de Montenegro;^cM: masculino;^dF: feminino;^en.d.: não determinado;^fpos: positivo.

4.2. Coleta do Material Biológico

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

4.3. Obtenção, Criopreservação e Recuperação das Células Mononucleares do Sangue Periférico (CMSP)

As CMSP foram obtidas através de centrifugação em gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (Histopaque® 1077; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, E.U.A.), como descrito a seguir. O sangue heparinizado foi diluído na proporção 1:1 em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, E.U.A.), suplementado com HEPES (10mM; Sigma-Aldrich), 2-mercaptoetanol (1mM; Gibco), L-glutamina (1,5mM; Sigma-Aldrich), penicilina (200UI; Sigma-Aldrich) e estreptomicina (200mg/mL; Sigma-Aldrich). O sangue diluído foi então depositado cuidadosamente sobre o Ficoll-Hypaque, numa proporção 2:1, em tubo de polipropileno de fundo cônico (Corning Inc., Tewksbury, MA, E.U.A.). Posteriormente, esta amostra foi submetida a uma centrifugação a 400 giros por 30 minutos a 20°C , sem aceleração e sem freio (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA, E.U.A.). As CMSP foram coletadas do anel de células formado na interface entre o soro e o Ficoll, sendo em seguida submetidas a três lavagens por centrifugação (10 minutos/ 250 giros/ 20°C , com aceleração e freio) em meio RPMI suplementado.

Após a última lavagem, as CMSP obtidas foram ressuspensas em soro fetal bovino (SFB; Sigma-Aldrich) e contadas em câmara de Neubauer (Laboroptik Ltd., Lancing, GBR) com auxílio de microscópio óptico (Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY, E.U.A.). A viabilidade das células foi determinada através da diluição em corante Azul de Trypan (Sigma-Aldrich) e a concentração de células viáveis foi ajustada para $1 \times 10^7/\text{mL}$ de solução de criopreservação, que consiste em SFB com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Sigma-Aldrich). Cada 1 mL desta suspensão de células foi acondicionado em um tubo de criopreservação (criotubo; Nunc A/S, Kamstrupvej,

Roskilde, DNK), que foi colocado em recipiente próprio para congelamento (5100 Cryo 1°C Freezing Container – “Mr. Frosty”; Nalgene, Rochester, NY, E.U.A.) e mantido *overnight* à temperatura de 80°C negativos. Após este tempo, os criotubos foram transferidos para containers de nitrogênio líquido, onde foram armazenados até sua utilização.

Para a realização dos ensaios experimentais, as CMSP criopreservadas foram descongeladas em banho-maria (VWR, Radnor, PA, E.U.A.) a 37°C, e vertidas em 10 mL de meio RPMI suplementado acrescido de 20% de SFB (Sigma-Aldrich). Após homogeneização, foram realizadas duas lavagens por centrifugação (1500 rpm/10 min/ 4°C/ com aceleração e freio) e as CMSP foram ressuspensas em meio RPMI suplementado. A recuperação e viabilidade foram determinadas através da contagem em câmara de Neubauer (Laboroptik Ltd) com a utilização do corante Azul de Trypan (Sigma-Aldrich) e somente foram utilizadas amostras cuja viabilidade foi superior a 85%.

4.4. Parte 1 – Ensaios *ex vivo*

A primeira parte do estudo resultou na publicação do artigo I (**anexo 2**) e compreendeu avaliações de ensaios *ex vivo* de pacientes de LC, assim como de indivíduos sadios (incluídos como grupo controle). A casuística dessa parte do trabalho incluiu catorze pacientes de LC oriundos do estado do Rio de Janeiro, os quais apresentaram cura clínica em sua totalidade, além de onze indivíduos sadios. Os pacientes de LC foram divididos em três grupos:

- Pacientes antes do início da terapia antimonial (BT, do inglês *before treatment*) – avaliados após a confirmação do diagnóstico, momento no qual os pacientes apresentavam a doença ativa e presença de lesão leishmaniótica (n= 8).
- Pacientes durante a terapia antimonial (DT, do inglês *during therapy*) – avaliados no vigésimo dia após o início da terapia antimonial, momento no qual os pacientes apresentavam lesões ainda não totalmente cicatrizadas (n=8).
- Pacientes com cura clínica recente (CC, do inglês *clinical cure*) – avaliados no octogésimo dia após o início da terapia antimonial, momento no qual as terapias já haviam sido concluídas e os pacientes foram considerados

cl clinicamente curados de acordo com critérios definidos pela equipe médica do INI/ FIOCRUZ (n=8).

Como alguns pacientes foram repetidos nos grupos, o número de amostras de sangue periférico de pacientes processadas foi igual a oito por grupo, totalizando vinte e quatro amostras de pacientes incluídas no estudo.

As CMSP recuperadas foram dispostas em placas de 96 poços de fundo “U” (Corning Inc.) em uma concentração de $3,0 \times 10^5$ células/100 μ L em meio RPMI suplementado acrescido de 10% de SFB (Sigma-Aldrich). As placas foram incubadas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Panasonic Healthcare Company of North America, Wood Dale, IL, E.U.A.) na presença do anticorpo monoclonal (AcMo) anti-CD107a (BD Biosciences) por uma hora, quando foi adicionada monensina (BD Golgi-Stop™, BD Biosciences) (6 μ g/mL) e acrescidas mais cinco horas de incubação, como descrito na literatura (167) e confirmado por experimentos anteriores no nosso laboratório (280). A monensina é importante para prevenir a acidificação de vesículas endocíticas, evitando a degradação de proteínas CD107a reinternalizadas. Após incubação total de seis horas, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm/ 5 min.) em meio RPMI suplementado e ressuspendidas em 50 μ L de uma solução tampão fosfato-salino (PBS) contendo 0,1% de azida sódica (Merck, Frankfurter Str., Darmstadt, Alemanha) e 2% de SFB (Sigma-Aldrich) (PBS azida). As CMSP foram então submetidas à marcação com os seguintes AcMo: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 e anti-CD56 (BD Biosciences; Beckman Coulter, BREA, CA, E.U.A.). Após incubação por 20 minutos a 4°C protegidas da luz, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm/ 5min.) em PBS azida, e fixadas em paraformaldeído (PFA; Sigma-Aldrich) a 1% e mantidas a 4°C, protegidas da luz, por um período máximo de até 24 horas para aquisição em citômetro de fluxo.

A combinação de marcadores utilizados nas análises citofluorimétricas para avaliar as características celulares está descrita na Tabela 3.

Tabela 3: Combinação de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores para avaliar diferentes características celulares por citometria de fluxo nos ensaios experimentais *ex vivo*.

Análise Citofluorimétrica	Característica Celular
CD56 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺	Linfócitos T CD4 ⁺
CD56 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺	Linfócitos T CD8 ⁺
CD56 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ^{dim}	Linfócitos T CD8 ^{dim}
CD56 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ^{bright}	Linfócitos T CD8 ^{bright}
CD3 ^{neg} CD56 ⁺	Células NK
CD3 ^{neg} CD56 ^{dim}	Células NK CD56 ^{dim}
CD3 ^{neg} CD56 ^{bright}	Células NK CD56 ^{bright}
CD3 ⁺ CD56 ⁺	Células NKT
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ⁺	Células NKT DP
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD8 ^{neg} CD4 ⁺	Células NKT CD4 ⁺
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD8 ⁺ CD4 ^{neg}	Células NKT CD8 ⁺
CD3 ⁺ CD56 ⁺ CD8 ^{neg} CD4 ^{neg}	Células NKT DN
CD107a ⁺	Células em degranulação

neg: negativo;

bright: células que apresentam alta intensidade de fluorescência;

dim: células que apresentam baixa intensidade de fluorescência.

4.4.1. Citometria de Fluxo

Nesta parte do estudo, foram utilizados dois citômetros de fluxo: MoFlo Astrios (Beckman Coulter), da Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo do IOC, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*); e FACS Aria II (BD Biosciences), da Plataforma de Citometria de Fluxo da Rede de Plataformas Tecnológicas do Programa de Desenvolvimento Tecnológico em Insumos para Saúde (PDTIS), FIOCRUZ. As amostras foram adquiridas em um total de 50 mil eventos dentro de uma região criada de acordo com as características morfológicas de tamanho e granularidade das células e as análises citofluorimétricas foram realizadas utilizando o programa computacional específico Kaluza 1.2 (Beckman Coulter).

AcMo isotípicos anti-IgG, conjugados aos mesmos fluorocromos usados nos ensaios *ex vivo*, foram empregados como controles negativos de marcação e para o ajuste da voltagem ideal. Amostras com marcação simples para cada fluorocromo utilizado foram aplicadas para a compensação de cores. Foi também empregada a estratégia de FMO (do inglês *Fluorescence Minus One*), que contém todos os fluorocromos do painel, exceto aquele que está sendo avaliado. Realizados então todos os controles e ajustes, as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo.

4.5. Parte 2 – Ensaios *in vitro*

A segunda parte do estudo resultou no desenvolvimento do artigo II (**anexo 3**) e compreendeu avaliações de ensaios *in vitro* de pacientes de LC, assim como de indivíduos sadios (incluídos como grupo controle). A casuística dessa parte do trabalho incluiu vinte e quatro pacientes de LC oriundos do estado do Rio de Janeiro, os quais apresentaram cura clínica em sua totalidade, além de sete indivíduos sadios. Os pacientes de LC foram divididos em três grupos:

- Pacientes com a doença ativa (AD, do inglês *active disease*) – avaliados após a confirmação do diagnóstico de LC, antes do início da terapia antimonial; momento no qual os pacientes apresentavam lesão leishmaniótica (n= 17).
- Pacientes durante a terapia antimonial (DT, do inglês *during therapy*) – avaliados entre o décimo quinto e o vigésimo dia após o início da terapia antimonial, momento no qual os pacientes apresentavam lesões ainda não totalmente cicatrizadas (n=16).
- Pacientes com cura clínica recente (CC, do inglês *clinical cure*) – avaliados no octogésimo dia após o início da terapia antimonial, momento no qual as terapias já haviam sido concluídas e os pacientes foram considerados clinicamente curados de acordo com critérios definidos pela equipe médica do INI/ FIOCRUZ (n=10).

Como alguns pacientes foram repetidos nos grupos, o número de amostras de sangue periférico de pacientes processadas foi variável em cada grupo, totalizando quarenta e três amostras de pacientes no estudo.

Para os ensaios *in vitro*, as CMSP recuperadas foram ajustadas para a concentração de $3,0 \times 10^5$ células/100 μ L em meio RPMI suplementado acrescido

de 10% de SFB e dispostas em placas de 96 poços de fundo “U” (Corning Inc.) em um volume final de 200 µL/poço. As placas foram incubadas por setenta e duas horas a 37°C em atmosfera úmida de 5% de CO₂ (Panasonic) na presença de antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis* (Lb-Ag), preparados conforme descrito a seguir no item 4.5.3. Células não estimuladas (*background* – BG) e estimuladas com fitohemaglutinina (PHA, Sigma-Aldrich) (5 µg/mL) foram cultivadas nas mesmas condições experimentais, servindo como controle negativo e positivo de estimulação, respectivamente. Seis horas antes do final do tempo de incubação, foi adicionado às culturas o AcMo anti-CD107a (BD Biosciences) e, após uma hora, foi adicionada monensina (BD Golgi-Stop™, BD Biosciences) (6 µg/mL). Após o período total de 72 horas de incubação, as células foram então lavadas por centrifugação (2000 rpm/ 5 min.) em meio RPMI suplementado, ressuspensas em 50 µL de PBS azida e submetidas à marcação com os seguintes AcMo: anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD38 e anti-CD279 (BD Biosciences; Beckman Coulter; and BioLegend, San Diego, CA, E.U.A.); e ainda com 7-aminoactinomicina D (7AAD; Sigma-Aldrich), para a exclusão de células mortas. Após incubação por 20 minutos a 4°C protegidas da luz, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm/ 5min.), ressuspensas em PBS azida e adquiridas imediatamente em citômetro de fluxo. Em algumas amostras de pacientes AD (n=9) e nas amostras de indivíduos saudáveis (n=7) foi incluída a marcação com o AcMo anti-TCR Vα24-Jα18 (Biolegend) para avaliação do TCR invariante das células NKT invariantes (iNKT).

A combinação de marcadores utilizados nas análises citofluorimétricas para avaliar as características celulares está descrita na Tabela 4.

Tabela 4: Combinação de anticorpos monoclonais utilizados como marcadores para avaliar diferentes características celulares por citometria de fluxo nos ensaios experimentais *in vitro*.

Análise Citofluorimétrica	Característica Celular
7AAD ^{neg}	Células viáveis
CD56 ^{neg} CD3 ⁺ CD4 ⁺	Linfócitos T CD4 ⁺
CD56 ^{neg} CD3 ⁺ CD8 ⁺	Linfócitos T CD8 ⁺
CD3 ^{neg} CD56 ⁺	Células NK
CD3 ⁺ CD56 ⁺	Células NKT CD3 ⁺ CD56 ⁺
CD3 ⁺ TCR-V α 24-J α 18 ⁺	Células NKT invariantes
CD107a ⁺	Células em degranulação
CD38 ⁺	Células ativadas
CD279 ⁺	Células em exaustão

neg: negativo

4.5.1. Citometria de Fluxo

Para todas as aquisições desta etapa do trabalho foi utilizado o citômetro de fluxo MoFlo Astrios (Beckman Coulter), da Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo do IOC, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*), FIOCRUZ. As amostras foram adquiridas em um total de 50 mil eventos de acordo com seus parâmetros morfológicos de tamanho e granularidade e as análises citofluorimétricas foram realizadas utilizando o programa computacional específico Kaluza 1.5a (Beckman Coulter).

Foram utilizados AcMo isotópicos anti-IgG conjugados aos mesmos fluorocromos usados nos ensaios *in vitro* como controles negativos de marcação e para o ajuste da voltagem ideal. Amostras com marcação simples para cada fluorocromo foram utilizadas para a compensação de cores e foi também empregada a estratégia de FMO. Realizados então todos os controles e ajustes, as amostras foram adquiridas em citômetro de fluxo.

4.5.2. Cinética de padronização do tempo de cultivo *in vitro*

Com intuito de determinar qual o melhor tempo de cultivo das CMSP para a detecção do pico máximo de degranulação (CD107a) em resposta *Lb-Ag*, foi realizado experimento cinético de até 120 horas. CMSP de três pacientes de LC clinicamente curados (CC) foram ajustadas para a concentração de $3,0 \times 10^5$ células/100 μL em meio RPMI suplementado acrescido de 10% de SFB e cultivadas na presença de *Lb-Ag* em placa de 96 poços de fundo “U” (Corning Inc.), em um volume final de 200 μL por poço, a 37°C, sob atmosfera úmida de 5% CO_2 por 6, 12, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. AcMo anti-CD107a e BD GolgiStop™ (BD Biosciences) foram adicionados 6 e 5 horas, respectivamente, antes do tempo final de cada incubação. CMSP não estimuladas (BG) e CMSP estimuladas com PHA (Sigma-Aldrich) (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram cultivadas nas mesmas condições, servindo como controle negativo e positivo de estimulação, respectivamente. Após os períodos de incubação, as células foram então lavadas por centrifugação (2000 rpm/ 5 min.) em meio RPMI suplementado, ressuspendidas em 50 μL de PBS azida e submetidas à marcação com AcMo anti-CD3 e 7AAD. Após incubação por 20 minutos a 4°C protegidas da luz, as células foram lavadas por centrifugação (2000 rpm/ 5min.), ressuspendidas em PBS azida e adquiridas imediatamente no citômetro de fluxo MoFlo Astrios (Beckman Coulter), da Plataforma Multiusuários de Citometria de Fluxo do IOC, Núcleo de Purificação Celular (*Cell Sorting*), FIOCRUZ. As células foram marcadas também imediatamente após o descongelamento, sem serem submetidas à cultura, correspondendo ao tempo zero da cinética (Figura 5).

Através desse experimento de cinética, pudemos determinar o tempo de 72 horas de incubação como tempo ótimo para detecção do pico de CD107a, tanto para as CMSP cultivadas com *Lb-Ag*, como para os controles negativos (BG) e positivos (PHA) de estimulação (Figura 5). A expressão dos antígenos estudados não variou devido ao processo de criopreservação.

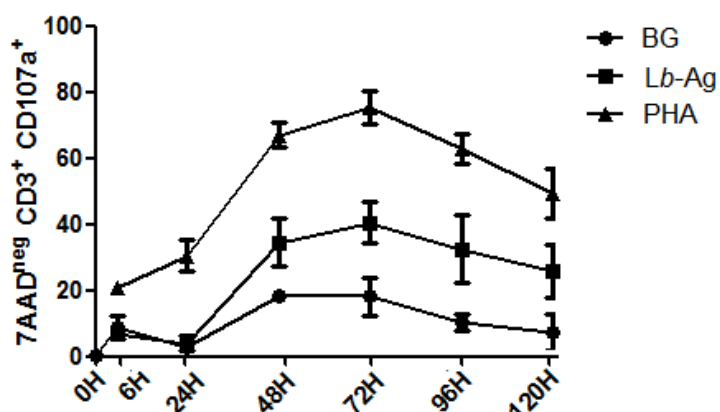


Figura 5. Experimento de cinética para a detecção do pico de expressão de CD107a. As CMSP provenientes de três pacientes de LC clinicamente curados foram submetidas à marcação com 7AAD e com os AcMo anti-CD107a e anti-CD3 imediatamente após descongelamento (0H) e após 6, 24, 48, 72, 96 e 120 horas. Gráfico representando os resultados da cinética referentes às CMSP sem estimulação (BG) (pontos), estimuladas com Lb-Ag (quadrados) e com PHA (triângulos). Cada símbolo representa a média de 3 indivíduos \pm erro padrão. CMSP: células mononucleares de sangue periférico; 7AAD: 7-aminoactinomicina D; AcMo: anticorpos monoclonais; H: horas; BG: *background*; Lb-Ag: antígeno particulado de *Leishmania (Viannia) braziliensis*; PHA: fitohemaglutinina.

4.5.3. Preparo do antígeno particulado de *L. (V.) braziliensis* (Lb-Ag)

Formas promastigotas da cepa de referência de *L. (V.) braziliensis* MCAN/BR/98/R619 foram utilizadas para a obtenção de antígenos totais particulados (Lb-Ag), os quais foram utilizados nos ensaios *in vitro*. Os parasitos foram expandidos em garrafas de poliestireno de 25 cm² contendo meio de cultura Schneider (pH 7,2) suplementado com 1,5 mM de L-glutamina, penicilina (200 UI), estreptomicina (200 µg/mL) e 20% de SFB (todos Sigma-Aldrich), além de 2% de urina humana (doador do sexo masculino). Após o 5º dia de cultivo, quando os parasitos se encontravam em fase estacionária, foram submetidos a duas lavagens por centrifugação (3000 rpm/ 15 minutos/ 20º C/ com aceleração e freio) em PBS. A seguir foi realizada a contagem e ajuste dos parasitos para 10⁸ promastigotas/ml. A suspensão de *Leishmania* em PBS foi então submetida a 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 70ºC, a fim de lisar os parasitos e obter o antígeno particulado. Após a obtenção da lise completa, através da ausência de parasitos íntegros, confirmada por microscopia óptica, o antígeno foi alíquotado e conservado a 20º C negativos até o momento de sua utilização.

4.6. Parte 3

A terceira parte do trabalho é referente aos resultados que ainda não foram incluídos para publicação.

4.6.1. Experimentos *in vitro*

4.6.1.1. Expressão de CLA

Foi também avaliada nos experimentos *in vitro* a expressão da molécula CLA (do inglês *cutaneous lymphocyte-associated antigen*), receptor membro da família das selectinas que é importante marcador de endereçamento para pele. No painel citofluorimétrico dos experimentos *in vitro*, além dos AcMo descrito no item 4.5., também foi adicionado o AcMo anti-CLA. A casuística desta etapa contou com 15 pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD, do inglês *active disease*), 14 pacientes durante a terapia antimonial (DT, do inglês *during therapy*) e 9 pacientes com cura clínica (CC, do inglês *clinical cure*), além de 7 indivíduos sadios (HI, do inglês *healthy individuals*).

4.6.1.2. Grupo de Pacientes com Falha Terapêutica (FT)

Nos experimentos *in vitro*, além da amostragem descrita no item 4.5, foi avaliado mais um grupo de pacientes de LC, os quais apresentaram falha terapêutica após o término da terapia (FT; n=3); ou seja, não apresentaram cicatrização completa das lesões após o tratamento com Glucantime®, sendo necessário um esquema terapêutico alternativo ou a repetição de um ciclo da mesma terapia antimonial para alcançar a cura clínica. Esses pacientes foram avaliados quando ainda apresentavam a doença ativa; entretanto, após um estudo retrospectivo, foi constatado que os mesmos apresentaram falha terapêutica. As principais características clínicas e epidemiológicas dos pacientes FT estão descritas na tabela 2 e as CMSP destes pacientes foram submetidas à metodologia descrita no item 4.5.

4.6.2. Quantificação de IL-15

No presente estudo foi também realizada a quantificação de IL-15, através da metodologia de ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*). A quantificação de IL-15 foi realizada a partir de três espécimes biológicos:

a) sobrenadante de cultura de CMSP – os sobrenadantes dos experimentos *in vitro* (Parte 2), descritos no item 4.5., foram coletados e armazenados a 80° C negativos até o momento de sua utilização.

b) plasma sanguíneo – Amostras de sangue periférico de pacientes de LC e de indivíduos saudáveis, obtidas conforme descrito no item 4.2., foram centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, com aceleração e freio, e o plasma foi coletado e mantido a 80° C negativos até o momento de sua utilização. Os pacientes de LC foram divididos em 3 grupos: pacientes com a doença ativa (AD, do inglês *active disease*) (n=10), pacientes durante a terapia antimonia (DT, do inglês *during therapy*) (n=9) e pacientes com cura clínica (CC, do inglês *clinical cure*) (n=5). Os indivíduos saudáveis (HI) (n=5) foram incluídos como grupo controle,

c) sobrenadante de macerado de amostras de biópsia de lesão – Amostras de biópsia de lesão de pacientes de LC (n=10) foram obtidas em estudo anterior do nosso grupo no Laboratório de Imunoparasitologia, conforme descrito no artigo III em anexo (**anexo 4**). Os sobrenadantes dos macerados destas amostras de biópsia foram coletados (conforme descrito no **anexo 4**) e mantidos a -80°C até o momento de sua utilização. Foram avaliados também sobrenadantes de macerado de biópsia de lesão de pacientes com esporotricose, submetidas à mesma metodologia descrita no artigo em anexo (**anexo 4**), e incluídos neste estudo como grupo de doença não-relacionada à LC (NR) (n=7).

Todos os espécimes biológicos foram então descongelados à temperatura ambiente e submetidos à quantificação de IL-15 pelo kit *ELISA MAX™ Deluxe Sets* (Biolegend). De acordo com as instruções fornecidas pelo fabricante, placas de 96 poços de fundo chato (produto incluído no kit) foram sensibilizadas com 100 µL do

anticorpo de captura (produto incluído no kit) por 16 horas entre 2°C e 8°C. Após este período, as placas foram lavadas 4 vezes em 300 µL de tampão de lavagem específico (produto incluído no kit), foram adicionados 200 µL de Diluente A (produto incluído no kit) em cada poço, para o bloqueio de ligações inespecíficas, e as placas foram incubadas a temperatura ambiente por uma hora em agitador orbital (Arsec). As placas foram lavadas 4 vezes em 300 µL de tampão de lavagem específico, foram adicionados os controles para a curva padrão (produtos incluídos no kit) e as amostras nos devidos poços e seguida incubação por duas horas a temperatura ambiente em agitador orbital (Arsec). A curva padrão e todas as amostras foram adicionadas em duplicatas. As placas foram então lavadas 4 vezes em 300 µL de tampão de lavagem específico, foram adicionados 100 µL de anticorpo de detecção (produto incluído no kit) em cada poço e seguida incubação por uma hora a temperatura ambiente em agitador orbital (Arsec). As placas foram novamente lavadas 4 vezes em 300 µL de tampão de lavagem específico, adicionados 100 µL de avidina-HRP (produto incluído no kit) em cada poço e seguida incubação por 30 minutos a temperatura ambiente em agitador orbital (Arsec). As placas foram lavadas mais 5 vezes em 300 µL de tampão de lavagem específico, foram adicionados 100 µL de solução de substrato (produto incluído no kit) em cada poço e incubadas por 15 minutos protegidas da luz. Foram então adicionados 100 µL de solução de parada (Stop Solution for TMB Substrate, Biolegend) em cada poço e as placas foram imediatamente lidas em Leitor de Microplacas em Absorbância (ELx 800, BioTek Instruments, Winooski, VT, E.U.A.) de 450 nanômetros. Após a leitura, a média das duplicatas foi calculada e os resultados foram analisados com base na confecção da curva padrão.

4.7. Análise Estatística

O teste pareado *Wilcoxon matched-pairs signed rank* foi aplicado para as comparações entre duas amostras relacionadas e o teste *Mann–Whitney U* para a comparação entre dois grupos. O intervalo de confiança foi de 95%, sendo então considerados estatisticamente significativos os resultados onde $P \leq 0,05$. Para todas as análises estatísticas foi utilizado o programa computacional específico *GraphPad Prism 6* (GraphPad Software Inc.).

5. RESULTADOS

Os resultados obtidos nesta tese estão divididos em três partes:

5.1. Parte 1 – Artigo I (Publicado; anexo 2)

Os resultados da primeira parte do estudo resultaram na publicação do artigo I, no qual avaliamos, em ensaios *ex vivo*, a frequência e os perfis de expressão de CD107a de células potencialmente citotóxicas do sangue periférico, como linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, células NK e NKT, obtidas de pacientes de leishmaniose cutânea em diferentes estágios clínicos de evolução para a cura.

As análises foram realizadas com base no protocolo citofluorimétrico ilustrado na figura 6.

5.1.1. Frequência de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, células NK e NKT.

Para determinar os perfis celulares dos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, células NK e NKT durante a resposta imunológica na LC, nós comparamos os percentuais destas populações celulares no sangue periférico de pacientes antes do tratamento (BT), durante o tratamento (DT) e após a cura clínica (CC), assim como de indivíduos saudáveis (HI). Foi possível observar que os pacientes CC apresentaram elevadas frequências de linfócitos T CD8⁺ (mediana \pm intervalo interquartil: 30,7 \pm 9,6%) tanto em comparação aos pacientes BT (24,2 \pm 10,3%; $P \leq 0,05$) e DT (25,6 \pm 4,8%; $P \leq 0,05$), quanto aos HI (24,9 \pm 8,6%; $P \leq 0,05$) (Figura 7a). Os pacientes BT apresentaram baixas frequências de linfócitos T CD4⁺ (41,6 \pm 19,9%) em comparação aos HI (50,9 \pm 8,8%; $P \leq 0,01$). A frequência de linfócitos T CD4⁺ retornou aos percentuais de normalidade, detectados nos HI, com o tratamento (DT: 44,7 \pm 17,4%) e a cura clínica (CC: 43,5 \pm 33,3%) (Figura 7b). Todos os grupos de pacientes de LC exibiram elevadas frequências de células NK (BT: 9,9 \pm 8,8%; DT: 8,0 \pm 12,0%; CC: 8,2 \pm 7,8%) em comparação aos HI (3,4 \pm 4,1%) ($P \leq 0,01$, $P \leq 0,05$ e $P \leq 0,01$, respectivamente) (Figura 7c). Não foram observadas diferenças nos percentuais de células NKT entre os grupos estudados (dados não mostrados).

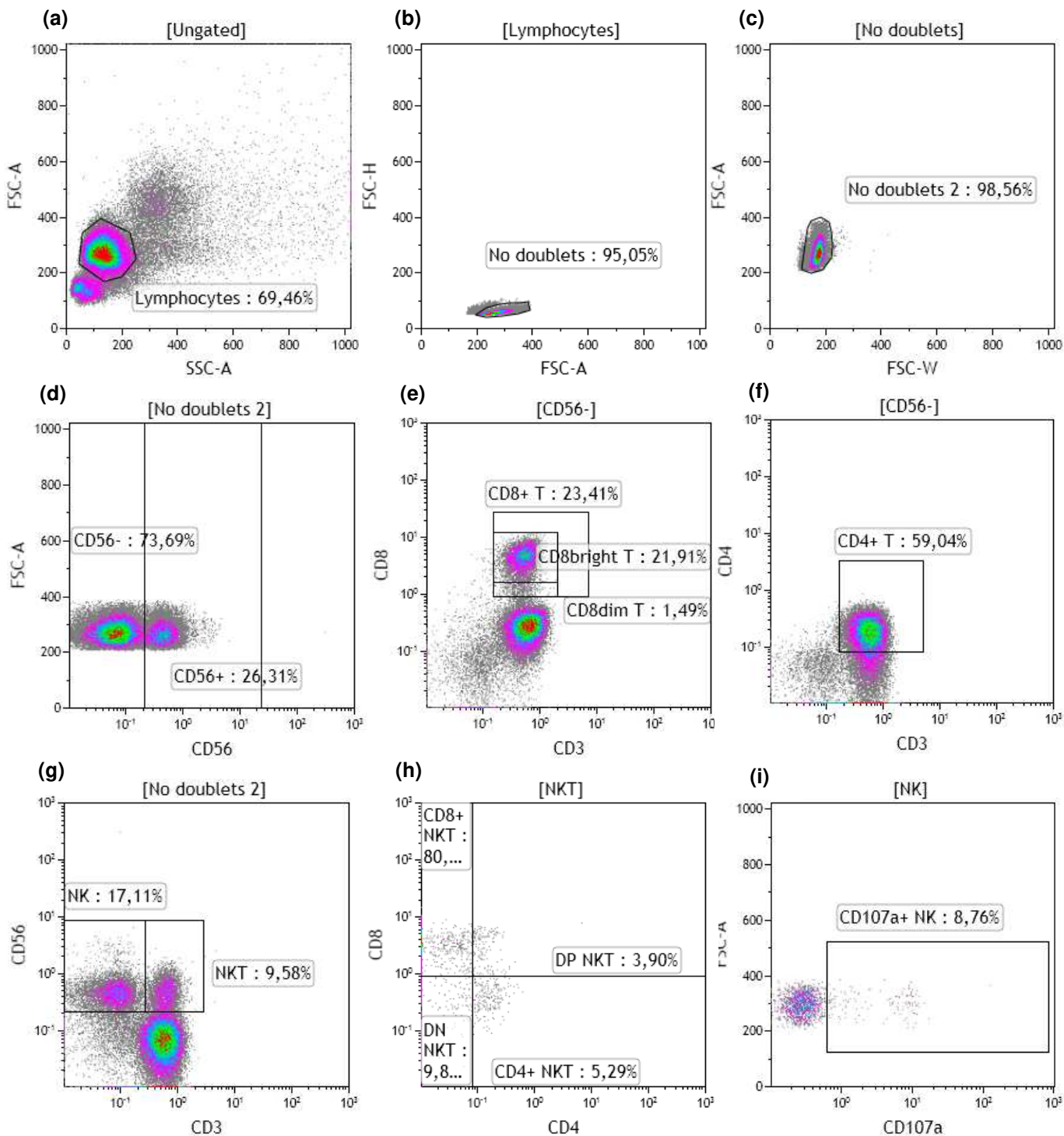


Figura 6. Protocolo citofluorimétrico representativo para determinar as frequências das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, células *natural killer* (NK) e *natural killer T* (NKT) (e suas subpopulações) e suas expressões de CD107a. As células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 e anti-CD107a. A região dos linfócitos (“*Lymphocytes*”) foi determinada com base no *dot-plot* morfológico de *forward scatter* (FSC-A) vs. *side scatter* (SSC-A) (a). Em seguida, as células delimitadas na região de “*Lymphocytes*” (a) foram analisadas através de *dot-plots* FSC-H vs. FSC-A (b) e FSC-A vs. FSC-W (c) para exclusão de agregados celulares e debris. As populações de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ foram definidas nos *dot-plots* CD8 vs. CD3 (e) e CD4 vs. CD3 (f), respectivamente, a partir da região de células CD56 negativas (d). As populações de células NK e NKT foram definidas através do *dot-plot* de CD56 vs. CD3 (g). As subpopulações de células NKT foram determinadas com base em sua expressão de CD8 e/ou CD4 (h). A expressão de CD107a foi analisada em *dot-plots* de FSC-A vs. CD107a, com base nas regiões de definição de cada população celular – representada aqui com base nas células células NK (i).

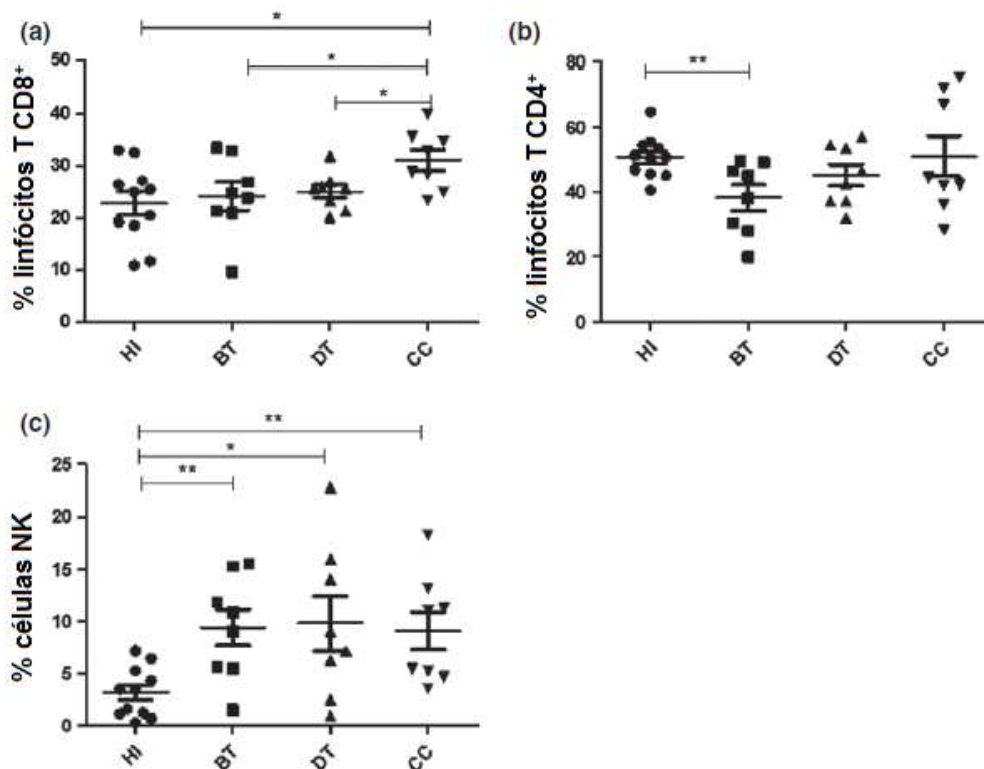


Figura 7. Gráficos de dispersão representando as frequências de linfócitos T CD8⁺ (a), linfócitos T CD4⁺ (b) e células NK (c). HI: indivíduos saudáveis, do inglês *healthy individuals* (n = 11); BT: pacientes antes do tratamento, do inglês *before treatment* (n = 8); DT: pacientes durante o tratamento, do inglês *during treatment* (n = 8); CC: pacientes clinicamente curados, do inglês *clinically cured* (n = 8). Os dados são representados pela mediana ± intervalo interquartil. Cada ponto representa um indivíduo. As comparações estatísticas foram realizadas com o teste U de Mann-Whitney, onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$.

5.1.2. Expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, células NK e NKT.

A análise da expressão de CD107a pelos linfócitos T e células NK e NKT foi realizada para avaliar seus percentuais de degranulação nas amostras de sangue periféricos dos pacientes de LC. Nós observamos que os pacientes CC apresentaram os menores percentuais de expressão de CD107a por todas as populações celulares estudadas. A frequência de linfócitos T CD8⁺ CD107a⁺ foi menor nos pacientes CC ($1,1 \pm 0,8\%$) quando comparado com os pacientes BT ($2,1 \pm 3,5\%$; $P \leq 0,05$) e DT ($1,8 \pm 3,7\%$; $P \leq 0,05$), assim como com os HI ($2,8 \pm 2,0$; $P \leq 0,01$) (Figura 8a). Pacientes CC também apresentaram baixos percentuais de linfócitos T CD4⁺ CD107a⁺ ($0,7 \pm 0,9\%$), que foi estatisticamente significativa em comparação aos pacientes DT ($2,1 \pm 1,5\%$; $P \leq 0,05$) (Figura 8b). As células NK apresentaram baixos percentuais de expressão de CD107a em todos os grupos de pacientes de LC (BT: $3,5 \pm 8,6\%$, $P \leq 0,05$; DT: $5,8 \pm 8,4\%$, $P \leq 0,05$; CC: $3,8 \pm 4,8\%$; $P \leq 0,01$) em comparação aos HI ($12,8 \pm 15,7\%$) (Figura 8c). Entre os grupos

de pacientes de LC, os menores percentuais de células NK CD107a⁺ foram detectados nos pacientes CC, que foram significativamente menores do que os observados nos pacientes DT ($P \leq 0,05$) (Figura 8c). Os pacientes CC também apresentaram baixos percentuais de expressão de CD107a pelas células NKT ($2,4 \pm 3,1\%$), que foram significativamente menores em comparação aos pacientes DT ($6,4 \pm 10,0\%$, $P \leq 0,01$) (Figura 8d).

Com intuito de avaliar qual população celular seria mais relevante na função citotóxica nas diferentes fases clínicas da LC, nós realizamos outra estratégia de análise citofluorimétrica. Por esta análise, foi possível determinar a distribuição de cada população celular de interesse com base na expressão total de CD107a. Desta forma, observamos que os linfócitos T CD4⁺ são a principal população celular envolvida com a expressão de CD107a em todos os grupos estudados, seguidos pelos linfócitos T CD8⁺ e células NK, e, em menor proporção, pelas células NKT (Figura 9).

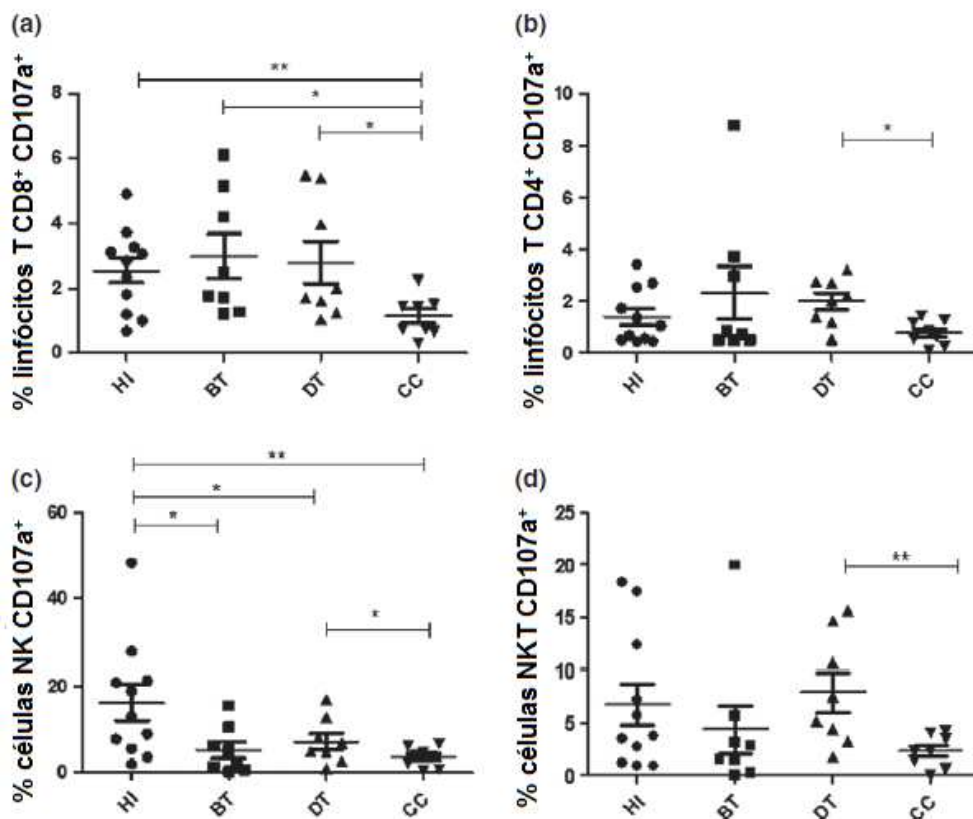


Figura 8. Gráficos de dispersão representando a expressão de CD107a pelos linfócitos T CD8⁺ (a), linfócitos T CD4⁺ (b), células NK (c) e células NKT (d). HI: indivíduos saudáveis, do inglês *healthy individuals* (n = 11); BT: pacientes antes do tratamento, do inglês *before treatment* (n = 8); DT: pacientes durante o tratamento, do inglês *during treatment* (n = 8); CC: pacientes clinicamente curados, do inglês *clinically cured* (n = 8). Os dados são representados pela mediana \pm intervalo interquartil. Cada ponto representa um indivíduo. As comparações estatísticas foram realizadas com o teste U de Mann-Whitney, onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$.

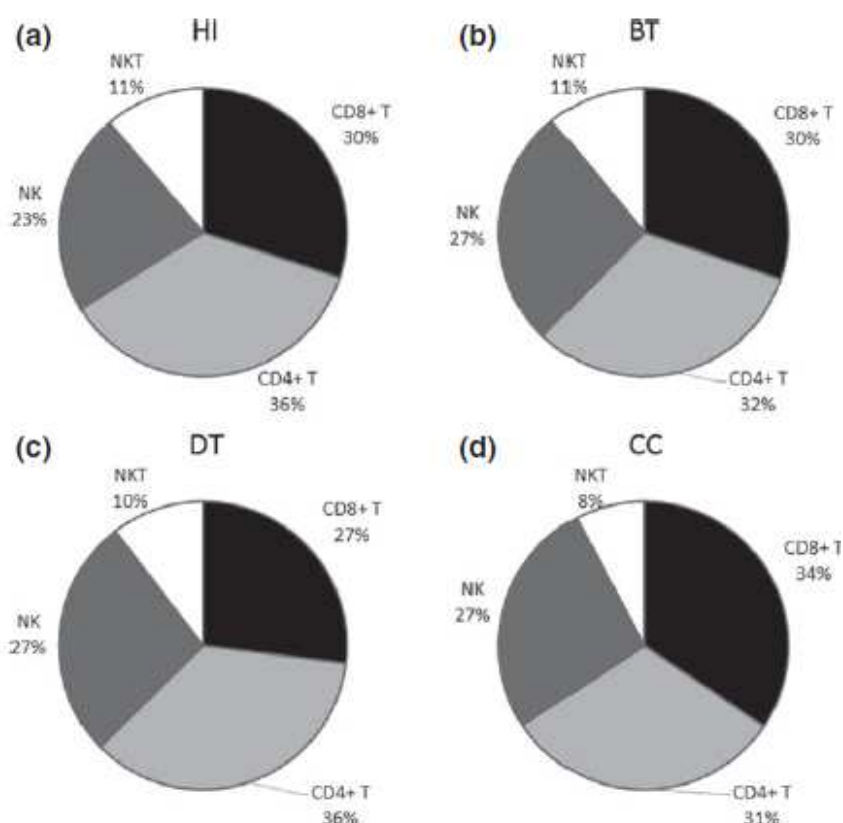


Figura 9. Distribuição de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, células NK e NKT a partir do *gate* de células CD107a⁺. Os gráficos de setores ilustram a média dos dados obtidos nos HI (indivíduos saudáveis, do inglês *healthy individuals*; n = 11) (a), BT (pacientes antes do tratamento, do inglês *before treatment*; n = 8) (b), DT (pacientes durante o tratamento, do inglês *during treatment*; n = 8) (c) e CC (pacientes clinicamente curados, do inglês *clinically cured*; n = 8) (d).

5.1.3. Densidade de expressão de CD8.

Nós avaliamos duas subpopulações de linfócitos T CD8⁺ com base na densidade de expressão da molécula CD8 (T CD8^{dim} e T CD8^{bright}). Foram determinadas suas frequências e expressão de CD107a no sangue periférico de pacientes de LC, na tentativa de verificar se o perfil de expressão de CD8 poderia estar relacionado à fase clínica da doença. Observamos que a maioria dos linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico dos pacientes de LC, em qualquer fase clínica, apresenta o fenótipo CD8^{bright}. No entanto, quando analisamos as frequências dos linfócitos T CD8⁺ CD107a⁺, observamos que cerca de 70% dessas células apresentaram o fenótipo CD8^{dim} em todos os grupos de pacientes de LC. Os HI apresentaram resultados similares aos observados nos pacientes de LC quanto aos fenótipos de linfócitos T CD8⁺ e sua expressão de CD107a. As diferenças entre os fenótipos de linfócitos T CD8⁺ foram extremamente significantes em todos os grupos estudados ($P \leq 0,001$) (dados não mostrados).

5.1.4. Densidade de expressão de CD56.

Com base na densidade de expressão do receptor CD56, as células NK podem ser divididas em duas subpopulações distintas: células NK CD56^{bright} e NK CD56^{dim}. Nós avaliamos a expressão de CD56 em células NK obtidas de pacientes de LC, assim como de HI, com intuito de verificar se os perfis de expressão de CD56 são modulados na evolução para a cura doença. Nós observamos que mais de 95% das células NK, tanto dos pacientes de LC quanto dos HI, apresentaram fenótipo CD56^{dim}. Para avaliação da degranulação destas subpopulações, foram selecionadas as células NK CD107a⁺, e, a partir destas, avaliados os percentuais de cada subpopulação com base na densidade de expressão do CD56. Foi observado que mais de 95% das células NK CD107a⁺ também apresentaram o fenótipo CD56^{dim}. As diferenças entre os fenótipos de células NK foram extremamente significantes em todos os grupos estudados ($P \leq 0,001$) (dados não mostrados).

5.1.5. Subpopulações de células NKT

As células NKT humanas podem ser divididas de acordo com sua expressão de CD4 e/ou CD8 e são normalmente subdivididas em três subpopulações principais: CD8⁺, CD4⁺ ou CD8^{neg}CD4^{neg} (duplo-negativas; DN) (232) (Bendelac et al, 2007). Ainda, alguns autores apontam para a existência de uma quarta subpopulação, com fenótipo CD8⁺CD4⁺ (duplo-positivas; DP) (281). Deste modo, a partir da definição da população de células NKT nos grupos estudados, foi possível avaliar a distribuição de suas subpopulações com base nas diferenças de expressão de CD4 e CD8 nos pacientes de LC, assim como nos HI. Nós observamos que cerca de metade das células NKT de todos os grupos estudados apresentam o fenótipo CD8⁺CD4^{neg} (Figura 10a). Ainda, tanto os pacientes de LC quanto os HI apresentaram proporções intermediárias das subpopulações NKT CD8^{neg}CD4⁺ e NKT DN e frequências mais baixas de células NKT DP (Figura 10a). Embora a subpopulação NKT DP tenha sido detectada em pequenos percentuais, houve diferenças na frequência desta subpopulação entre os grupos estudados. Pacientes BT apresentaram percentuais de células NKT DP (média \pm erro padrão: $1,2 \pm 0,5\%$) significativamente menores que os pacientes DT ($5,1 \pm 1,7\%$; $P \leq 0,05$) e CC ($3,9 \pm 1,1\%$; $P \leq 0,05$), assim como em relação aos HI ($6,6 \pm 1,9\%$; $P \leq 0,05$) (Figura 10c). Observamos também diferenças na frequência de células NKT DN, as quais foram detectadas em percentuais maiores pacientes CC ($21,3 \pm 4,0\%$), em comparação

aos HI ($12,8 \pm 5,4\%$, $P \leq 0,05$) (Figura 10d). As subpopulações NKT CD8⁺ e NKT CD4⁺ foram observadas em percentuais semelhantes em todos os grupos estudados.

Foram avaliados também os fenótipos das subpopulações de células NKT CD107a⁺ e observamos que estes variaram nos grupos estudados. Os pacientes BT e DT e os HI apresentaram maiores frequências de células NKT CD8⁺ CD107a⁺; enquanto nos pacientes CC esta frequência foi mais baixa, sendo detectadas neste grupo maiores proporções de células NKT CD4⁺ CD107a⁺ e NKT DN CD107a⁺ (Figura 10b). Na comparação das frequências das subpopulações de células NKT em degranulação entre os grupos estudados, nós observamos que os pacientes CC apresentaram menores percentuais de células NKT CD8⁺ CD107a⁺ em relação aos pacientes DT (Figura 10e). Os pacientes DT apresentaram maior frequência da subpopulação DN em degranulação em relação aos HI (Figura 10f). Ainda, os pacientes CC apresentaram menores percentuais de células NKT DP CD107a⁺ em comparação aos HI (Figura 10g).

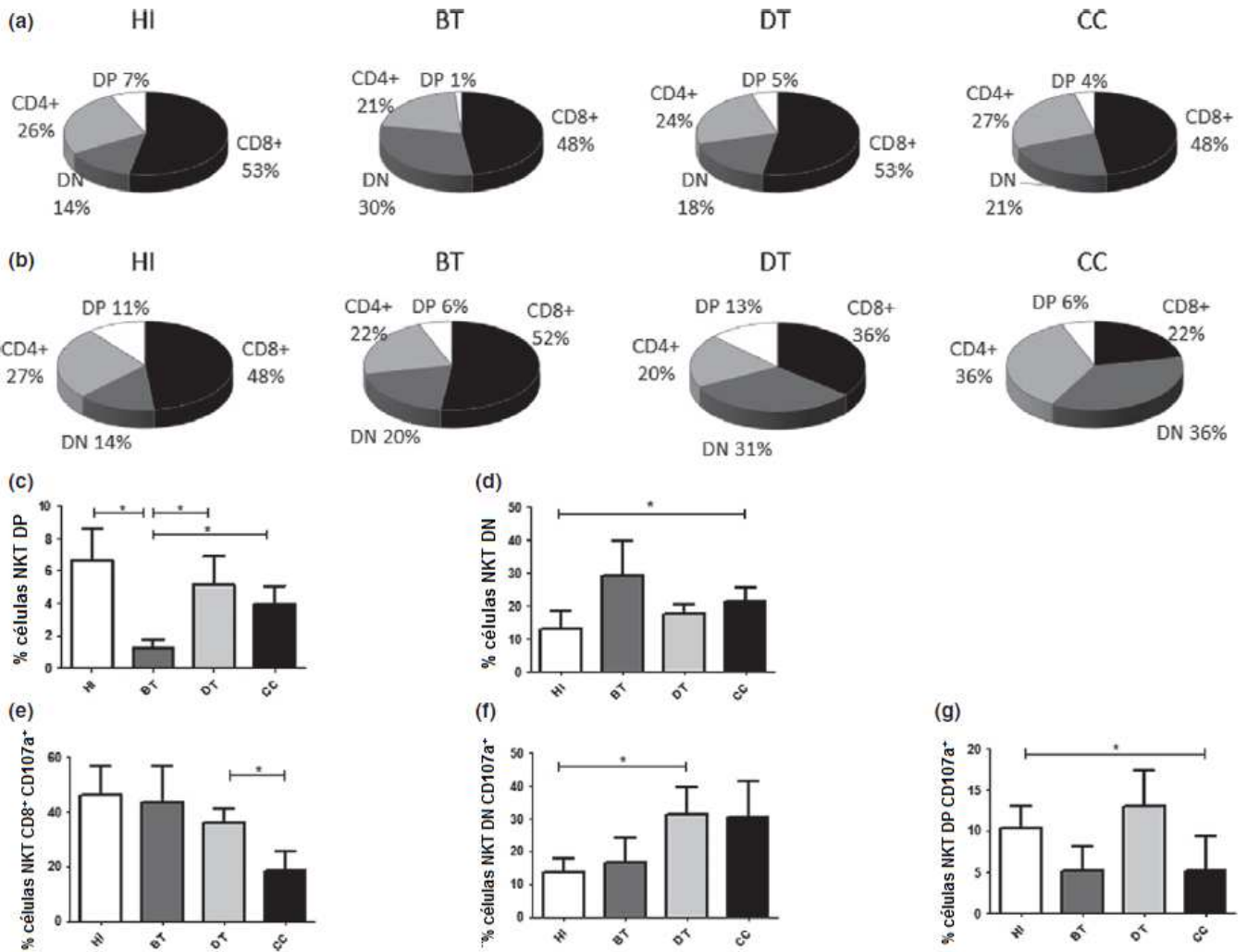


Figura 10. Análise da frequência e expressão de CD107a de subpopulações de células NKT. Os gráficos de setores mostram a média dos dados observados em HI, BT, DT e CC: frequência (a) e expressão de CD107a (b). Os gráficos de barras representam média \pm SEM da comparação entre grupos: frequência da subpopulação de células NKT DP (c); frequência da subpopulação NKT DN (d); frequência da subpopulação NKT CD8⁺ CD107a⁺ (e); frequência da subpopulação NKT DN CD107a⁺ (f); frequência da subpopulação NKT DP CD107a⁺ (g). HI (indivíduos saudáveis, do inglês *healthy individuals*; n = 11); BT (pacientes antes do tratamento, do inglês *before treatment*; n = 8); DT (pacientes durante o tratamento, do inglês *during treatment*; n = 8); CC (pacientes clinicamente curados, do inglês *clinically cured*; n = 8). As comparações estatísticas foram realizadas com o teste U de *Mann-Whitney*, onde * $P \leq 0,05$.

5.2. Parte 2 – Artigo II (Submetido; anexo 3)

Os resultados da segunda parte do estudo resultaram na redação do artigo II, submetido à Plos One. Neste artigo avaliamos, em ensaios *in vitro*, a resposta citotóxica específica aos antígenos de *Leishmania (V.) braziliensis*, assim como os perfis de ativação e exaustão de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺, células NK e NKT, obtidas de sangue periférico de pacientes de leishmaniose cutânea em diferentes estágios clínicos de evolução para a cura. As análises foram realizadas com base no protocolo citofluorimétrico ilustrado na figura 11.

5.2.1. Características dos pacientes.

As principais características clínico-epidemiológicas dos pacientes de LC estão descritas na tabela 5. A média de idade dos 24 pacientes de LC incluídos nesta etapa foi de $37 \pm 14,26$ anos e 79% (19) eram do sexo masculino. O número de lesões variou de um a cinco e a duração da doença de 15 a 330 dias. Os tamanhos das lesões foram variáveis, com diâmetros variando de 14 a 130 mm. A IDRM foi positiva em todos os pacientes testados.

5.2.2. Os antígenos de *L. (V.) braziliensis* induzem expansão das células T CD8⁺, NK e CD3⁺ CD56⁺ NKT e contração de linfócitos T CD4⁺ em pacientes de LC.

Com intuito de determinar a influência do *Lb*-Ag na frequência das células T CD8⁺, T CD4⁺, NK e CD3⁺CD56⁺ NKT dos pacientes de LC, nós avaliamos os percentuais dessas populações celulares sem estímulo antigênico (BG – *background*) e sob estimulação com *Lb*-Ag. Nós observamos nos pacientes AD maiores percentuais de células T CD8⁺, NK e CD3⁺CD56⁺ NKT após estimulação com *Lb*-Ag (média \pm erro padrão: $28,56 \pm 1,74\%$, $7,47 \pm 1,13\%$ e $3,86 \pm 0,72\%$, respectivamente) comparado às células não estimuladas [$27,43 \pm 1,76\%$ ($P \leq 0,01$); $6,51 \pm 1,09\%$ ($P \leq 0,5$); e $3,19 \pm 0,66\%$ ($P \leq 0,5$)] (Figura 12A-C). Em contraste, nos pacientes AD e DT, a estimulação antigênica induziu uma contração nos linfócitos T CD4⁺ ($68,24 \pm 3,55\%$ e $65,11 \pm 2,08\%$, respectivamente), quando comparados com os percentuais observados nas culturas não estimuladas [$70,50 \pm 3,38\%$ ($P \leq 0,01$); e $66,07 \pm 2,16\%$ ($P \leq 0,05$), respectivamente] (Figuras 12D e 12E). Os HI não

apresentaram alterações nas frequências de nenhuma população celular estudada devido à estimulação antigênica (dados não apresentados).

Tabela 5. Principais características clínico-epidemiológicas dos pacientes incluídos na segunda etapa do estudo.

<i>Paciente</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Sexo</i>	<i>Número de lesões</i>	<i>Duração da doença (dias)</i>	<i>Tamanho da lesão (maior diâmetro – mm)</i>	<i>IDRM (mm)</i>
1	22	M	1	40	34	24
2	56	F	1	60	36	36
3	24	M	1	90	45	n.d.
4	28	M	1	30	20	11
5	44	M	1	120	28	n.d.
6	29	M	1	120	50	n.d.
7	70	M	1	15	-	25
8	46	M	4	180	75	27
9	52	M	1	90	24	47
10	51	F	1	60	40	n.d.
11	32	F	1	120	130	n.d.
12	30	M	5	45	-	20
13	52	M	1	120	22	n.d.
14	31	M	1	330	47	n.d.
15	59	M	1	120	60	11
16	23	F	1	120	35	n.d.
17	31	M	1	150	58	19
18	19	M	1	60	22	18
19	26	M	4	60	-	n.d.
20	47	M	1	30	45	14
21	19	M	1	30	30	22
22	30	M	4	120	-	n.d.
23	25	M	1	-	14	n.d.
24	42	F	1	90	35	10

mm: milímetros; IDRM: Intradermorreação de Montenegro; M: sexo masculino; F: sexo feminino; n.d.: não determinado.

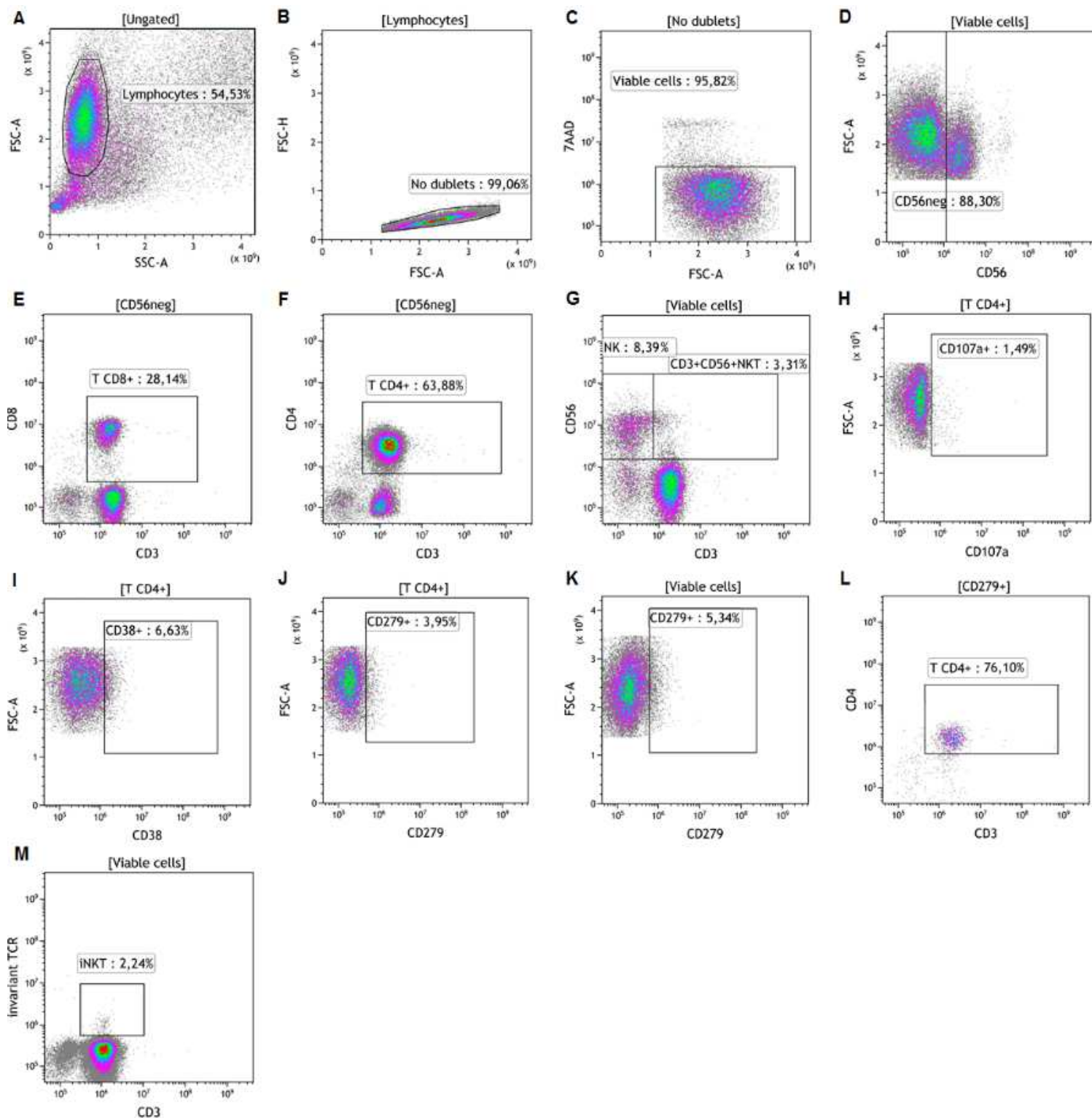


Figura 11. Protocolo citofluorimétrico representativo. As células mononucleares do sangue periférico foram marcadas com 7AAD, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD107a, anti-CD38 e anti-CD279, bem como com anti-V α 24J α 18-TCR em alguns casos. A região dos linfócitos (“Lymphocytes”) foi determinada com base no *dot-plot* morfológico de *forward scatter* (FSC-A) vs. *side scatter* (SSC-A) (A). Em seguida, as células delimitadas na região de “Linfócitos” foram analisadas através do *dot-plot* FSC-H vs. FSC-A, para exclusão de agregados celulares e debris (região “No doublets”) (B). As células viáveis foram então selecionadas com base na não-marcação de 7AAD (região “Viable cells”) (C). As populações de linfócitos T CD8⁺ e CD4⁺ foram definidas nos *dot-plots* CD8 vs. CD3 (E) e CD4 vs. CD3 (F), respectivamente, a partir da região de células viáveis CD56^{neg}, definidas pelo *dot-plot* FSC-A vs. CD56 (D). As populações de células NK e CD3⁺CD56⁺ NKT foram definidas através do *dot-plot* CD56 vs. CD3 (G), a partir da região de “Células viáveis”. As expressões de CD107a, CD38 e CD279 foram analisadas em *dot-plots* FSC-A vs. cada uma destas moléculas de interesse, a partir da região definida para cada população celular estudada – representada aqui para linfócitos T CD4⁺ (H-J), respectivamente. Uma outra estratégia de *gates* foi adotada para avaliar as proporções de cada população celular estudada com base na expressão total de CD107a, CD38 e CD279: a expressão total de cada molécula de interesse foi determinada a partir da região de “células

viáveis” (“*Viable Cells*”) – representado aqui a avaliação da expressão de CD279 (K); e então esta região (CD279⁺) foi utilizada para avaliar a proporção de cada população celular previamente definida – representado aqui pelos linfócitos T CD4⁺ com base na região de “CD279⁺” (L). Para algumas amostras, também foi realizada a análise de células NKT invariáveis (iNKT) através do *dot-plot* de CD3 vs. TCR invariante (Vα24Jα18-TCR) (L), a partir da região de células viáveis.

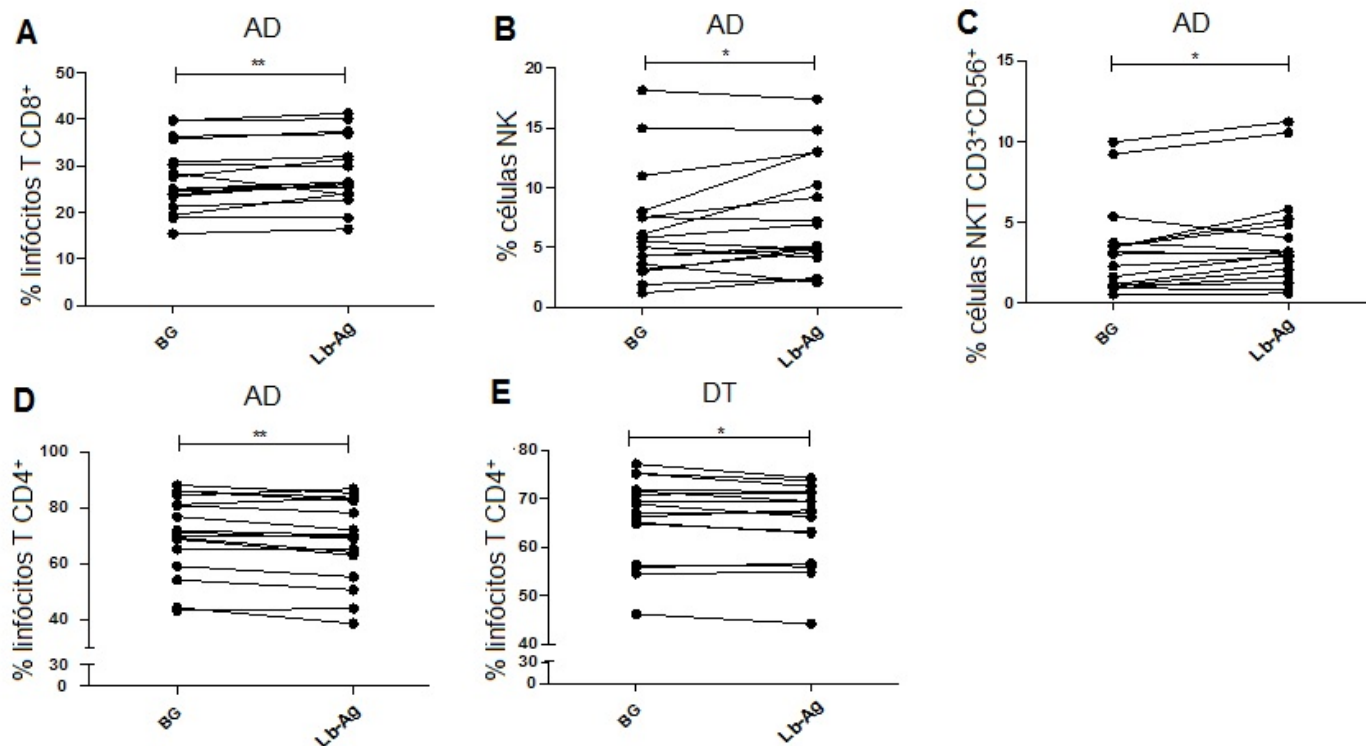


Figura 12. Comparação entre as células estimuladas com antígeno de *L. (V.) braziliensis* (*Lb-Ag*) e não estimuladas (*background* – BG): linfócitos T CD8⁺ (A), células NK (B) e células NKT CD3⁺CD56⁺ (C) de pacientes antes do tratamento (AD, do inglês *active disease*; n=17); e de linfócitos T CD4⁺ de pacientes antes do tratamento (AD, do inglês *active disease*; n=17) (D) e durante o tratamento (DT, do inglês *during treatment*; n = 16) (E). As linhas sólidas conectam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste pareado não-paramétrico de Wilcoxon. Os resultados foram considerados significativos quando P ≤ 0,05. * (P ≤ 0,05) ** (P ≤ 0,01).

5.2.3. A maioria das células NKT CD3⁺CD56⁺ não expressa TCR invariante.

As células NKT coexpressam receptores de células T (como CD3) juntamente com receptores associados à linhagem de células NK (como CD56, CD16 e / ou CD161). As células NKT reconhecem antígenos lipídicos apresentados via CD1d e são divididas em duas subpopulações principais de acordo com sua capacidade de reconhecimento antigênico: invariáveis (ou tipo I), que expressam um TCR invariante; e células NKT variantes ou do tipo II, que expressam TCR diverso. Deste modo, nós objetivamos verificar a proporção de células NKT CD3⁺CD56⁺ que expressam o TCR invariante Vα24-Jα18. Foi possível observar que apenas um baixo percentual de células NKT CD3⁺CD56⁺ expressaram o TCR Vα24-Jα18 (Figura 12M). Este dado foi observado tanto nos pacientes AD (BG: 0,81 ± 0,15%; *Lb-Ag*:

0,69 ± 0,22%) quanto nos HI (BG: 0,77 ± 0,12%; *Lb*-Ag: 0,59 ± 0,11%) e foi independente da estimulação (dados não mostrados).

5.2.4. Os antígenos de *L. (V.) braziliensis* induzem aumento de células T CD4⁺, NK e NKT CD3⁺CD56⁺ ativadas e em degranulação em todos os grupos de pacientes de LC.

Com o objetivo de verificar alterações nos perfis de ativação e degranulação de células envolvidas em uma resposta específica anti-*Leishmania*, nós analisamos as expressões CD38 e CD107a pelas células T CD8⁺, T CD4⁺, NK e NKT CD3⁺CD56⁺ em amostras de pacientes de LC, assim como de HI, na presença ou ausência de estímulo com *Lb*-Ag. Nós observamos nas culturas estimuladas com *Lb*-Ag frequências mais elevadas de células T CD4⁺ CD107a⁺, NK CD107a⁺ e NKT CD3⁺CD56⁺ CD107a⁺ de pacientes AD (0,52 ± 0,07%, 3,24 ± 0,52% e 2,96 ± 0,76%, respectivamente), DT (0,9 ± 0,19%, 5,12 ± 1,03% and 4,02 ± 0,9%, respectivamente) e CC (0,68 ± 0,08%, 5,75 ± 1,08% e 2,86 ± 0,66%, respectivamente), em comparação com as culturas não estimuladas de pacientes AD (0,38 ± 0,04%, P≤0,05; 1,87 ± 0,28%, P≤0,05; e 2,1 ± 0,66%, P≤0,05; respectivamente), DT (0,72 ± 0,19%, P≤0,01; 3,92 ± 1,06%, P≤0,05; e 2,33 ± 0,57%, P≤0,001; respectivamente) e CC (0,45 ± 0,04%, P≤0,01; 2,87 ± 0,7%, P≤0,01; e 1,61 ± 0,35%, P≤0,01; respectivamente) (Figura 13). É importante destacar que os HI não apresentaram alterações na expressão de CD107a em resposta a *Lb*-Ag (Figura 13).

De maneira semelhante, todos os grupos de pacientes de LC (AD, DT e CC) apresentaram maiores percentuais de células T CD4⁺, NK e NKT CD3⁺CD56⁺ ativadas em resposta ao *Lb*-Ag (AD: 15,21 ± 2,29%, 55,52 ± 5,73% e 19,69 ± 2,49%; DT: 20,68 ± 2,13%, 70,17 ± 4,92% e 23,95 ± 4,53%; CC: 16,67 ± 2,29%, 72,05 ± 3,63% e 26,7 ± 5,98%, respectivamente) em comparação com as células não estimuladas [AD: 13,46 ± 2,22% (P≤0,05), 49,03 ± 5,78% (P≤0,05) e 15,33 ± 2,46% (P≤0,001); DT: 18,23 ± 2,2% (P≤0,001), 65,37 ± 4,53% (P≤0,05) e 18,82 ± 3,69% (P≤0,001); CC: 13,32 ± 2,11% (P≤0,001), 58,07 ± 6,88% (P≤0,001) e 23,01 ± 5,42% (P≤0,05); respectivamente] (Figura 14A). Os HI não apresentaram alterações na expressão de CD38 devido à estimulação antigênica por nenhuma população celular estudada (Figura 14A).

Em relação aos linfócitos T CD8⁺, não foram observadas diferenças na frequência de expressão de CD107a entre as células não estimuladas e estimuladas com *Lb-Ag* dos pacientes de LC, assim como dos HI (dados não mostrados). Em relação aos seus percentuais de ativação, foi possível observar que o *Lb-Ag* induziu aumento da frequência de linfócitos T CD8⁺ CD38⁺ dos pacientes DT (11,65 ± 1,81%) em comparação às culturas não estimuladas (9,25 ± 1,68%, P ≤ 0,05) (Figura 14B). Os pacientes AD e CC, assim como os HI, não apresentaram alterações nos percentuais de linfócitos T CD8⁺ CD38⁺ em resposta à estimulação antigênica (dados não mostrados).

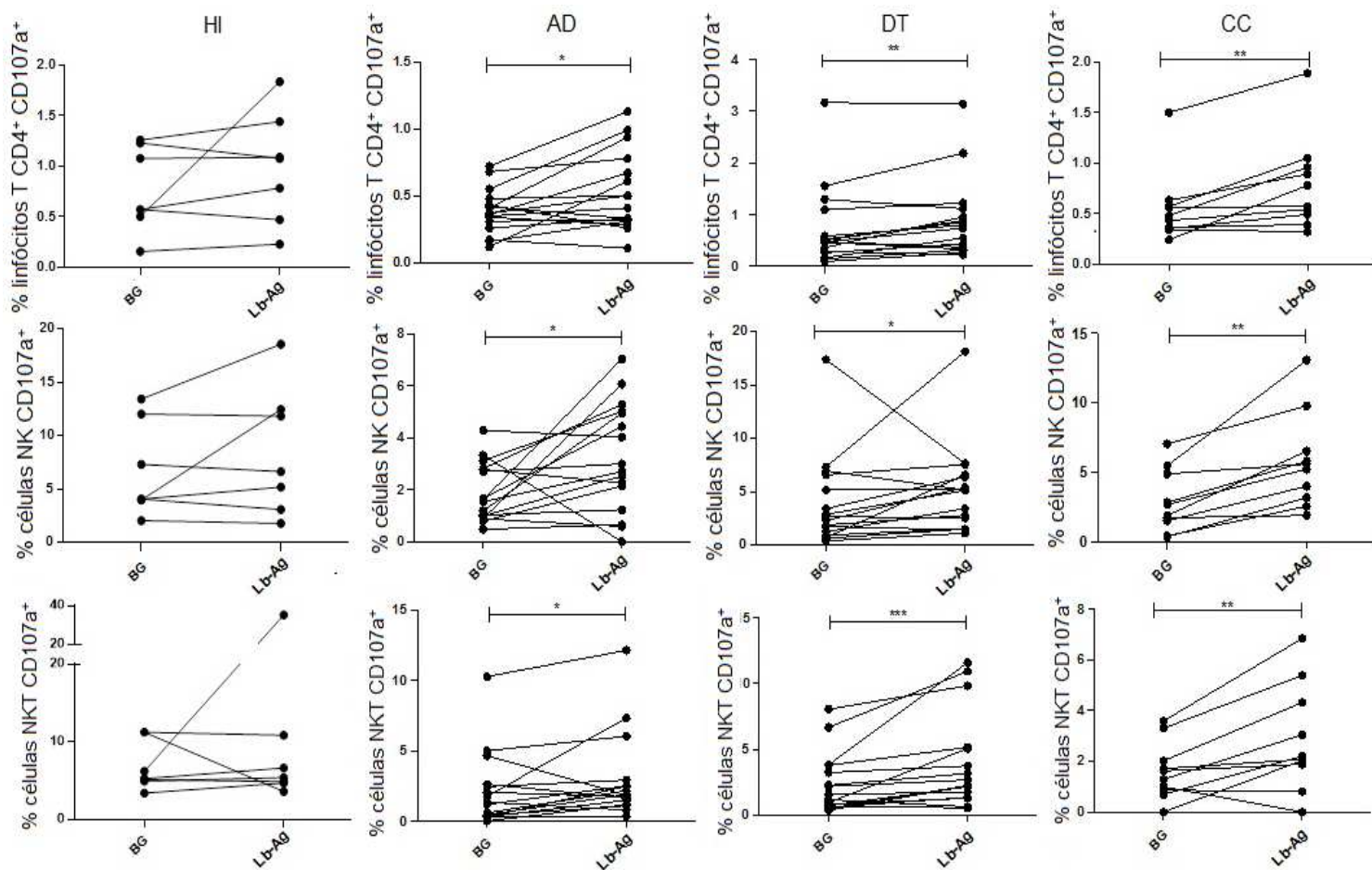


Figura 13. Comparação da expressão de CD107a pelas células T CD4⁺, NK e NKT CD3⁺CD56⁺ estimuladas (*Lb-Ag*) e não estimuladas (BG – *background*) dos pacientes com a doença ativa (AD, do inglês *active disease*; n=16), durante o tratamento (DT, do inglês *during treatment*; n=16) e curados (CC, do inglês *clinically cured*; n=10). As linhas sólidas conectam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste pareado não-paramétrico de Wilcoxon. Os resultados foram considerados significativos quando P ≤ 0,05. *(P ≤ 0,05) ** (P ≤ 0,01) *** (P ≤ 0,001).

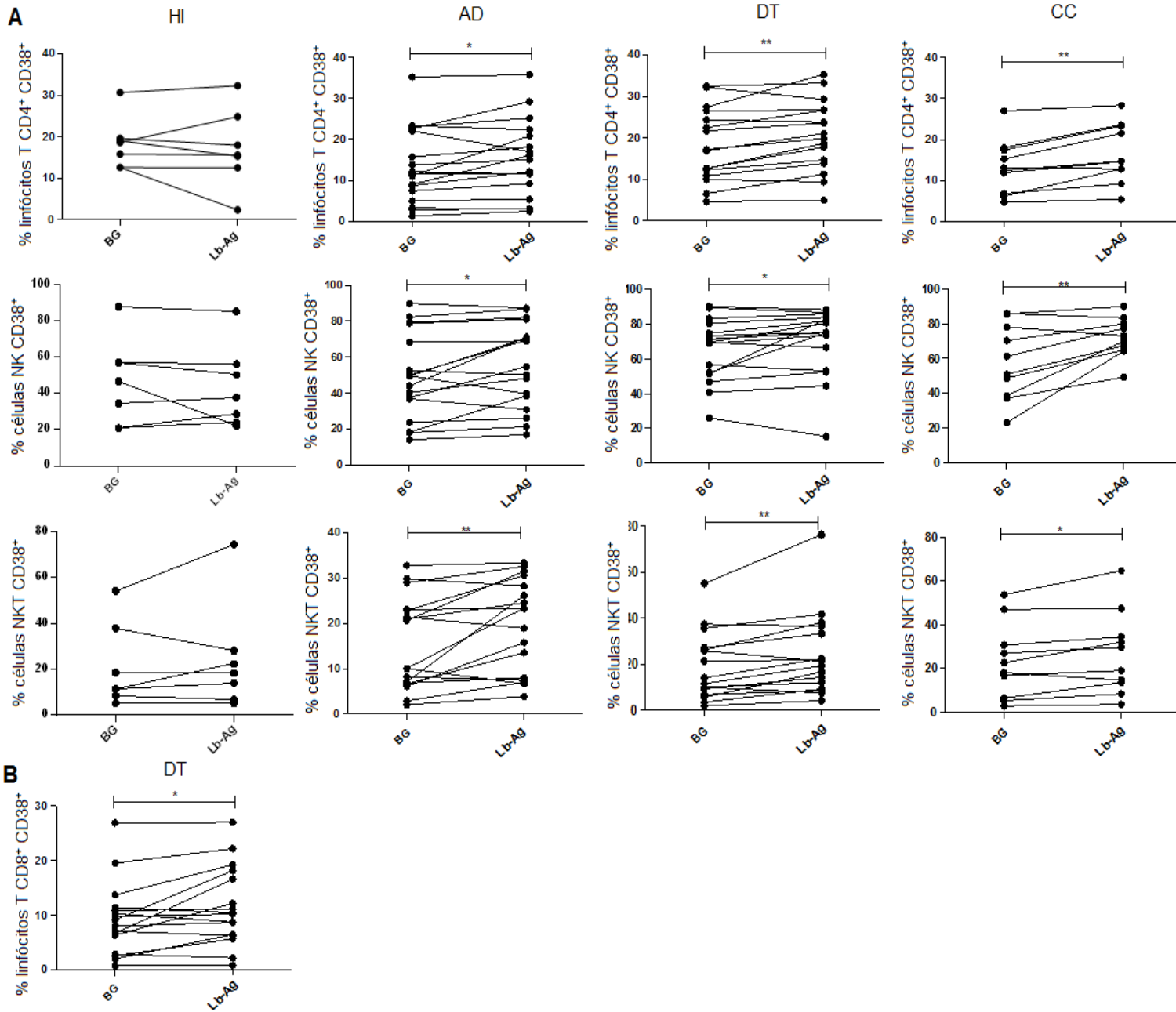


Figura 14. Comparação entre as culturas estimuladas (*Lb-Ag*) e não estimuladas (*BG* – *background*) em relação à expressão de CD38 pelos: linfócitos T CD4⁺, células NK e NKT CD3⁺CD56⁺ dos pacientes com a doença ativa (*AD*, do inglês *active disease*; n=17), durante o tratamento (*DT*, do inglês *during treatment*; n=16) e curados (*CC*, do inglês *clinically cured*; n=10) (A); e pelos linfócitos T CD8⁺ dos pacientes durante o tratamento (*DT*, do inglês *during treatment*; n=16) (B). As linhas sólidas conectam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste pareado não-paramétrico de Wilcoxon. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. *($P \leq 0,05$) **($P \leq 0,01$)

5.2.5. Os antígenos de *L. (V.) braziliensis* induzem a exaustão de células NK nos pacientes de LC.

A expressão de CD279 foi analisada para verificar se o *Lb-Ag* induz exaustão celular durante as diferentes fases clínicas da LC. A análise da exaustão celular foi realizada comparando os percentuais de células CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK e NKT CD3⁺CD56⁺ que expressam CD279 sem estimulação antigênica com àquelas estimuladas com o *Lb-Ag*. Nós observamos maior frequência de células NK CD279⁺ após estimulação antigênica em todos os grupos de pacientes de LC (AD: 6,17 ± 1,7%, DT: 6,06 ± 1,26%, CC: 7,33 ± 1,55%) em comparação aos percentuais detectados nas culturas não estimuladas (AD: 4,22 ± 1,27%, P≤0,01; DT: 4,34 ± 1,1%, P≤0,05; CC: 3,42 ± 1,05%, P≤0,01) (Figura 15A). Nas culturas estimuladas com *Lb-Ag*, também foi observada maior frequência de linfócitos T CD8⁺ CD279⁺ nos pacientes DT (5,04 ± 1,38%) e de células NKT CD3⁺CD56⁺ CD279⁺ nos pacientes CC (10,85 ± 3,83%) quando comparadas às células sem estimulação antigênica (4,18 ± 1,15% e 7,29 ± 2,75%, respectivamente) (P≤0,05) (Figura 15B). Os HI não apresentaram alterações nos percentuais de expressão de CD279 por nenhuma população celular estudada em resposta ao estímulo com *Lb-Ag* (dados não mostrados).

5.2.6. Os linfócitos T CD4⁺ representam a maior proporção de células que expressam os biomarcadores CD107a, CD38 e CD279.

Utilizando uma outra estratégia de análise citofluorimétrica, nós avaliamos qual população celular seria mais relevante na função citotóxica e qual representaria a maior parte das células que expressam CD38 e CD279 nas diferentes fases clínicas da LC. Através desta abordagem, nós determinamos a expressão total de CD107a, CD38 e CD279 com base na região de linfócitos viáveis (Figura 11) e depois verificamos qual o percentual que cada população celular estudada representa. Desta forma, foi possível observar em todos os grupos estudados (tanto nos pacientes LC quanto nos HI) e independentemente da estimulação antigênica que os linfócitos T CD4⁺ constituíram a maioria das células que expressam CD107a, CD38 e CD279. Com relação à expressão total de CD107a, CD38 e CD279, os perfis de expressão foi mantido em todos os grupos estudados e independentemente do estímulo com *Lb-Ag*: os linfócitos T CD4⁺ representaram a

maioria, células T CD8⁺ e NK constituíram percentuais intermediários e semelhantes e as células NKT CD3⁺CD56⁺ representaram a menor proporção.

A Figura 16 ilustra os resultados da expressão total de CD107a após estimulação com *Lb*-Ag obtidos dos HI (linfócitos T CD4⁺: 42,37 ± 3,55%, linfócitos T CD8⁺: 15,40 ± 2,81%, células NK: 13,7 ± 2,12% e células NKT CD3⁺CD56⁺: 5,13 ± 1,35%) (Figura 16A) e dos pacientes AD (linfócitos T CD4⁺: 36,14 ± 5,18%, linfócitos T CD8⁺: 17,51 ± 4,0%, células NK: 17,78 ± 3,60% e células NKT CD3⁺CD56⁺: 7,44 ± 1,72%) (Figura 16B); bem como a expressão total de CD38 observada nos HI (linfócitos T CD4⁺: 55,1 ± 1,91%, linfócitos T CD8⁺: 15,25 ± 1,50%, células NK: 22,88 ± 5,85% e células NKT CD3⁺CD56⁺: 3,94 ± 1,57%) (Figura 16C) e pacientes AD (linfócitos T CD4⁺: 51,65 ± 3,24%, linfócitos T CD8⁺: 12,89 ± 1,23%, células NK: 18,95 ± 2,76% e células NKT CD3⁺CD56⁺: 6,17 ± 2,47%) (Figura 16D); e a expressão total de CD279 observada nos HI (linfócitos T CD4⁺: 44,79 ± 2,91%, linfócitos T CD8⁺: 21,88 ± 1,80%, células NK: 25,56 ± 7,10% e células NKT CD3⁺CD56⁺: 4,21 ± 0,69%) (Figura 16E) e pacientes AD (linfócitos T CD4⁺: 48,41 ± 3,47%, linfócitos T CD8⁺: 23,88 ± 2,04%, células NK: 19,14 ± 3,66% e células NKT CD3⁺CD56⁺: 6,35 ± 2,18%) (Figura 16F).

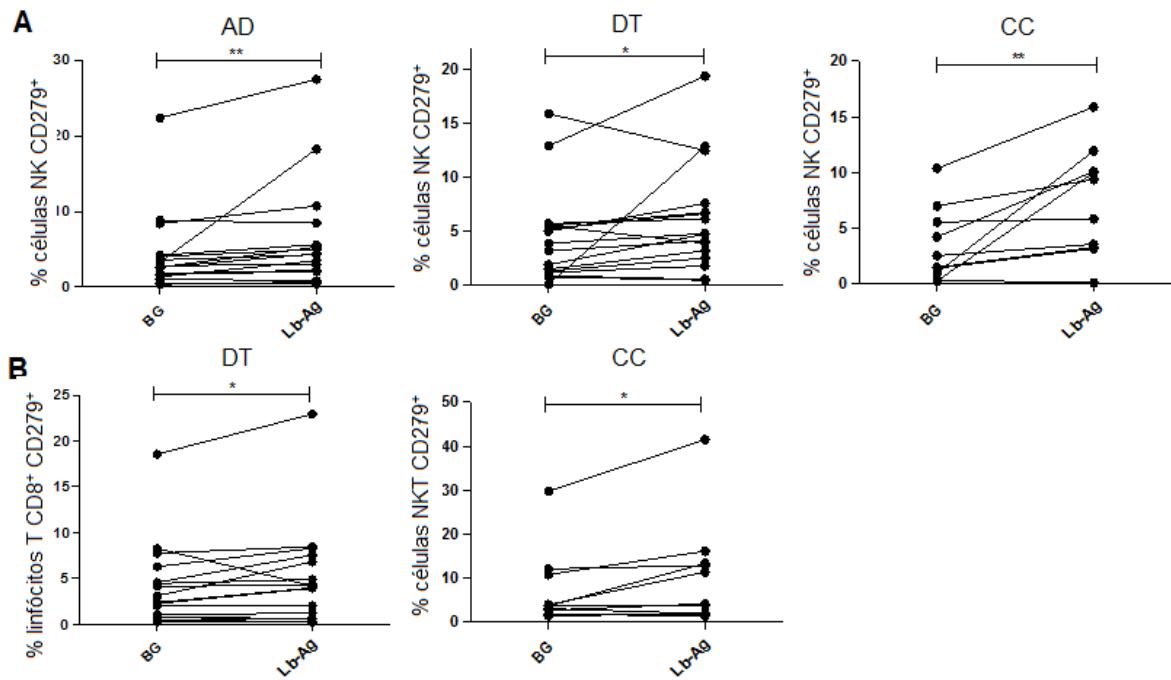


Figura 15. Comparação da expressão de CD279 entre as células estimuladas (*Lb-Ag*) e não estimuladas (*BG* – *background*): (A) células NK de pacientes com a doença ativa (*AD*, do inglês *active disease*; $n=17$), durante o tratamento (*DT*, do inglês *during treatment*; $n=16$) e curados (*CC*, do inglês *clinically cured*; $n=10$); (B) linfócitos T CD8⁺ de pacientes durante o tratamento (*DT*, do inglês *during treatment*; $n=16$) e células NKT CD3⁺CD56⁺ de pacientes curados (*CC*, do inglês *clinically cured*; $n=10$). As linhas sólidas conectam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. As análises estatísticas foram realizadas pelo teste pareado não-paramétrico de Wilcoxon. Os resultados foram considerados significativos quando $P \leq 0,05$. *($P \leq 0,05$) **($P \leq 0,01$)

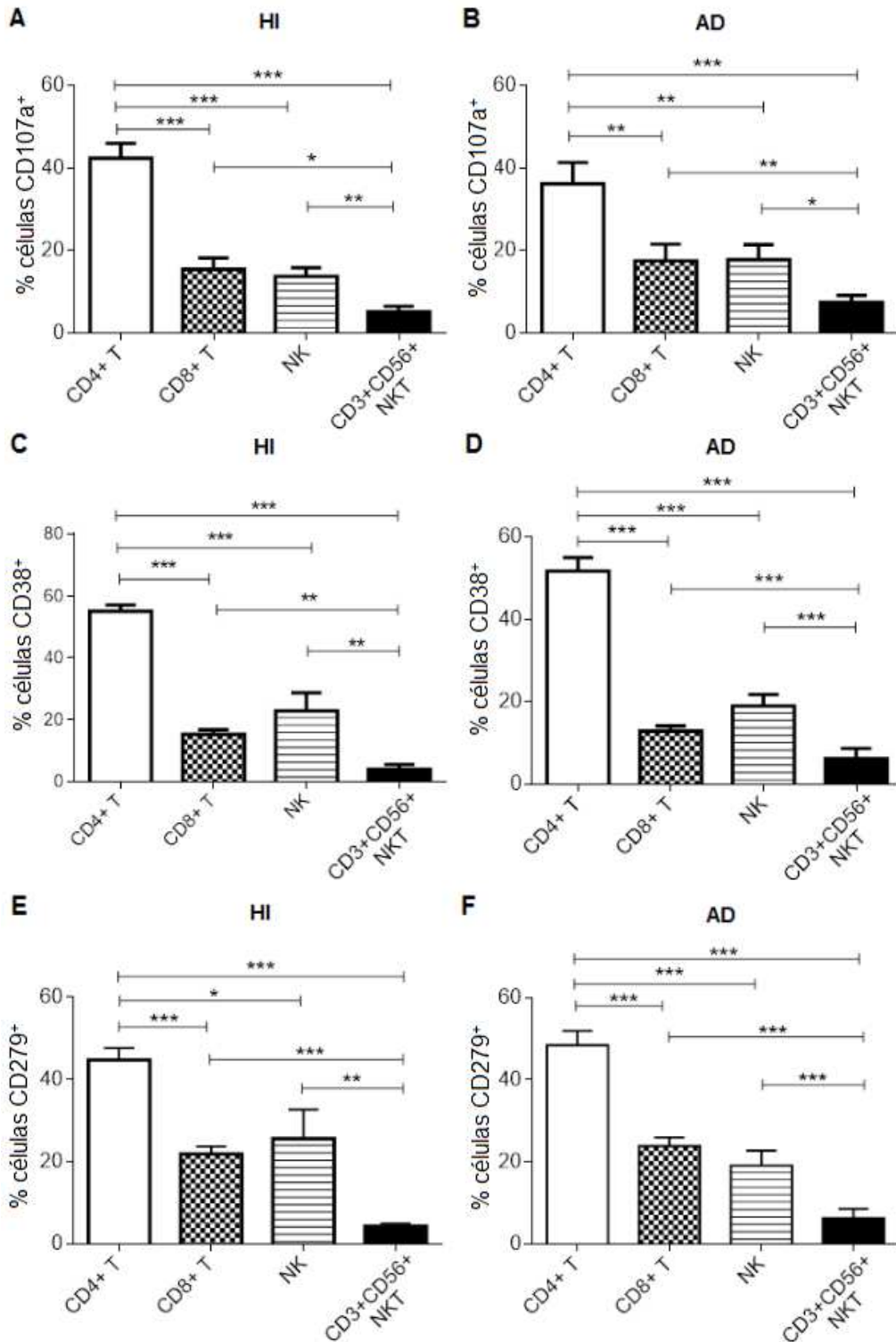


Figura 16. Expressão total de CD107a, CD38 e CD279. Gráficos de barras representando a média dos percentuais (\pm erro padrão) de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, células NK e NKT CD3⁺CD56⁺ com base na análise da expressão total de CD107a (A-B), CD38 (C-D) e CD279 (E-F). Os resultados foram obtidos de indivíduos saudáveis (HI, do inglês *healthy individuals*; n=7) e de pacientes com a doença ativa (AD, do inglês *active disease*; n=17). As comparações estatísticas foram realizadas com o teste U de *Mann-Whitney*, onde *P \leq 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001.

5.3. Parte 3

A terceira parte do trabalho é referente aos resultados que ainda não foram submetidos para publicação.

5.3.1. Expressão de CLA

Nos ensaios experimentais *in vitro*, as CMSP foram submetidas à marcação com o AcMo anti-CLA, além da marcação com 7AAD e com os AcMo anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD107a, anti-CD38 e anti-CD279, conforme descrito no item 4.5. Através deste painel citofluorimétrico, foi então possível avaliar a frequência das quatro populações celulares potencialmente citotóxicas de interesse – linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, células NK e NKT – e seus percentuais de expressão de CD107a, CD38, CD279 e CLA. Nesta etapa, serão descritos apenas os resultados referentes à expressão de CLA nos ensaios *in vitro*.

Não foi possível observar diferenças nos percentuais de expressão de CLA por nenhuma população celular estudada na comparação entre as culturas não estimuladas (*background* – BG) e estimuladas com o antígeno de *L. (V.) braziliensis* (*Lb-Ag*) oriundas dos pacientes com a doença ativa (AD), sob a terapia antimonial (DT) e clinicamente curados (CC), assim como de indivíduos sadios (HI). Os linfócitos T CD4⁺ apresentaram percentuais de expressão de CLA similares no BG e *Lb-Ag* nos pacientes AD (média ± erro padrão; 16,27 ± 1,55% e 15,13 ± 1,25%, respectivamente), DT (21,58 ± 1,44% e 20,37 ± 1,55%, respectivamente) e CC (23,58 ± 2,47% e 23,80 ± 1,99%, respectivamente), assim como nos HI (10,55 ± 4,94% e 12,85 ± 4,69%, respectivamente) (Figura 17). Da mesma forma, os linfócitos T CD8⁺ também apresentaram percentuais de expressão de CLA similares no BG e *Lb-Ag* nos pacientes AD (7,22 ± 0,96% e 7,64 ± 0,89%, respectivamente), DT (9,45 ± 1,30% e 9,23 ± 1,14%, respectivamente) e CC (10,53 ± 1,53% e 11,95 ± 1,41%, respectivamente) e nos HI (4,64 ± 2,26% e 6,31 ± 2,33%, respectivamente) (Figura 18), assim como as células NK (AD: 17,21 ± 2,75% e 17,71 ± 2,64%, respectivamente; DT: 17,11 ± 3,48% e 18,16 ± 3,59%, respectivamente; CC: 15,99 ± 3,01% e 19,08 ± 3,70%, respectivamente; HI: 12,56 ± 6,11% e 17,93 ± 6,99%, respectivamente) (Figura 19) e NKT (AD: 20,18 ± 4,28% e 21,27 ± 3,39%, respectivamente; DT: 18,54 ± 4,02% e 20,73 ± 5,03%, respectivamente; CC: 25,99 ±

7,23% e $27,04 \pm 7,22\%$, respectivamente; HI: $9,64 \pm 4,55\%$ e $13,20 \pm 5,33\%$, respectivamente) (Figura 20).

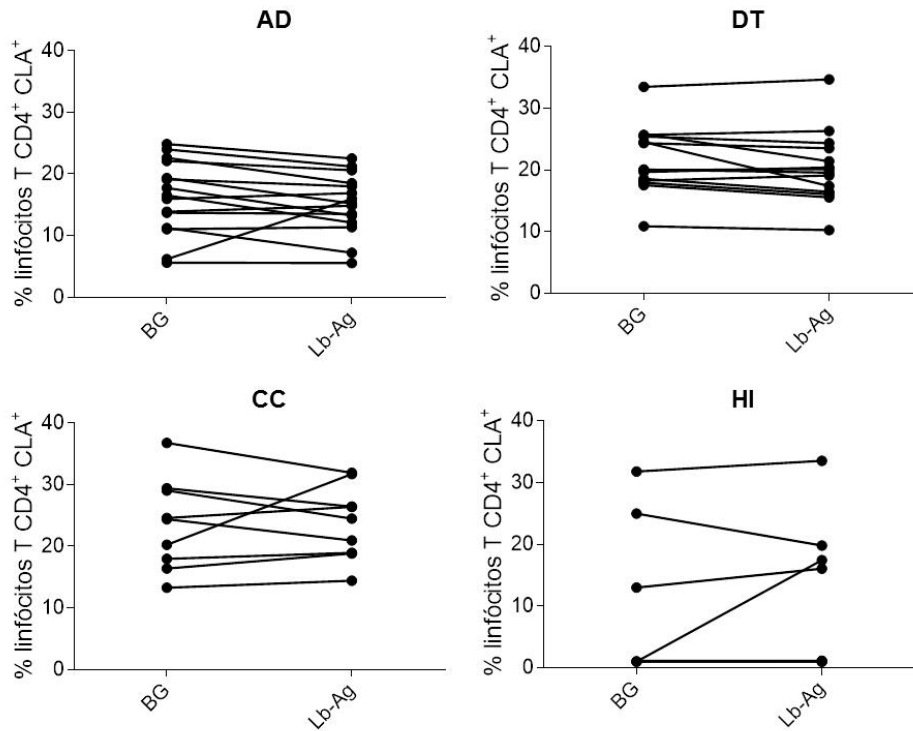


Figura 17. Percentual de linfócitos T CD4⁺ CLA⁺ nas culturas não estimuladas (BG: *background*) e estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) de pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: *active disease*; n=15), sob a terapia antimonial (DT: *during therapy*; n=14) e clinicamente curados (CC: *clinical cure*; n=9) e de indivíduos saudáveis (HI: *healthy individuals*; n=7). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de P>0,05, obtido pelo teste pareado não-paramétrico de *Wilcoxon*.

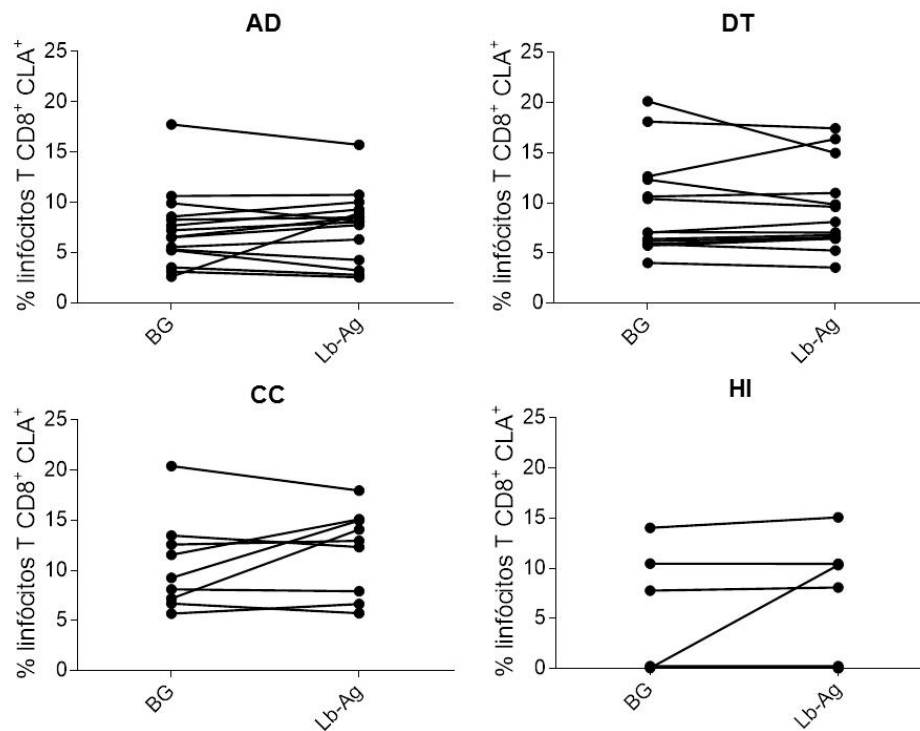


Figura 18. Percentual de linfócitos T CD8⁺ CLA⁺ nas culturas não estimuladas (BG: *background*) e estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) de pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: *active disease*; n=15), sob a terapia antimonial (DT: *during therapy*; n=14) e clinicamente curados (CC: *clinical cure*; n=9) e de indivíduos saudáveis (HI: *healthy individuals*; n=7). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de P>0,05, obtido pelo teste pareado não-paramétrico de *Wilcoxon*.

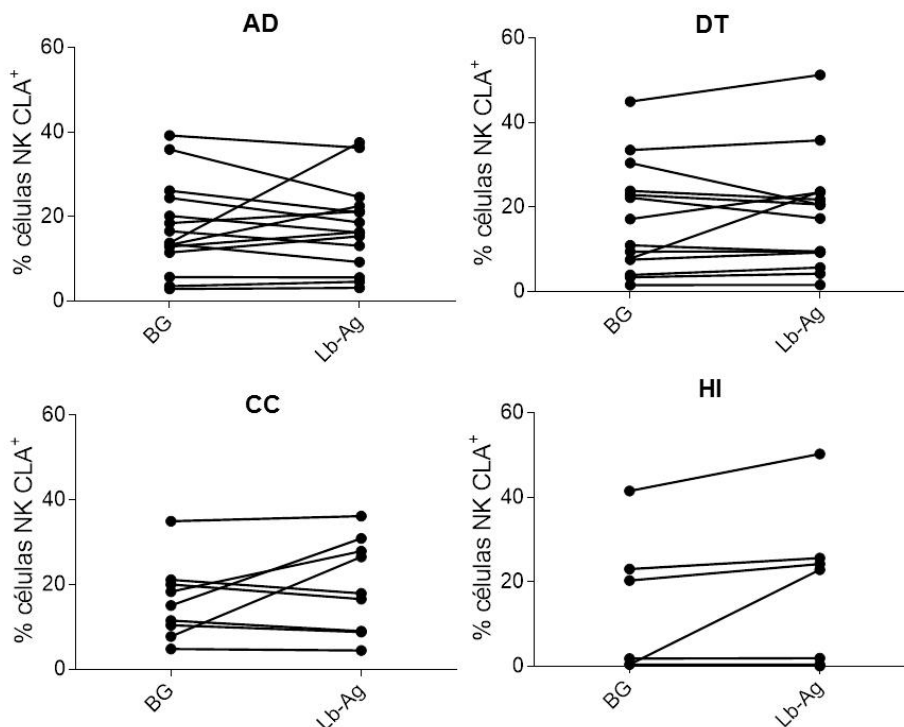


Figura 19. Percentual de células NK CLA⁺ nas culturas não estimuladas (BG: *background*) e estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) de pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: *active disease*; n=15), sob a terapia antimonial (DT: *during therapy*; n=14) e clinicamente curados (CC: *clinical cure*; n=9) e de indivíduos saudáveis (HI: *healthy individuals*; n=7). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de P>0,05, obtido pelo teste pareado não-paramétrico de *Wilcoxon*.

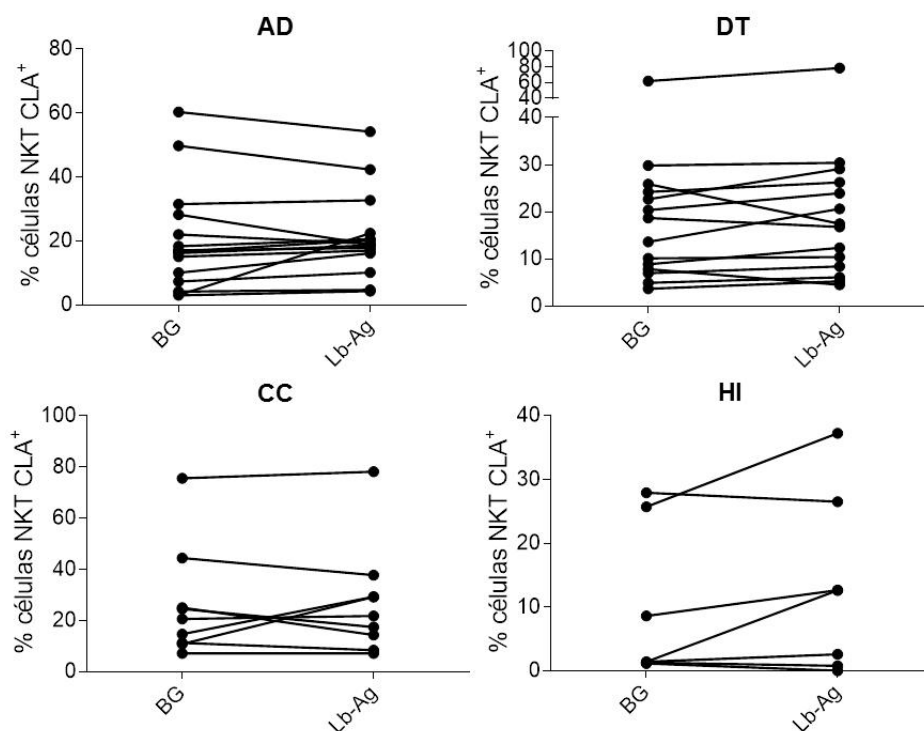


Figura 20. Percentual de células NKT CLA⁺ nas culturas não estimuladas (BG: *background*) e estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) de pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: *active disease*; n=15), sob a terapia antimonial (DT: *during therapy*; n=14) e clinicamente curados (CC: *clinical cure*; n=9) e de indivíduos saudáveis (HI: *healthy individuals*; n=7). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de P>0,05, obtido pelo teste pareado não-paramétrico de *Wilcoxon*.

Através de outra estratégia de análise citofluorimétrica, foi avaliada a expressão total de CLA a partir do *gate* de células viáveis (Figura 11). A partir da expressão total de CLA, então, foram verificados os percentuais expressos por cada população celular de interesse (células T CD8⁺, T CD4⁺, NK e NKT). Desta forma, foi possível determinar a proporção que cada população celular representa no 100% de expressão de CLA. Foi verificado que os linfócitos T CD4⁺ representam a maior parte das células que expressam CLA em todos os grupos estudados e independente da estimulação antigênica, enquanto as células NK e NKT representam as menores proporções. As figuras 21-24 apresentam os resultados de expressão de CLA a partir do *gate* de expressão total, ou seja, 100% de expressão, de CLA em proporção (gráficos de pizza) e em média ± erro padrão (gráfico de barras) pelos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, células NK e NKT, estimulados com o Lb-Ag e não estimulados (BG – *background*) nos grupos estudados. Nos pacientes AD, os linfócitos T CD4⁺, tanto nas culturas estimuladas com Lb-Ag como nas não estimuladas, representam a maior parte das células que expressam CLA (P≤0,001)

(69,12 ± 3,42% e 72,48 ± 3,48%, respectivamente), seguidos em menores percentuais pelos linfócitos T CD8⁺ (16,59 ± 1,29% e 14,91 ± 1,31%, respectivamente), células NK (10,96 ± 2,34% e 9,33 ± 2,27%, respectivamente) e NKT (4,68 ± 0,77% e 3,43 ± 0,70%, respectivamente) (Figura 21). Os pacientes DT possuem, tanto nas culturas estimuladas com *Lb*-Ag quanto nas não estimuladas, os linfócitos T CD4⁺ como as células majoritárias na expressão de CLA (P≤0,001) (69,20 ± 3,29% e 71,29 ± 3,46%, respectivamente), os linfócitos T CD8⁺ representando uma população intermediária (17,89 ± 1,22% e 16,79 ± 1,23%, respectivamente) e as células NK (7,58 ± 2,80% e 7,11 ± 3,08%, respectivamente) e NKT (4,64 ± 0,68% e 3,91 ± 0,68%, respectivamente) com os menores percentuais (Figura 22). Da mesma forma, tanto sob estímulo antigênico quanto sem estimulação, a maior parte de células que expressam CLA nos pacientes CC corresponde aos os linfócitos T CD4⁺ (P≤0,001) (68,88 ± 4,36% e 71,12 ± 4,73%, respectivamente), enquanto as menores correspondem às células NK (7,21 ± 3,96% e 6,81 ± 4,06%, respectivamente) e NKT (4,42 ± 1,28% e 3,05 ± 0,90%, respectivamente); e os linfócitos T CD8⁺ representam percentuais intermediários (17,67 ± 2,08% e 15,81 ± 1,98%, respectivamente) (Figura 23). Nos HI foi possível observar a mesma distribuição observada nos grupos de pacientes nas culturas estimuladas com o *Lb*-Ag: os linfócitos T CD4⁺ representando a maior parte das células que expressam CLA (P≤0,01) (56,35 ± 4,73%), seguidos em menores percentuais pelos linfócitos T CD8⁺ (23,70 ± 1,82%), células NK (14,52 ± 3,55) e NKT (4,14 ± 1,81%). Nas células não estimuladas dos HI, entretanto, os percentuais de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ que expressam CLA são similares (42,09 ± 7,44% e 32,69 ± 3,45%, respectivamente), as células NKT representam os menores percentuais de células que expressam CLA (4,99 ± 1,22%) e as células NK representam uma população intermediária (16,78 ± 3,09%) (Figura 24).

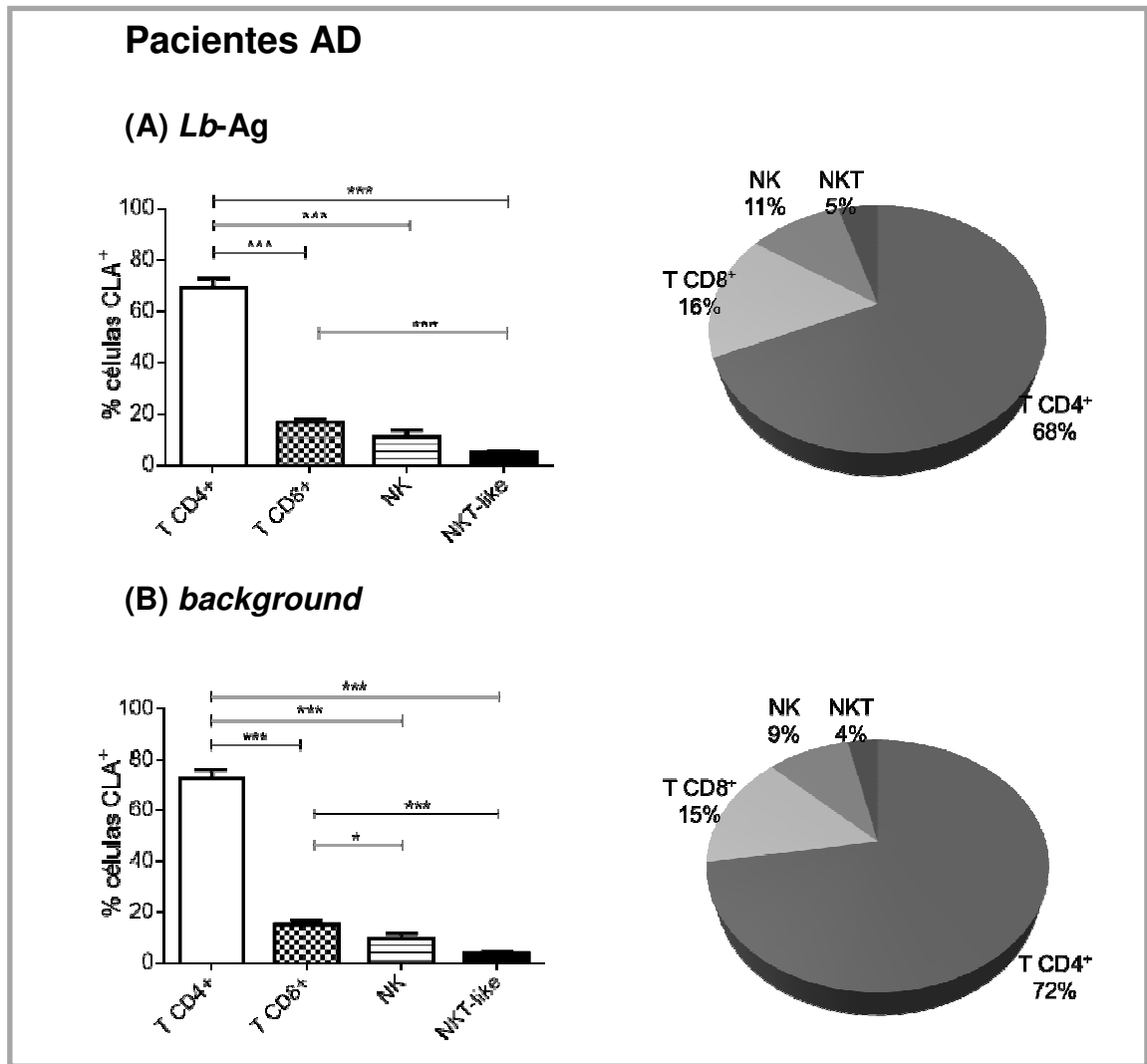


Figura 21. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD, active disease) (n=15). Resultados representativos das (A) culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* (Lb-Ag) e (B) sem estímulo. Gráfico de barras representando média \pm erro padrão, onde * $P \leq 0,05$ e *** $P \leq 0,001$. Valor de p obtido pelo teste estatístico não-paramétrico Mann-Whitney. Nos gráficos de setores estão representadas as proporções de cada população celular baseadas nas médias percentuais de expressão de CLA.

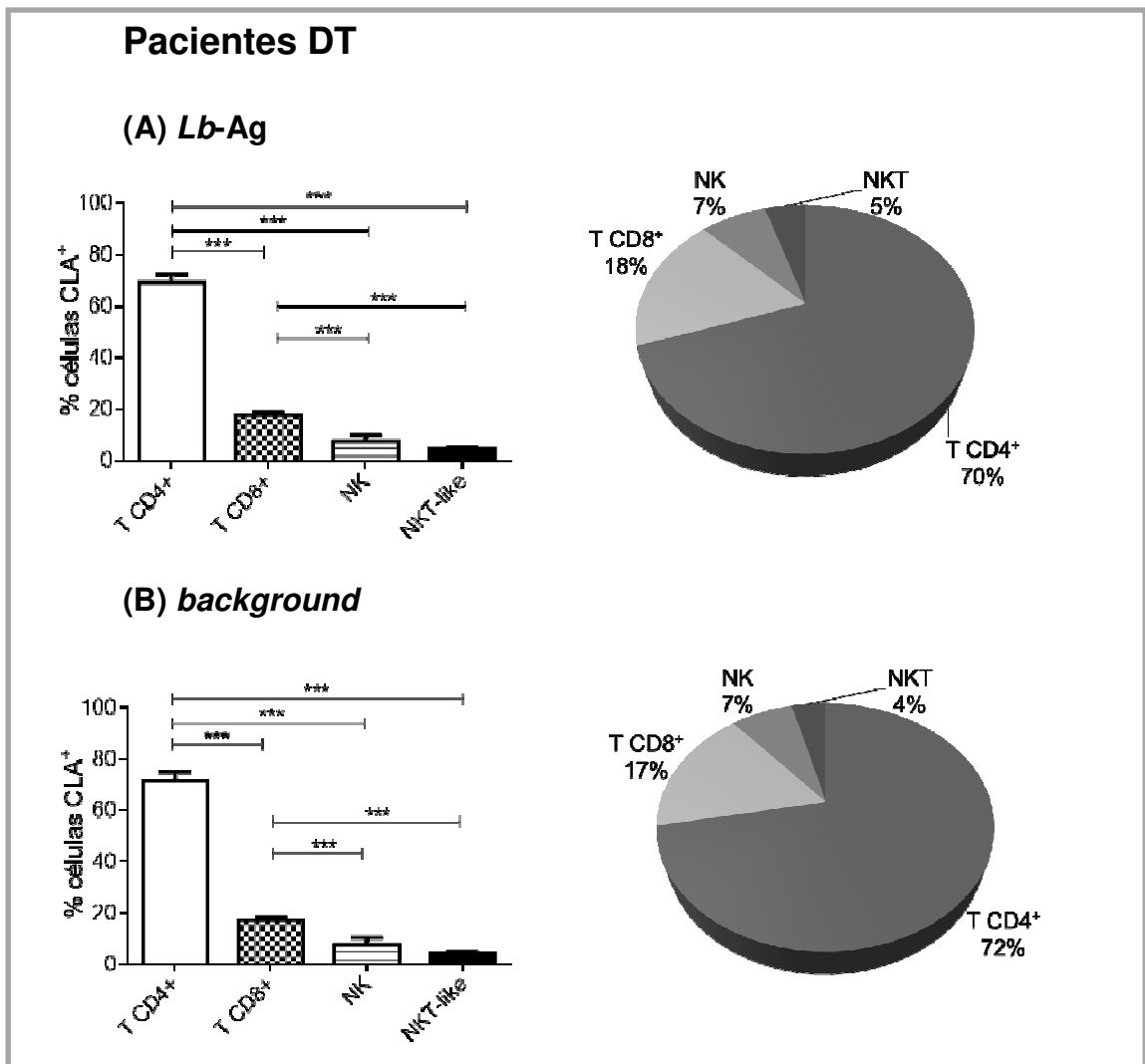


Figura 22. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em pacientes sob a terapia antimonial (DT, *during therapy*) (n=14). Resultados representativos das (A) culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* (*Lb*-Ag) e (B) sem estímulo. Gráfico de barras representando média \pm erro padrão, onde *** $P \leq 0,001$. Valor de p obtido pelo teste estatístico não-paramétrico *Mann-Whitney*. Nos gráficos de setores estão representadas as proporções de cada população celular baseadas nas médias percentuais de expressão de CLA.

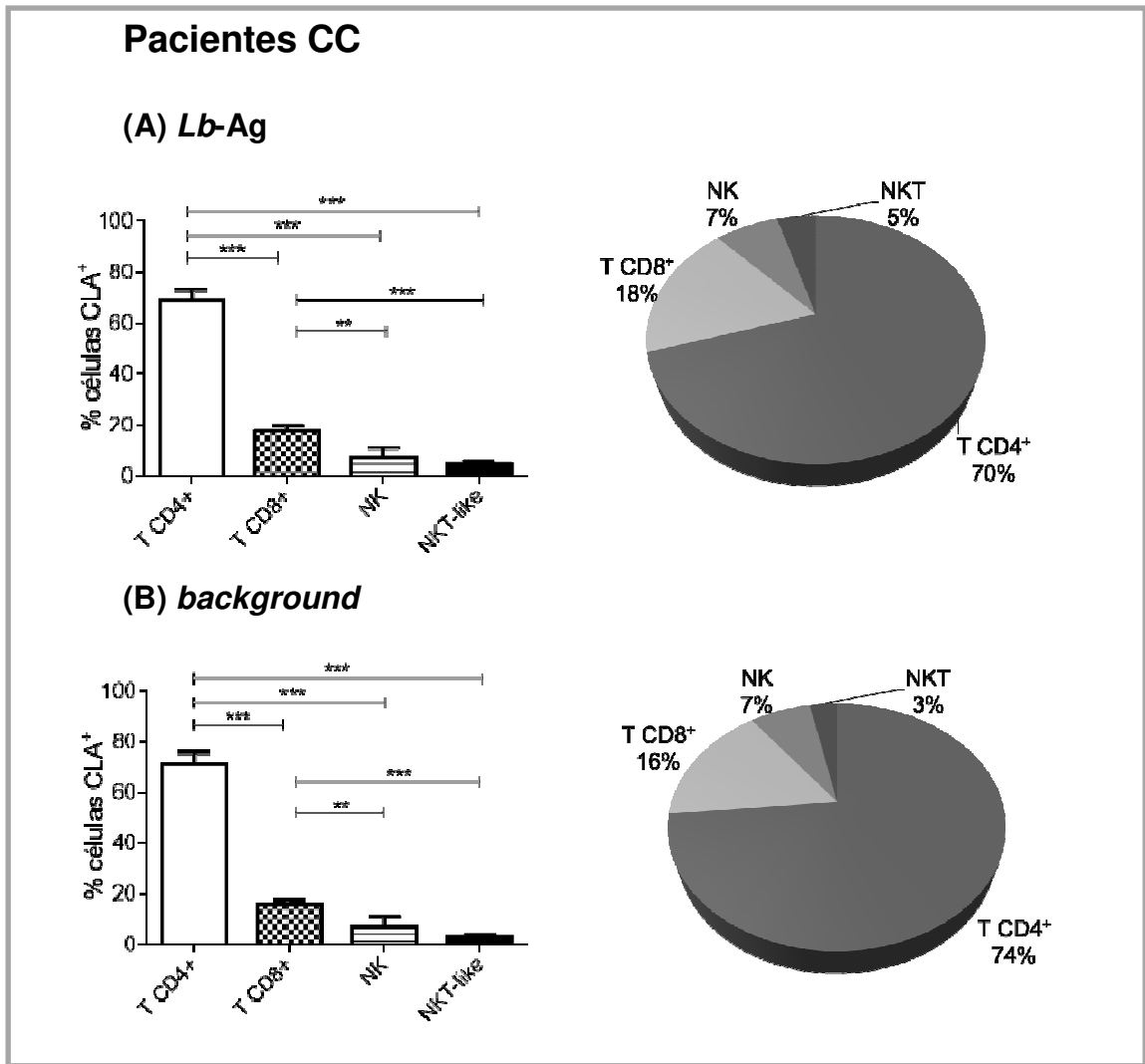


Figura 23. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em pacientes com cura clínica (CC, *clinical cure*) (n=9). Resultados representativos das (A) culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* (*Lb*-Ag) e (B) sem estímulo. Gráfico de barras representando média \pm erro padrão, onde $**P \leq 0,01$ e $***P \leq 0,001$. Valor de p obtido pelo teste estatístico não-paramétrico *Mann-Whitney*. Nos gráficos de setores estão representadas as proporções de cada população celular baseadas nas médias percentuais de expressão de CLA.

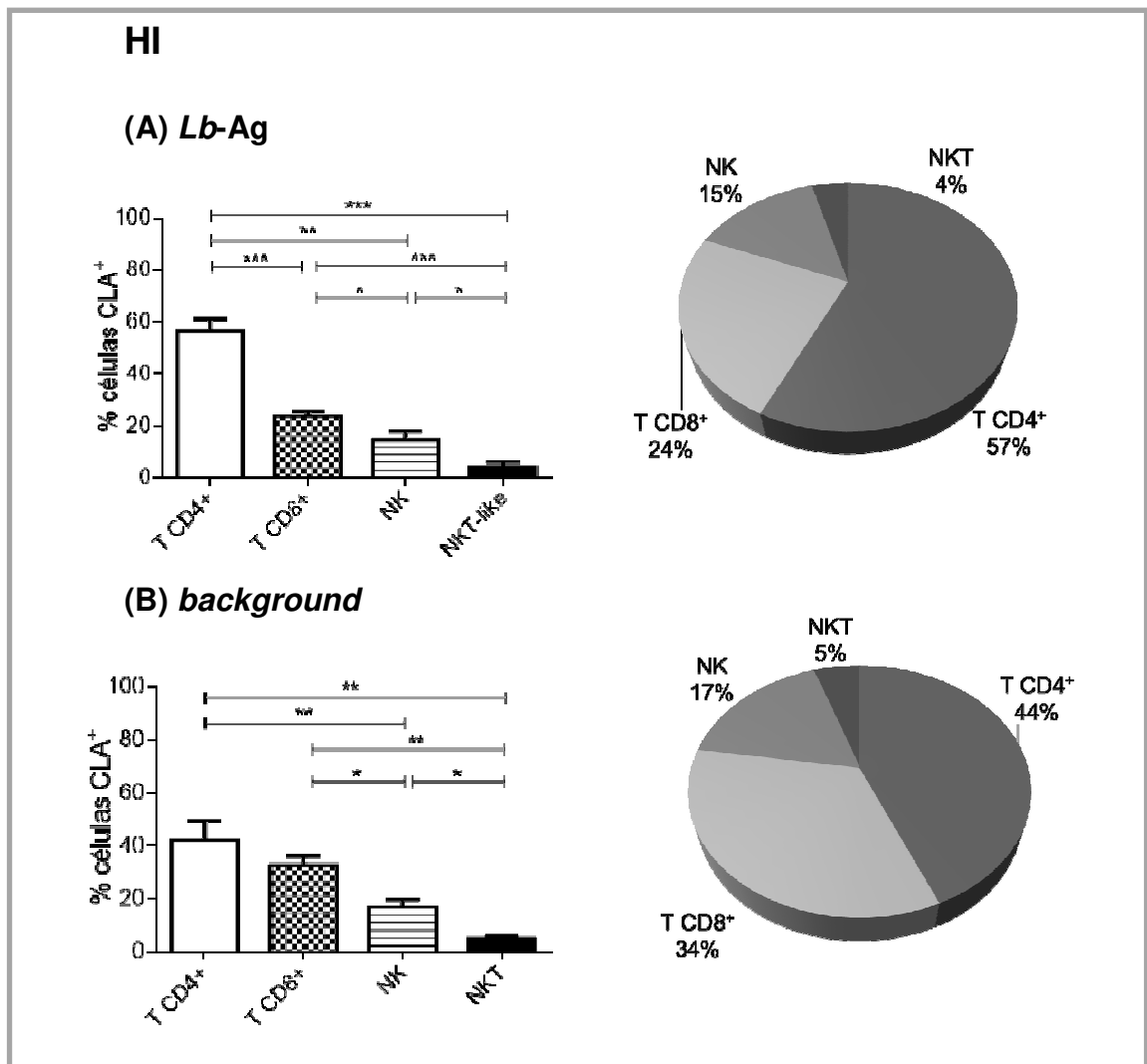


Figura 24. Distribuição das populações celulares a partir da expressão total de CLA em indivíduos saudáveis (HI, *healthy individuals*) (n=7). Resultados representativos das (A) culturas estimuladas com antígeno de *Leishmania braziliensis* (*Lb*-Ag) e (B) sem estímulo. Gráfico de barras representando média \pm erro padrão, onde * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$ e *** $P \leq 0,001$. Valor de p obtido pelo teste estatístico não-paramétrico *Mann-Whitney*. Nos gráficos de setores estão representadas as proporções de cada população celular baseadas nas médias percentuais de expressão de CLA.

5.3.2. Grupo de Pacientes com Falha Terapêutica (FT)

Nos ensaios experimentais *in vitro*, além da amostragem descrita no item 4.5, que incluiu pacientes com a doença ativa (AD), sob a terapia (DT) e com cura clínica (CC), foi avaliado também mais um grupo de pacientes de LC: pacientes que apresentaram falha terapêutica após o término da terapia (FT; n=3). A amostra de sangue periférico destes pacientes foi coletada quando eles apresentavam a doença ativa; entretanto, após um estudo retrospectivo, foi constatado que os mesmos apresentaram falha terapêutica.

Foi realizada a comparação entre a resposta específica aos *Lb-Ag* dos pacientes com a doença ativa que evoluíram para a cura clínica após a terapia (pacientes AD) com a resposta dos pacientes com a doença ativa que apresentaram falha terapêutica (pacientes FT). Tal resposta específica foi obtida calculando-se a razão entre os percentuais obtidos com a estimulação antigênica e os percentuais obtidos sem estimulação (*Lb-Ag* / BG). Desta forma, foi possível observar que os valores absolutos das razões entre os percentuais de células CD107a⁺ estimuladas com o *Lb-Ag* e de células não estimuladas foram maiores nos pacientes AD ($1,61 \pm 0,14\%$) em comparação aos pacientes FT ($0,14 \pm 0,08\%$) ($P \leq 0,001$) (Figura 25). Devido ao tamanho da amostragem do grupo de pacientes FT, não foi possível fazer as análises estatísticas pareadas pelo teste de *Wilcoxon*.

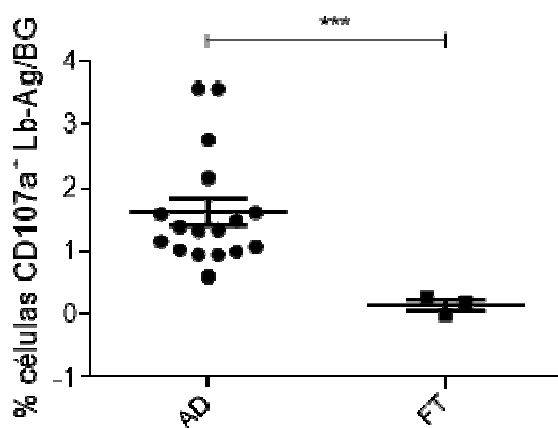


Figura 25. Avaliação da expressão de CD107a específica ao *Lb-Ag*. A razão entre os percentuais de células CD107a⁺ detectados nas culturas estimuladas com antígenos de *Leishmania braziliensis* (*Lb-Ag*) e os percentuais detectados nas culturas não estimuladas foi calculada e os resultados obtidos nos pacientes com a doença ativa (AD) (n=17) foram comparados com os resultados dos pacientes com falha terapêutica (FT) (n=3). *** $P < 0,001$, teste não-paramétrico *Mann-Whitney*. Cada ponto representa a razão entre os percentuais de células CD107a⁺ detectados nas culturas com estímulo antigênico e os percentuais detectados nas culturas não estimuladas de um mesmo indivíduo. A barra representa a média \pm erro padrão.

5.3.3. Quantificação de IL-15

A quantificação de IL-15 foi realizada por ELISA em amostras de sobrenadante de cultura de CMSP, plasma sanguíneo e sobrenadante de macerado de biopsia de lesão de pacientes de LC.

Não foram observadas diferenças entre as concentrações de IL-15 detectadas no sobrenadante das culturas de CMSP estimuladas com o *Lb*-Ag e o sobrenadante das culturas não estimuladas dos pacientes AD ($4,20 \pm 0,13$ pg/mL e $4,27 \pm 0,13$ pg/mL, respectivamente), DT ($4,35 \pm 0,13$ pg/mL e $4,28 \pm 0,14$ pg/mL, respectivamente) e CC ($4,19 \pm 0,29$ pg/mL e $3,97 \pm 0,21$ pg/mL, respectivamente) assim como dos HI ($4,71 \pm 0,24$ pg/mL e $4,77 \pm 0,30$ pg/mL, respectivamente) (Figura 26). Também não foi detectada diferença de concentração de IL-15 na comparação entre os grupos estudados (Figura 27).

Na quantificação de IL-15 plasmática também não observamos diferenças entre os grupos estudados. As concentrações de IL-15 no plasma de pacientes AD ($10,13 \pm 0,63$ pg/mL), DT ($10,69 \pm 1,19$ pg/mL) e CC ($9,71 \pm 1,91$ pg/mL) foram similares, assim como nos HI ($9,62 \pm 1,87$ pg/mL) (Figura 28).

A quantificação de IL-15 em sobrenadantes obtidos da maceração de amostras de biopsias de lesões de pacientes de LC e de esporotricose revelou diferenças entre estes dois grupos. A concentração de IL-15 foi maior nos sobrenadantes dos pacientes de LC ($8,52 \pm 0,55$ pg/mL) em comparação aos pacientes com esporotricose (NR; doença não-relacionada) ($6,14 \pm 0,23$ pg/mL) ($P \leq 0,001$), como demonstrado na Figura 29.

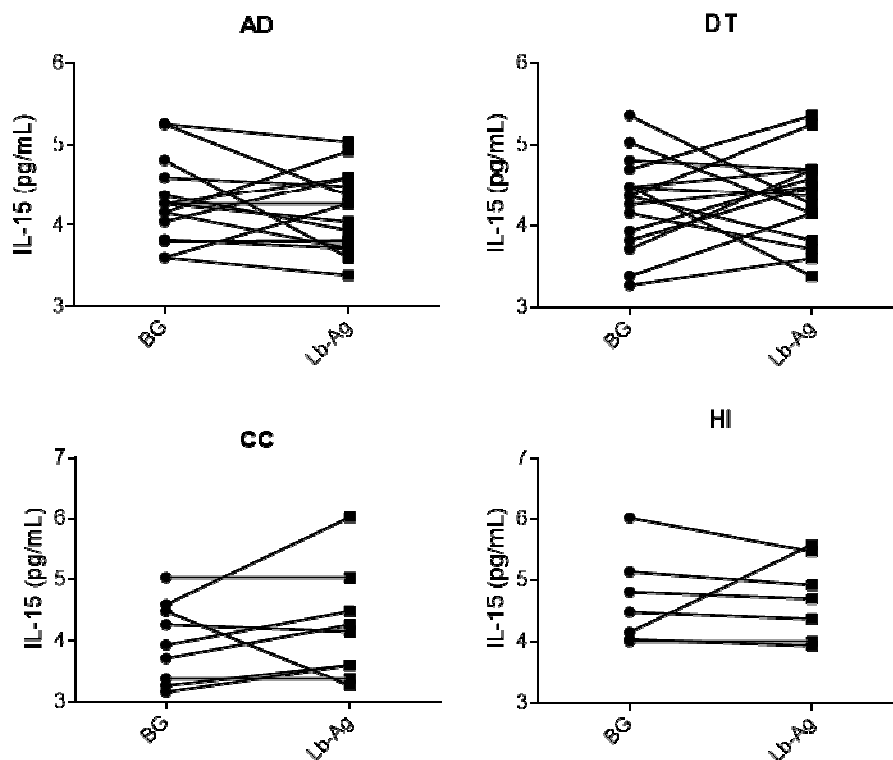


Figura 26. Comparação da concentração de IL-15 no sobrenadante das culturas de CMSP estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) e das culturas não estimuladas (BG: *background*) de pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: *active disease*; n=17), sob a terapia antimonial (DT: *during therapy*; n=16) e clinicamente curados (CC: *clinical cure*; n=10) e de indivíduos sadios (HI: *healthy individuals*; n=7). As linhas contínuas ligam os resultados referentes ao mesmo indivíduo. Valor de $P > 0,05$, obtido pelo teste pareado de *Wilcoxon*. CMSP: células mononucleares de sangue periférico.

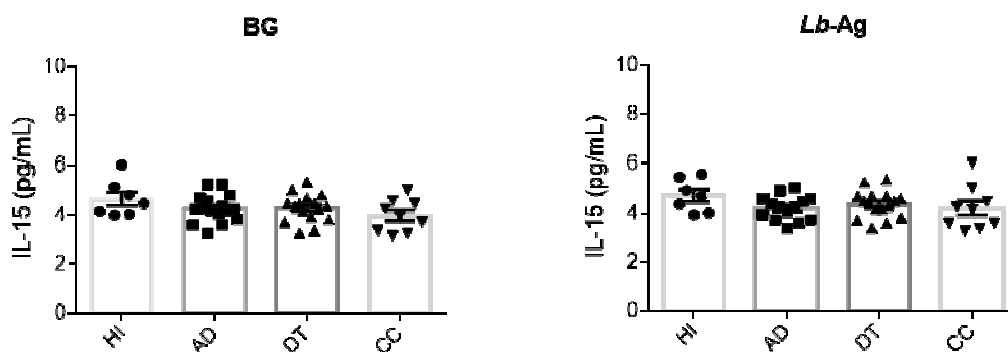


Figura 27. Concentração de IL-15 no sobrenadante das culturas de CMSP. Gráfico de dispersão e barras representando os resultados da concentração de IL-15 no sobrenadante das culturas de CMSP não estimuladas (BG: *background*) e estimuladas com antígenos de *L. braziliensis* (Lb-Ag) na comparação entre os grupos estudados: indivíduos sadios (HI: *healthy individuals*; n=7) e pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: *active disease*; n=17), sob a terapia antimonial (DT: *during therapy*; n=16) e clinicamente curados (CC: *clinical cure*; n=10). Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a média \pm erro padrão. Valor de $P > 0,05$, obtido pelo teste não-paramétrico *Mann-Whitney*.

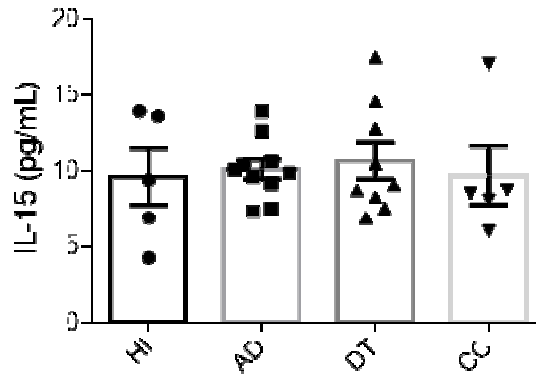


Figura 28. Concentração de IL-15 plasmática. Gráfico de dispersão e barras representando os resultados da concentração de IL-15 no plasma sanguíneo de indivíduos saudáveis (HI: healthy individuals; n=5) e pacientes com leishmaniose cutânea ativa (AD: active disease; n=10), sob a terapia antimonial (DT: during therapy; n=9) e clinicamente curados (CC: clinical cure; n=5). Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a média \pm erro padrão. Valor de $P > 0,05$, obtido pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney.

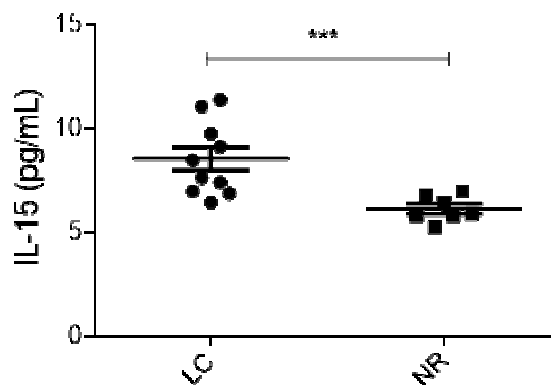


Figura 29. Concentração de IL-15 no sobrenadante de maceração de amostras de biópsia de lesão. Gráfico de dispersão representando os resultados da concentração de IL-15 de sobrenadantes obtidos a partir de maceração de amostras de biópsia de lesões de pacientes de leishmaniose cutânea (LC) (n=10) e de pacientes de esporotricose, doença não relacionada à LC (NR) (n=7). Cada ponto representa um indivíduo e as barras representam a média \pm erro padrão. *** $P \leq 0,001$, obtido pelo teste não-paramétrico Mann-Whitney.

6. DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial de Saúde uma das doenças tropicais de maior importância para a saúde pública no mundo. A LTA é endêmica no Brasil, onde se registram anualmente cerca de 20.000 novos casos, a maioria causada pela espécie *Leishmania (V.) braziliensis* (8). A LTA exibe um amplo espectro de apresentações clínicas de gravidade variada, causando desde lesões localizadas a graves deformações, sendo a leishmaniose cutânea (LC) a forma clínica mais comum (37). A doença é endêmica no Estado do Rio de Janeiro, onde o agente etiológico é a *Leishmania (V.) braziliensis*. A infecção por *L. (V.) braziliensis* geralmente resulta na predominância de uma resposta imune Th1, que pode levar à resolução das lesões ou a uma resposta inflamatória exagerada responsável pelo dano tecidual (130). Sendo assim, um maior conhecimento dos fenômenos que ocorrem na resposta imune contra a *Leishmania* torna-se de fundamental importância para estabelecer parâmetros imunológicos associados com a patogênese, assim como com a proteção, que certamente nortearão o desenvolvimento de protocolos vacinais e imunoterapias.

A imunidade protetora contra a infecção parasitária é criticamente dependente do desenvolvimento de uma resposta multifuncional de células T que lisam diretamente as células infectadas ou induzem ativação de fagócitos para destruir os parasitos intracelulares (282). Os linfócitos T CD4⁺ são cruciais para direcionar apropriadamente a resposta imune durante a defesa do hospedeiro e está estabelecido na literatura que as células CD4⁺ Th1 são essenciais no controle da infecção por *Leishmania* (107). Em adição às funções auxiliares tradicionalmente atribuídas às subpopulações de linfócitos T CD4⁺, foi evidenciado que os linfócitos T CD4⁺ podem também desempenhar funções citotóxicas (138). Linfócitos T CD4⁺ com potencial citolítico vêm sendo observados há décadas (283), mas foram considerados por muito tempo como artefatos de cultura. Entretanto, novos estudos surgiram mostrando que estes linfócitos T CD4⁺ circulantes são terminalmente diferenciados, são gerados tanto em infecções agudas quanto crônicas e podem contribuir para respostas protetoras (284). Os linfócitos T CD4⁺ citotóxicos têm sido implicados no controle de uma variedade de infecções virais persistentes, tais como HIV-1, CMV, EBV, influenza, hantavírus e dengue (152). No entanto, seu papel na LC é pouco conhecido. Neste contexto, além das células citotóxicas clássicas, como linfócitos T CD8⁺ e células NK, torna-se extremamente necessário levar em

consideração o impacto da função citotóxica desempenhada pelos linfócitos T CD4⁺ na imunopatogenia multifacetada das doenças relacionadas ao sistema imunológico (152).

No processo de citotoxicidade exercido por estas células, a via de secreção de grânulos líticos é a mais comum e compartilhada pelas diferentes linhagens de células citotóxicas, como células T e NK (285). Esta função efetora é exercida pela secreção coordenada de grânulos citotóxicos contendo perforina e proteases efetoras (granulisina e proteínas da família das granzimas) que são liberados na sinapse formada entre os linfócitos citotóxicos e as células-alvo e iniciam uma cascata de morte celular de maneira apoptótica e não apoptótica (286). Durante o processo de degranulação celular são expostas na membrana das células citotóxicas as proteínas de membrana associadas a lisossomos, como CD107a, que são pré-requisito para a lise das células-alvo mediada por grânulos (167). Estudos recentes indicam que os linfócitos T CD4⁺ que apresentam moléculas citotóxicas expressam o fator de transcrição T-bet (285,287). Entretanto, apesar de compartilharem esta característica com os linfócitos Th1, uma condição polarizada por citocinas com este perfil não é ideal para a geração da subpopulação citotóxica, sendo melhores induzidos na presença de IL-2, IL-12 e IL-15 (151,175).

De maneira interessante, foi observado no nosso estudo linfócitos T CD4⁺ expressando CD107a em todos os indivíduos avaliados. Nos ensaios *ex vivo*, observamos que os pacientes curados apresentaram percentuais mais baixos de expressão de CD107a⁺, não só pelos linfócitos T CD4⁺, como também pelos linfócitos T CD8⁺ e células NK e NKT. A menor atividade de degranulação observada nos pacientes curados pode ser devido a um retorno do sistema imunológico a um estado de repouso (*resting*) fisiológico após a resolução da infecção e à diferenciação de células efetoras em células de memória (288). De fato, estudos após a cura clínica da LC demonstraram uma redução na ativação de células efetoras e na quantidade de mediadores inflamatórios, apontando para um importante papel dos mecanismos regulatórios na manutenção da cura clínica (104,189,289–291). Apesar dos menores percentuais de expressão de CD107a pelos linfócitos T CD4⁺ nos pacientes curados, a frequência total destes linfócitos foi detectada em percentuais normais, similares aos observados nos indivíduos saudáveis. Nos pacientes com a doença ativa, entretanto, observamos que a frequência de linfócitos T CD4⁺ foi mais baixa, o que se reestabeleceu com a terapia.

Nós avaliamos a resposta citotóxica específica aos antígenos de *L. (V.) braziliensis* através de ensaios de cultivo celular *in vitro*, nos quais pudemos observar que tanto os pacientes com LC ativa quanto os pacientes sob a terapia antimonial e após a cura clínica apresentaram expansão antígeno-específica de linfócitos T CD4⁺ em degranulação. Em área endêmica de *L. (L.) major* já foi observado que pacientes de LC curados apresentaram expansão de linfócitos T CD4⁺ granzima B⁺ em resposta aos antígenos de *L. (L.) major*, enquanto os percentuais de linfócitos T CD8⁺ granzima B⁺ não foram alterados pela presença do antígeno (292). Tal relato corrobora nossa evidência de que a *Leishmania* induz um aumento de linfócitos T CD4⁺ citotóxicos circulantes, que parecem estar sendo ativados especificamente para exercerem suas funções citotóxicas na doença. A avaliação da ativação celular foi realizada nos ensaios *in vitro* com base na expressão do receptor CD38 e, assim, pudemos observar também expansão de linfócitos T CD4⁺ ativados em resposta ao *Lb-Ag* por todos os grupos de pacientes.

O *Lb-Ag* induziu a contração da frequência de linfócitos T CD4⁺ totais nos pacientes com a doença ativa e naqueles sob a terapia. Como nos ensaios *ex vivo* nós detectamos uma menor frequência de linfócitos T CD4⁺ nos pacientes com a doença ativa, isto nos leva a sugerir que o parasito é o responsável pela baixa frequência destas células. A inversão dos percentuais de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ após o tratamento descrita por Da-Cruz et al.(187,189) não foi observada em nenhum dos ensaios realizados neste estudo. Nos ensaios *ex vivo*, observamos maiores percentuais de linfócitos T CD8⁺ nos pacientes após o tratamento em comparação aos outros grupos, entretanto não foi observada inversão quando comparados aos percentuais de linfócitos T CD4⁺. Nos ensaios *in vitro*, mesmo o *Lb-Ag* induzindo contração dos linfócitos T CD4⁺ nos pacientes com a LC ativa, e opostamente, uma expansão dos linfócitos T CD8⁺, também não foi possível detectar maiores percentuais de linfócitos T CD8⁺ totais em comparação aos linfócitos T CD4⁺. Os linfócitos T CD4⁺ foram as células predominantes no sangue periférico de todos os indivíduos avaliados no estudo, independente da doença ou da estimulação antigênica.

Apesar da contração da frequência de linfócitos T CD4⁺ induzida pelo *Lb-Ag* observada nos pacientes com a doença ativa, a funcionalidade dessas células não está alterada, uma vez que seus percentuais de ativação e degranulação aumentaram em resposta ao *Lb-Ag* nesses pacientes. Além disso, precisamente

com intuito de verificar se a *L. (V.) braziliensis* induz prejuízo da funcionalidade celular, nós avaliamos nos ensaios *in vitro* a expressão de CD279, um receptor inibitório envolvido na exaustão de células T. Desta forma, foi possível observar que o *Lb*-Ag não influenciou a expressão de CD279 pelos linfócitos T CD4⁺ dos pacientes de LC, evidenciando um bom estado funcional destes linfócitos durante a doença. Um estudo em modelo murino de infecção por *L. (L.) major* encontrou associação positiva entre a cronicidade da doença e o comprometimento de proliferação antígeno-específica e de produção de IFN- γ , com aumento concomitante de expressão de CD279 por linfócitos T CD4⁺ (293). Entretanto, no presente estudo, nós não observamos percentuais elevados de linfócitos T CD4⁺ CD279⁺ circulantes nos pacientes de LC em comparação aos indivíduos saudáveis e não encontramos associação da expressão de CD279 com o tempo de evolução da doença.

Na LC humana, os linfócitos T CD8⁺ são ativados e proliferam em resposta à apresentação antigênica da *Leishmania*, enquadrando-se como uma população de células T específicas capazes de montar uma resposta imune contra o parasito (187). Não é totalmente compreendido como os linfócitos T CD8⁺ são ativados na leishmaniose, mas é conhecido que eles respondem durante a infecção (177). Em concordância com os dados de que os linfócitos T CD8⁺ são capazes de reconhecer a *Leishmania* e montar desenvolver uma resposta específica, nos ensaios *in vitro*, nós detectamos uma expansão de linfócitos T CD8⁺ em resposta ao *Lb*-Ag nos pacientes com LC ativa. Da mesma maneira, as células NK e NKT destes pacientes também apresentaram expansão antígeno-específica.

Nos ensaios *ex vivo*, nós detectamos que a frequência de linfócitos T CD8⁺ foi mais elevada nos pacientes curados. Entretanto, em relação aos seus percentuais de degranulação, observamos que foram os mais baixos nestes pacientes. Outros autores já relataram uma menor atividade de linfócitos T CD8⁺ após a terapia, como demonstrado pela diminuição dos níveis de IFN- γ em pacientes de LC e LM curados (291). Neste contexto, nosso grupo demonstrou baixas frequências de linfócitos T CD8⁺ efetores circulantes em pacientes de LC causada por *L. (V.) braziliensis* após a cura (294) (**anexo 5**). Adicionalmente, estes pacientes curados apresentaram elevadas frequências de linfócitos T CD8⁺ de memória em comparação com os pacientes com LC ativa e durante o tratamento (Ferraz R, manuscrito em preparação, comunicação pessoal). Assim, a baixa frequência de linfócitos T CD8⁺

CD107a⁺ circulantes observada nos pacientes curados parece ser consequência da diferenciação dos linfócitos T CD8⁺ em células de memória.

Os linfócitos T CD8⁺ contribuem para a resistência contra a infecção primária e secundária e têm sido considerados alvos para o desenvolvimento de vacinas, principalmente devido à sua rápida produção de IFN- γ associada com a proteção em modelos de infecção por *L. (L.) major* (180,182–185). Foi sugerido que, em adição à produção de IFN- γ , a produção de perforina por linfócitos T CD8⁺ também é crucial para a imunidade induzida por vacina contra *L. (L.) amazonensis* (186). Alguns estudos apontaram para um papel protetor e benéfico dos linfócitos T CD8⁺ na infecção por *L. (V.) braziliensis* (40,187–190,294). Um menor percentual de linfócitos T CD8⁺ apoptóticos foi observado em lesões de pacientes que curaram espontaneamente em comparação com pacientes na fase ativa da doença, apontando para um papel importante destes linfócitos no microambiente da lesão (295).

Entretanto, estudos vêm relacionando a função citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ ao dano tecidual e exacerbação da doença, principalmente na LC humana causada por *L. (V.) braziliensis* (141,143,144,296). Marcadores de citotoxicidade dependente de grânulos foram detectados em linfócitos T CD8⁺ isolados de lesões de pacientes de LC e os pacientes que apresentaram grandes úlceras cutâneas possuíam maiores percentuais de linfócitos T CD8⁺ granzima A⁺ em comparação aos pacientes com lesões nodulares (141). Nas lesões cutâneas de pacientes também foi verificada alta expressão de genes associados com a via citolítica, nas quais os linfócitos T CD8⁺ presentes exibiram um fenótipo citotóxico (142,143). Ainda, pacientes com a forma mucosa apresentaram maiores níveis de mRNA para marcadores citolíticos em comparação aos pacientes com a forma cutânea (192). Estudos no modelo murino de infecção por *L. (V.) braziliensis* revelaram que a progressão da doença e a metástase são independentes da carga parasitária, mas diretamente associadas com a presença de linfócitos T CD8⁺. Nos animais que apresentaram patologia severa foi relatada presença de linfócitos T CD8⁺ em degranulação e lise de células infectadas com *L. (V.) braziliensis* (142). Em conjunto, estes resultados apontam para a citotoxicidade como característica marcante da leishmaniose causada por *L. (V.) braziliensis* e sugerem que a atividade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ promova a progressão da doença. No entanto, de acordo com os nossos resultados, a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ não está relacionada com a patologia. Nos ensaios *ex vivo*, os percentuais de linfócitos T

CD8⁺ CD107a⁺ detectados nos pacientes com LC ativa foram semelhantes aos observados nos indivíduos sadios. Avaliando a resposta antigênica específica dos ensaios *in vitro*, observamos que os linfócitos T CD8⁺ não apresentaram alteração em seus percentuais de degranulação em nenhum grupo de pacientes de LC, evidenciando que a infecção por *L. (V.) braziliensis* não induz aumento de atividade citotóxica por estas células.

Uma questão interessante de discussão relaciona-se com as diferentes estratégias de avaliação fenotípica das células citotóxicas pela citometria de fluxo. Em alguns casos, mesmo a citotoxicidade sendo avaliada, não foi analisado se esta função poderia estar sendo exercida pelos linfócitos T CD4⁺ ou outras células citotóxicas, como as células NK e NKT. Ainda, alguns estudos definiram a população de linfócitos T CD8⁺ avaliando os biomarcadores CD3 e CD8, e outros definiram esta população celular avaliando apenas a expressão de CD8, sem exclusão de células NKT e/ou NK. No presente estudo, durante a análise citofluorimétrica, foi delimitada a expressão positiva de CD3 para definir a população de linfócitos T e as células CD56⁺ foram excluídas de tal análise, a fim de eliminar qualquer possível presença de células NK e NKT que poderiam estar sendo englobadas e, desta forma, analisadas equivocadamente.

De acordo com o exposto, nosso grupo também evidenciou que os linfócitos T CD8⁺ não parecem ser responsáveis pela destruição tecidual observada nas lesões de LC causada por *L. (V.) braziliensis*. Ferraz et al. (2017) (297) (**anexo 4**) observaram que as populações celulares mais comprometidas com a atividade citotóxica no microambiente da lesão leishmaniótica são as células NKT, T CD4⁺ e T CD4^{neg}CD8^{neg} (T duplo-negativas; DN), dado seus elevados percentuais de expressão de CD107a. Quando foi analisado o *pool* de células CD107a⁺, foi observado que as maiores proporções foram de células T DN e NKT. Surpreendentemente, as células T CD8⁺ e NK representaram apenas 3% e 4%, respectivamente, do total de células CD107a⁺. Foi encontrada ainda uma correlação positiva entre a frequência de células CD107a⁺ e a produção de granzima B no local da lesão (297) (**anexo 4**).

Neste contexto, apesar de nossos resultados não revelarem atividade citotóxica *Leishmania*-específica por linfócitos T CD8⁺, nós evidenciamos que os linfócitos T CD4⁺, células NK e NKT aumentam seus percentuais de expressão de CD107a em resposta ao *Lb*-Ag, fato este observado em todos os grupos de pacientes de LC. Além disso, também detectamos expansão de células T CD4⁺, NK

e NKT ativadas antígeno-específicas em todos os grupos de pacientes. Desta forma, parece que a citotoxicidade, característica da infecção por *L. (V.) braziliensis*, é mesmo deletéria na evolução da doença. Entretanto, é necessário ter cuidado na avaliação das populações celulares responsáveis por essa função efetora citotóxica, uma vez que tais resultados podem refletir na descoberta de novos alvos vacinais e terapêuticos.

A molécula CD8 não é expressa de uma forma homogênea na superfície das células T do sangue periférico humano, sendo os linfócitos T CD8⁺ então, passíveis de serem divididos em duas subpopulações com base na quantidade deste receptor. Através dos ensaios *ex vivo* nós observamos que os linfócitos T CD8^{bright} são a subpopulação predominante na circulação; enquanto os linfócitos T CD8^{dim}, apesar da baixa frequência, são a população responsável pela atividade citotóxica. Estes achados estão de acordo com dados descritos na literatura, que relatam que os linfócitos T CD8^{bright} são mais encontrados na circulação e possuem funções regulatórias, enquanto a subpopulação T CD8^{dim} compreende as células efetoras-ativadas e com função citotóxica associada (298). Foi demonstrado que os linfócitos T CD8^{dim} circulantes podem exercer rapidamente as suas funções efetoras após o reconhecimento do antígeno (298). Assim, a presença destas células pode refletir um estado contínuo de baixa estimulação antigênica. Entretanto, nossos resultados não mostram diferenças nas frequências de linfócitos T CD8^{dim} ou CD8^{bright} entre os pacientes de LC e os indivíduos saudáveis.

Pouco se conhece sobre o papel das células NK na LC causada por *L. (V.) braziliensis*. Estudos em modelos experimentais com outras espécies de *Leishmania* têm discutido que estas podem não ser essenciais para a resolução da patologia (195); e alguns autores propuseram que na infecção por *L. (V.) braziliensis* a citotoxicidade mediada por células NK contribui para o dano tecidual (140). Nos ensaios *ex vivo*, foi possível observar que a frequência de células NK foi maior nos pacientes com LC ativa em comparação aos percentuais observados nos indivíduos saudáveis, corroborando dados observados anteriormente (299). Além disso, a frequência de células NK permanece elevada durante o tratamento e após a cura clínica. Ao avaliarmos a resposta antígeno-específica, observamos que todos os grupos de pacientes de LC apresentaram expansão de células NK, sugerindo que o parasito induz altos percentuais de células NK, mesmo nos pacientes com a cura clínica recente. Nos ensaios *ex vivo*, os percentuais de células NK em degranulação de todos os grupos de pacientes foram menores do que os observados nos

indivíduos sadios. Entretanto, ao avaliarmos a degranulação antígeno-específica, observamos que estas células foram capazes de responder ao *Lb*-Ag, aumentando seus percentuais de degranulação, além dos seus percentuais de ativação e proliferação.

Os baixos percentuais de células NK CD107a⁺ dos pacientes de LC detectados nos ensaios *ex vivo* pode ser resultante de uma supressão da atividade das células NK pelo parasito, um fenômeno já observado na infecção por *L. (L.) major*. Foi demonstrado que a *L. (L.) major* foi capaz de reduzir a capacidade das células NK de lisarem as células-alvo e inibir a citotoxicidade e produção de IFN- γ por células NK humanas. Ainda, o contato direto das células NK com promastigotas resultou na morte de ambas as células (223,300). Alguns fatores podem contribuir para esta baixa atividade, como a ação de citocinas como TGF- β e IL-10 (199,203). Nesse sentido, nossos ensaios *in vitro* mostraram claramente uma expansão das células NK CD279⁺ em todos os grupos de pacientes de LC, evidenciando um estado de exaustão celular induzido pelo *Lb*-Ag. Uma condição de pobre funcionalidade de células NK, característica de um estado de exaustão, foi relatada na LCD causada por *L. (L.) mexicana* e esta foi associada à gravidade da doença (299). Na LCD causada por *L. (L.) mexicana* também foi demonstrada exaustão de linfócitos T CD8⁺ e encontrada correlação positiva entre a severidade da patologia e a expressão de CD279 por linfócitos T CD8⁺ circulantes de pacientes com a doença (301). Em nosso estudo, observamos expansão antígeno-específica de linfócitos T CD8⁺ CD279⁺ apenas nos pacientes sob a terapia antimonial. Estes pacientes sob a terapia também apresentaram expansão de linfócitos T CD8⁺ ativados, sugerindo uma possível ação da terapia antimonial em conjunto com o antígeno. Neste contexto, parece que o antígeno de *L. (V.) braziliensis* induz exaustão das células NK, que pode estar impedindo a ativação e atividade ótimas destas células. Entretanto, ainda assim, apesar desta aparente supressão da funcionalidade, essas células são capazes de reconhecer e responder ao antígeno de *L. (V.) braziliensis*, como demonstrado pelo aumento de seus percentuais totais, de ativação e degranulação.

As células NK humanas são geralmente divididas em duas subpopulações baseado na densidade de expressão da molécula CD56: CD56^{bright}, que são a subpopulação predominante nos tecidos linfoides secundários, e CD56^{dim}, predominantes no sangue periférico (196). As células NK CD56^{bright} são a principal

fonte de produção de citocinas, enquanto as células NK CD56^{dim} são associadas à função citotóxica e indução de morte de células-alvo (196,302). Corroborando com estas descrições, nós observamos nos ensaios *ex vivo* que mais de 95% das células NK circulantes apresentam fenótipo CD56^{dim} em todos os indivíduos estudados. Quando avaliamos a degranulação celular, pudemos observar que a maioria das células NK CD107a⁺ apresentou o fenótipo CD56^{dim}, reforçando o comprometimento desta subpopulação com a função citotóxica. Essa dicotomia das subpopulações de células NK não foi alterada pela doença, o que demonstra uma estabilidade destas subpopulações.

Por fim, o papel das células NKT na resistência ou susceptibilidade da infecção por *Leishmania* também não está definido, uma vez que dados controversos persistem na literatura (261). As células NKT são mais bem estudadas na LV, onde foi demonstrado que sua ativação ocorre por uma via direta, na qual antígenos do glicocálix da *Leishmania*, apresentados via CD1d, se ligam ao TCR invariante da NKT, que atuam então produzindo citocinas e lisando células-alvo através da atividade citotóxica (254,255,303). Entretanto, os estudos na LC são escassos. Recentemente foi demonstrado que a ativação de células NKT na LC pode também ocorrer através de uma via indireta. O LPG de *L. (L.) mexicana* foi capaz de ativar células dendríticas, resultando na indução da produção de IFN- γ por células NKT (208). As células NKT são conhecidas produtoras de citocinas tanto do tipo I como do tipo II, e podem assim auxiliar no direcionamento da resposta imune na LC devido à sua interação com células dendríticas (304,305). Nossos resultados evidenciaram a participação citotóxica das células NKT através da via de liberação de grânulos líticos na LC. Nos ensaios *ex vivo* nós observamos que os percentuais de células NKT expressando CD107a variou amplamente entre os indivíduos estudados, mas ainda assim foi possível observar que os pacientes curados apresentaram menores percentuais de células NKT CD107a⁺ em comparação aos indivíduos durante a terapia. Nos ensaios *in vitro*, revelamos que o *Lb*-Ag induziu ativação das células NKT, resultando em uma expansão de células NKT totais e ativadas em todos os grupos de pacientes de LC. A atividade citotóxica das células NKT também estava aumentada, visto que todos os grupos de pacientes apresentaram maiores percentuais de células NKT CD107a⁺ especificamente em resposta ao *Lb*-Ag. Nosso grupo evidenciou em outro estudo a participação citotóxica das células NKT em lesões cutâneas de pacientes de LC, mostrando que esta é a população celular mais comprometida com a citotoxicidade no

microambiente da lesão (297) (**anexo 4**). Em tal estudo, revelamos que as células NKT são a quarta população de células T mais encontrada nas lesões de LC e correspondem à segunda população em proporção de todas as células que expressam CD107a (297) (**anexo 4**).

As células NKT humanas podem ser divididas de acordo com sua expressão de CD4 ou CD8 e são normalmente subdivididas em três subpopulações principais: CD8⁺, CD4⁺ ou CD8^{neg}CD4^{neg} (duplo-negativas; DN) (232). Além destas, alguns autores relataram uma subpopulação com fenótipo CD8⁺CD4⁺ (duplo-positivas; DP) (252,281,306), a qual também observamos em nosso estudo. Através dos ensaios *ex vivo*, nós detectamos altas frequências de células NKT CD8⁺ e baixas frequências da subpopulação DP, tanto nos pacientes de LC como nos indivíduos saudáveis. Outros autores também observaram altas frequências da subpopulação CD8⁺ em indivíduos saudáveis e em pacientes com outras patologias (247,307). Nossos resultados mostraram também que as células NKT CD8⁺ são a principal subpopulação envolvida na citotoxicidade e isso corrobora dados previamente descritos (252). Um estudo em LV, com foco nas células NKT, mostrou que os pacientes com doença ativa apresentaram menor frequência de células NKT CD4⁺ e NKT CD8⁺ em comparação aos indivíduos saudáveis. Após o término da terapia, os pacientes de LV mantiveram baixa frequência de células NKT CD4⁺, enquanto as células NKT CD8⁺ retornaram aos percentuais normais, associando então esta subpopulação com um papel protetor na LV (308). No presente estudo, nós observamos uma menor frequência da subpopulação DP nos pacientes com LC ativa, que foi reestabelecida a percentuais similares aos detectados nos indivíduos saudáveis com a terapia e após a cura clínica, sugerindo um papel protetor dessa subpopulação na LC.

A principal divisão das células NKT humanas está relacionada à sua especificidade de reconhecimento antigênico, pois podem apresentar um TCR semi-invariante (tipo I) ou diverso (tipo II) (251). Estudos relatam que cerca de 70% das células NKT apresentam um perfil invariante (232); no entanto, tal frequência varia muito nos seres humanos e alguns autores vêm encontrando elevados percentuais de células NKT tipo II (309,310). Por esta razão, nós decidimos analisar qual a proporção de células NKT invariantes estava presente em nossa amostragem nos estudos *in vitro*. Inesperadamente, verificamos que apenas uma baixa frequência de células NKT expressou o TCR invariante V α 24-J α 18, tanto nos pacientes de LC ativa quanto nos indivíduos saudáveis. As células NKT tipo II são reativas à glicolipídeos e

fosfolípidos próprios, mas também aos microrganismos, podendo promover resposta imune inata e adaptativa protetoras ou que contribuem para a injúria tecidual (240,310). Alguns ligantes para NKT tipo II derivados de microrganismos já foram identificados, como fosfatidilglicerol e difosfatidilglicerol de *Mycobacterium tuberculosis* (311).

Ao avaliar se o *Lb*-Ag poderia modular a funcionalidade das células NKT, nós observamos que nos pacientes com doença ativa e durante a terapia não houve alteração dos percentuais de células NKT CD279⁺. Entretanto, observamos expansão de células NKT CD279⁺ em resposta ao *Lb*-Ag nos pacientes curados. Um mecanismo de inibição da atividade de células NKT por CD279 foi descrito em pacientes com tuberculose. Foi observado que o bloqueio de CD279 impediu a apoptose de células NKT produtoras de IFN- γ e aumentou seus percentuais de degranulação (273). Estudos adicionais são necessários para entender porque somente os pacientes curados de LC apresentaram aumento de exaustão das células NKT na presença do *Lb*-Ag e, além disso, verificar se o bloqueio da via CD279 resulta em aumento da atividade celular na LC. Na LCD foi possível restaurar os mecanismos efetores dos linfócitos T CD8⁺ em exaustão através do bloqueio de CD279 (301). Neste contexto, nosso grupo mostrou pela primeira vez a distribuição e a contribuição das células NKT na citotoxicidade na LC, tanto na resposta localizada, como na sistêmica, evidenciando sua capacidade de reconhecimento antigênico e funcionalidade de resposta específica.

Devido à importância do tráfego de linfócitos na dinâmica da infecção e sua relação com a formação do infiltrado inflamatório e do processo de cicatrização, nós avaliamos a expressão de CLA nos ensaios *in vitro*. A modulação da expressão de CLA pelo *Lb*-Ag pode influenciar a função e os padrões de migração das células efectoras. No entanto, nós não observamos alteração nos percentuais de expressão de CLA devido ao estímulo com *Lb*-Ag em nenhuma população celular estudada e em nenhum grupo de pacientes ou nos indivíduos saudáveis. Entretanto, já foi demonstrado que antígenos de *L. (V.) braziliensis* modulam positivamente a expressão de CLA nos linfócitos T durante a LC ativa (279). A divergência com nossos resultados pode ser devido a diferenças metodológicas, uma vez que nós avaliamos apenas a expressão de CLA antígeno-específica, comparando os resultados das células estimuladas com *Lb*-Ag com as células não estimuladas, sob as mesmas condições de cultivo. Mendes-Aguiar et al. (2009) compararam a

expressão de CLA após estimulação antigênica *in vitro* com os resultados obtidos em ensaios *ex vivo*. Nós acreditamos que não detectamos modulação da expressão de CLA *in vitro* devido ao fato de que fatores quimiotáticos solúveis derivados do tecido são necessários para o tráfego de células T para os tecidos inflamados (275).

É importante ressaltar que, nos ensaios *in vitro*, os indivíduos sadios não apresentaram alteração dos percentuais de nenhuma molécula avaliada (CD107a, CD38, CD279 e CLA) em nenhuma população celular estudada, evidenciando que as células destes indivíduos, por não terem sido primadas *in vivo*, não foram capazes de reconhecer e responder aos antígenos de *L. (V.) braziliensis*. Tal dado confirma o caráter específico da resposta imune estudada, corroborando o postulado de que a maioria das células T de pacientes de LC e LM é pré-ativada no sangue periférico (312).

Não são bem conhecidos quais os fatores que direcionam as células a se tornarem citotóxicas. Tem sido discutido que a IL-15 está associada ao aumento da citotoxicidade em células NK (313) e indução de geração de linfócitos T CD4⁺ citotóxicos (314). A IL-15 também tem sido relacionada à indução de proliferação e manutenção de linfócitos T CD8⁺ (315), T CD4⁺ (316), células NK (317,318) e NKT (319), além da manutenção de células T de memória (320–322). Na LC, foi demonstrado que a neutralização de IL-15 modula negativamente a secreção de IFN- γ induzida por antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis* por CMSP, o que aponta para uma relação desta citocina com a resposta inflamatória na doença (312). Entretanto, nós não observamos, nos ensaios *in vitro*, correlação entre a concentração de IL-15 do sobrenadante das culturas estimuladas com o *Lb*-Ag e a proliferação, ativação, degranulação, exaustão ou endereçamento para a lesão de células T CD4⁺, T CD8⁺, NK e NKT. Em relação à concentração de IL-15 nos sobrenadantes das CMSP, não foram observadas diferenças entre os pacientes de LC ativa, durante o tratamento e com cura clínica, e nem mesmo com os indivíduos sadios. Também não foram observadas diferenças entre as concentrações de IL-15 no plasma sanguíneo de pacientes com a LC ativa, durante o tratamento antimonial e com cura clínica recente e indivíduos sadios. Foi realizada a quantificação de IL-15 em sobrenadantes obtidos da maceração de amostras de biopsias de lesões de pacientes de LC com intuito de verificar a concentração desta citocina na resposta imune localizada. Para critério de comparação, utilizamos amostras de biopsia de lesão de pacientes com esporotricose, uma doença fúngica subcutânea, também

endêmica no estado do Rio de Janeiro e clinicamente semelhante à LC, o que torna necessário o diagnóstico diferencial entre as duas patologias (323). Observamos que a concentração de IL-15 foi maior nos sobrenadantes dos pacientes de LC em comparação aos pacientes com esporotricose. Poucos são os estudos em esporotricose focando a resposta imune do hospedeiro, todavia alguns autores sugerem que o acúmulo de linfócitos T CD4⁺ observado nas lesões de pacientes com esta patologia deva ser devido a uma resposta imune sistêmica, e não relacionada especificamente ao agente etiológico (324). A maior concentração de IL-15 na lesão dos pacientes de LC pode estar associada a uma resposta inflamatória mais robusta nesta patologia, com participação de diferentes tipos celulares especificamente em resposta à *Leishmania*. Entretanto, mais estudos são necessários para avaliar a associação de IL-15 com a resposta inflamatória na LC.

Com base no exposto, a evolução para a cura clínica da LC depende na maior parte do tipo e magnitude da resposta imune desencadeada pelo hospedeiro, além das características das espécies do parasito (107). Na busca para desvendar qual o perfil de resposta é necessário para controlar a doença, deve-se levar em consideração quais as singularidades entre os pacientes que evoluem para a cura daqueles que se tornam refratários ao tratamento. Uma hipótese para a ocorrência de falha terapêutica é que haja um defeito na resposta imune celular do hospedeiro associado à persistência parasitária (8,290,325,326). O fato de que a administração de um inibidor de TNF- α em associação com a terapia antimonial melhora a cicatrização dos pacientes de LM suporta em parte esta hipótese (327). A falha terapêutica é definida pelo Ministério da Saúde como o caso que recebeu dois esquemas terapêuticos regulares com antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) sem apresentar cura clínica da doença (8). Nesses casos, o mesmo esquema terapêutico deve ser repetido, e nos casos de não resposta após duas aplicações do mesmo esquema, uma droga de segunda escolha deve ser utilizada (8). No presente estudo, a falha terapêutica foi considerada quando o paciente não apresentou cura clínica após o primeiro esquema de tratamento, conforme a definição adotada na rotina clínica de atendimento do Laboratório de Vigilância em Leishmaniose do INI/FIOCRUZ. Observamos uma taxa de falha terapêutica muito baixa (9,37%). Esta baixa proporção de falha na população estudada corrobora a eficiência obtida com o tratamento antimonial no Estado do Rio de Janeiro (92–94,96,328). Entretanto, difere de outros estudos em outras regiões do país, onde são

registradas taxas de 46 a 75% de falha ao tratamento com antimonial pentavalente (325,329–331).

Pouco é conhecido acerca das peculiaridades imunológicas dos pacientes que não são capazes de evoluir para a cura. Nós avaliamos a diferença entre a resposta citotóxica específica ao *Lb*-Ag dos pacientes com a doença ativa que evoluíram para a cura clínica após a terapia, com a resposta dos pacientes com a doença ativa que apresentaram falha terapêutica. Um resultado interessante foi que os pacientes que apresentaram falha terapêutica exibiram menores percentuais de células em degranulação especificamente reativas ao antígeno em comparação aos pacientes que apresentaram cura após a terapia. Isto nos leva a hipotetizar que os pacientes que não evoluem para a cura clínica podem apresentar uma irresponsividade celular aos antígenos de *Leishmania* durante a fase ativa, resultando em uma incapacidade de montar uma resposta imune efetiva. Um estudo recente em área endêmica de *L. (V.) guyanensis* sugere um mecanismo de irresponsividade imunológica associada à falha terapêutica, uma vez que foi detectada baixa produção de IFN- γ em resposta ao antígeno (332). Neste sentido, um estudo com foco na LV verificou que a produção de TGF- β , uma citocina imunorregulatória, foi associada à falha terapêutica (333). Alguns autores sugerem que a refratariedade ao tratamento na LC, que resulta em infecção recorrente, pode estar relacionada com a exaustão do sistema imunológico e a persistência parasitária (334). Entretanto, nós não observamos diferenças nos percentuais de CD279 entre os pacientes com LC ativa que não foram capazes de evoluir para a cura clínica em comparação com aqueles que curaram. Devido à baixa taxa de falha terapêutica em nosso estudo, não foi possível realizarmos muitas inferências estatísticas, o que prejudicou o entendimento dos nossos resultados. É necessário incluir mais pacientes com falha terapêutica em nosso estudo para podermos tirar conclusões acerca dos resultados obtidos. Contudo, para atingirmos progressos no desenvolvimento de estratégias mais eficazes de controle da doença, seja na formulação de vacinas ou melhorias nos fármacos, é necessário um maior entendimento da resposta imunológica associada à cura e à proteção, assim como dos mecanismos envolvidos na ação patológica.

7. CONCLUSÕES

Nosso estudo fornece novos *insights* e fortes evidências sobre o envolvimento de linfócitos T CD8⁺ e linfócitos T CD4⁺, células NK e células NKT na resposta citotóxica na LC. Nos ensaios *ex vivo*, observamos percentuais similares ou até menores de células em degranulação nos pacientes com LC ativa em comparação aos indivíduos saudáveis, não possibilitando uma associação entre a função citotóxica e o dano tecidual. Nestes ensaios, os pacientes curados apresentaram baixos percentuais de expressão de CD107a por todas as populações celulares estudadas. Esta baixa atividade citotóxica parece estar relacionada a uma recuperação do sistema imunológico após a infecção para um estado de repouso e diferenciação das populações celulares em células de memória. Nos ensaios *in vitro*, nós mostramos que a resposta citotóxica específica aos antígenos solúveis de *L. (V.) braziliensis* é exercida por diferentes populações celulares, com destaque para o papel dos linfócitos T CD4⁺ por representarem a população celular mais expressiva em relação às proporções das células em ativação, em degranulação, em exaustão e endereçamento para a lesão. A resposta específica ao antígeno de *L. (V.) braziliensis* pelos pacientes de LC resultou na expansão de células T CD4⁺, NK e NKT totais, ativadas e em degranulação, além de células NK em exaustão. Tal aumento de ativação e de atividade citotóxica pode estar relacionado com o dano tecidual resultante da forte resposta inflamatória característica da doença. Contudo, os linfócitos T CD8⁺ não apresentaram atividade citotóxica específica aos antígenos particulados de *L. (V.) braziliensis*, indicando que estas células participam na imunopatogênese LC, respondem com proliferação antígeno-específica, mas não são responsáveis pela ação citotóxica deletéria característica da LC.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pigott DM, Bhatt S, Golding N, Duda KA, Battle KE, Brady OJ, et al. Global distribution maps of the leishmaniasis. *eLife* [Internet]. 2014 Jun 27 [cited 2017 Mar 8];3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103681/>
2. PAHO WHO [Internet]. [cited 2017 Jan 16]. Available from: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754&lang=pt
3. WHO | Leishmaniasis [Internet]. WHO. [cited 2017 Jan 16]. Available from: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/
4. Desjeux P. Leishmaniasis. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Sep;2(9):692.
5. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World Leishmania Infections: A Practical Review. *Dermatol Clin*. 2015 Jul;33(3):579–93.
6. WHO | Epidemiological situation [Internet]. WHO. [cited 2017 Jan 16]. Available from: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>
7. WHO [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 10]. Available from: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html
8. SVS S de V em S Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. 2013. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf
9. PAHO OPa-A de S. PAHO [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 16]. Available from: http://www.panaftosa.org/leish/inf2014_es/InfoLT2014BRA_PT.pdf
10. Torres-Guerrero E, Quintanilla-Cedillo MR, Ruiz-Esmenjaud J, Arenas R. Leishmaniasis: a review. *F1000Research*. 2017;6:750.
11. SINAN [Internet]. 2016 [cited 2017 Mar 9]. Available from: <http://portalsinan.saude.gov.br/leishmaniose-tegumentar-americana>
12. DATASUS [Internet]. [cited 2017 Mar 9]. Available from: <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29892200&VObj=http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/defthtm.exe?sinannet/cnv/lta>
13. SVS/MS M da S. Leishmaniose Tegumentar - Gráficos e Mapas [Internet]. 2016 [cited 2017 Oct 3]. Available from: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/marco/03/LT-Graficos-e-Mapas.pdf>
14. Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P, et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Mar;10(3):e0004349.
15. Lainson R, Shaw J. Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Londres - Academic Press: Peters, W.; Killick-Kendrick, R.; 1987. p. 1–120.
16. Jones TC, Johnson WD Jr, Barretto AC, Lago E, Badaro R, Cerf B, et al. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J Infect Dis*. 1987 Jul;156(1):73–83.
17. Grimaldi G Jr, McMahan-Pratt D. Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview. *Prog Clin Parasitol*. 1991;2:73–118.
18. Rabello E. Caso de Leishmaniose. *Bol Soc Bras Dermatol*. 1913;2.

19. 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 Jul;39(7):506–14.
20. Cupolillo E, Brahim LR, Toaldo CB, de Oliveira-Neto MP, de Brito MEF, Falqueto A, et al. Genetic polymorphism and molecular epidemiology of *Leishmania (Viannia) braziliensis* from different hosts and geographic areas in Brazil. *J Clin Microbiol*. 2003 Jul;41(7):3126–32.
21. Vieira-Gonçalves R, Pirmez C, Jorge ME, Souza WJS, Oliveira MP, Rutowitsch MS, et al. Clinical features of cutaneous and disseminated cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Paraty, Rio de Janeiro. *Int J Dermatol*. 2008 Sep;47(9):926–32.
22. Rangel EF, Lainson R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104(7):937–54.
23. dos Santos GPL, Sanavria A, Marzochi MC de A, dos Santos EGOB, Silva VL, Pacheco R da S, et al. [Prevalence of canine infection from endemic areas of American cutaneous leishmaniasis in Paracambi District, Rio de Janeiro State, between 1992 and 1993]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2005 Apr;38(2):161–6.
24. Akhoundi M, Downing T, Votýpka J, Kuhls K, Lukeš J, Cannet A, et al. *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. *Mol Aspects Med*. 2017 Jan 31;
25. Souza NA, Brazil RP, Araki AS. The current status of the *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) species complex. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017 Mar;112(3):161–74.
26. Grimaldi GJ, Tesh RB. Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research. *Clin Microbiol Rev*. 1993 Jul;6(3):230–50.
27. Killick-Kendrick R. The biology and control of phlebotomine sand flies. *Clin Dermatol*. 1999 Jun;17(3):279–89.
28. Miranda JC, Reis E, Schriefer A, Gonçalves M, Reis MG, Carvalho L, et al. Frequency of infection of *Lutzomyia* Phlebotomines with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian Endemic Area as Assessed by Pinpoint Capture and Polymerase Chain Reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002 Mar;97(2):185–8.
29. Rebêlo JMM, Assunção Júnior AN, Silva O, Moraes JLP. Occurrence of sand flies (Diptera, Psychodidae) in leishmaniasis foci in an ecotourism area around the Lençóis Maranhenses National Park, Brazil. *Cad Saúde Pública*. 2010 Jan;26(1):195–8.
30. Aguilar CM, Rangel EF, Garcia L, Fernandez E, Momen H, Grimaldi Filho G, et al. Zoonotic cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with domestic animals in Venezuela and Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1989 Mar;84(1):19–28.
31. Da-Cruz AM, Pirmez C. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*. 1st ed. Rio de Janeiro - Guanabara Koogan: Coura, JR; 2005.
32. Bañuls A-L, Hide M, Prugnolle F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol*. 2007;64:1–109.
33. Sharma U, Singh S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis*. 2008 Dec;45(4):255–72.
34. Cardo LJ. *Leishmania*: risk to the blood supply. *Transfusion (Paris)*. 2006 Sep;46(9):1641–5.

35. Panagopoulos P, Mitsopoulos V, Papadopoulos A, Theodorou S, Christodoulaki C, Aloupogiannis K, et al. Visceral leishmaniasis during pregnancy: A rare case report from Greece. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Feb;11(2):e0005134.
36. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Aug;9(8):604–15.
37. Azeredo-Coutinho RB, Mendonca SC. Formas Clínicas das Leishmanioses Tegumentares nas Américas. In: *Leishmanioses do Continente Americano*. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz: Conceição-Silva, F.; Alvez, C.R.; 2014.
38. WHO. Control of leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee. [Internet]. 2010. Available from: http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf
39. Follador I, Araújo C, Bacellar O, Araújo CB, Carvalho LP, Almeida RP, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am*. 2002 Jun 1;34(11):E54-58.
40. 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*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 Aug;102(5):625–30.
41. Reithinger R, Dujardin J-C, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*. 2007 Sep;7(9):581–96.
42. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am*. 2012 Jun;26(2):293–307.
43. Costa JM, Vale KC, França F, Saldanha AC, da Silva JO, Lago EL, et al. [Spontaneous healing of leishmaniasis caused by *Leishmania viannia braziliensis* in cutaneous lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 1990 Dec;23(4):205–8.
44. Fagundes A, Schubach A, Paula CC de, Bogio A, Antonio L de F, Schiavoni PB, et al. Evaluation of polymerase chain reaction in the routine diagnosis for tegumentary leishmaniasis in a referral centre. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2010 Feb;105(1):109–12.
45. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, et al. Detection of *Leishmania* DNA by polymerase chain reaction in scars of treated human patients. *J Infect Dis*. 1998 Sep;178(3):911–4.
46. Schubach A, Marzochi MC, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Araujo ML, Oliveira AL, et al. Cutaneous scars in American tegumentary leishmaniasis patients: a site of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* persistence and viability eleven years after antimonial therapy and clinical cure. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 Jun;58(6):824–7.
47. Scorza BM, Carvalho EM, Wilson ME. Cutaneous Manifestations of Human and Murine Leishmaniasis. *Int J Mol Sci*. 2017 Jun 18;18(6).
48. Oliveira-Neto MP, Mattos M, Souza CS, Fernandes O, Pirmez C. Leishmaniasis recidiva cutis in New World cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1998 Nov;37(11):846–9.
49. Bittencourt AL, Costa JM, Carvalho EM, Barral A. Leishmaniasis recidiva cutis in American cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*. 1993 Nov;32(11):802–5.
50. Calvopina M, Uezato H, Gomez EA, Korenaga M, Nonaka S, Hashiguchi Y. Leishmaniasis recidiva cutis due to *Leishmania* (*Viannia*) *panamensis* in subtropical Ecuador: isoenzymatic characterization. *Int J Dermatol*. 2006 Feb;45(2):116–20.
51. Landau M, Srebrnik A, Brenner S. Leishmaniasis recidivans mimicking lupus vulgaris. *Int J Dermatol*. 1996 Aug;35(8):572–3.

52. Mavilia L, Rossi R, Massi D, Difonzo EM, Campolmi P, Cappugi P. Leishmaniasis recidiva cutis: an unusual two steps recurrence. *Int J Dermatol.* 2002 Aug;41(8):506–7.
53. Stefanidou MP, Antoniou M, Koutsopoulos AV, Neofytou YT, Krasagakis K, Krüger-Krasagakis S, et al. A rare case of leishmaniasis recidiva cutis evolving for 31 years caused by *Leishmania tropica*. *Int J Dermatol.* 2008 Jun;47(6):588–9.
54. Ghersetich I, Menchini G, Teofoli P, Lotti T. Immune response to *Leishmania* infection in human skin. *Clin Dermatol.* 1999 Jun;17(3):333–8.
55. Carvalho EM, Barral A, Costa JM, Bittencourt A, Marsden P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 1994 Apr;56(4):315–25.
56. Machado PR, Rosa MEA, Costa D, Mignac M, Silva JS, Schriefer A, et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2011 Aug;105(8):438–44.
57. Couppié P, Clyti E, Sainte-Marie D, Dedet JP, Carme B, Pradinaud R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. *Am J Trop Med Hyg.* 2004 Nov;71(5):558–60.
58. Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002 Dec 15;186(12):1829–34.
59. Costa JM, Marsden PD, Llanos-Cuentas EA, Netto EM, Carvalho EM, Barral A, et al. Disseminated cutaneous leishmaniasis in a field clinic in Bahia, Brazil: a report of eight cases. *J Trop Med Hyg.* 1986 Dec;89(6):319–23.
60. Jirmanus L, Glesby MJ, Guimarães LH, Lago E, Rosa ME, Machado PR, et al. 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.* 2012 Mar;86(3):426–33.
61. Bryceson AD. Diffuse cutaneous leishmaniasis in Ethiopia. I. The clinical and histological features of the disease. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1969;63(6):708–37.
62. Convit J, Pinardi ME, Rondón AJ. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1972;66(4):603–10.
63. Barral A, Costa JM, Bittencourt AL, Barral-Netto M, Carvalho EM. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic aspects. *Int J Dermatol.* 1995 Jul;34(7):474–9.
64. Costa AAUML, Saldanha ACR, Leite BMC, Ramos B, Junior IA, Noronha ALL, et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). *Acta Trop.* 2005 Oct;96(1):9–15.
65. Marsden PD. Mucosal leishmaniasis (“espundia” Escomel, 1911). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1986;80(6):859–76.
66. Amato VS, de Andrade HF, Duarte MIS. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. *Acta Trop.* 2003 Jan;85(1):39–49.
67. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, et al. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol Baltim Md 1950.* 1985 Dec;135(6):4144–8.
68. Strazzulla A, Cocuzza S, Pinzone MR, Postorino MC, Cosentino S, Serra A, et al. Mucosal leishmaniasis: an underestimated presentation of a neglected disease. *BioMed Res Int.* 2013;2013:805108.

69. Saravia NG, Holguín AF, McMahon-Pratt D, D'Alessandro A. Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *Am J Trop Med Hyg.* 1985 Jul;34(4):714–20.
70. Santrich C, Segura I, Arias AL, Saravia NG. Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *Am J Trop Med Hyg.* 1990 Jan;42(1):51–5.
71. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D, Ribeiro de Jesus A, et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1991 May;44(5):536–46.
72. Guerra JA de O, Prestes SR, Silveira H, Coelho LI de ARC, Gama P, Moura A, et al. Mucosal Leishmaniasis Caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis* in the Brazilian Amazon. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011 Mar 8;5(3):e980.
73. El Hajj L, Thellier M, Carrière J, Bricaire F, Danis M, Caumes E. Localized cutaneous leishmaniasis imported into Paris: a review of 39 cases. *Int J Dermatol.* 2004 Feb;43(2):120–5.
74. Scarisbrick JJ, Chiodini PL, Watson J, Moody A, Armstrong M, Lockwood D, et al. Clinical features and diagnosis of 42 travellers with cutaneous leishmaniasis. *Travel Med Infect Dis.* 2006 Jan;4(1):14–21.
75. Lederman ER, Weld LH, Elyazar IRF, von Sonnenburg F, Loutan L, Schwartz E, et al. Dermatologic conditions of the ill returned traveler: an analysis from the GeoSentinel Surveillance Network. *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2008 Nov;12(6):593–602.
76. David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther.* 2009 Dec;22(6):491–502.
77. Schubach A, Cuzzi-Maya T, Oliveira AV, Sartori A, de Oliveira-Neto MP, Mattos MS, et al. Leishmanial antigens in the diagnosis of active lesions and ancient scars of American tegumentary leishmaniasis patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2001 Oct;96(7):987–96.
78. de Mello CX, de Oliveira Schubach A, de Oliveira RVC, Conceição-Silva F, Pimentel MIF, Lyra MR, et al. Comparison of the sensitivity of imprint and scraping techniques in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis in a referral centre in Rio de Janeiro, Brazil. *Parasitol Res.* 2011 Sep;109(3):927–33.
79. Goto H, Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010 Apr;8(4):419–33.
80. Shaw JJ, Lainson R. Leishmaniasis in Brazil: X. Some observations of intradermal reactions to different trypanosomatid antigens of patients suffering from cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1975;69(3):323–35.
81. Reed SG. Diagnosis of leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 1996 Oct;14(5):471–8.
82. Sassi A, Louzir H, Ben Salah A, Mokni M, Ben Osman A, Dellagi K. Leishmanin skin test lymphoproliferative responses and cytokine production after symptomatic or asymptomatic *Leishmania major* infection in Tunisia. *Clin Exp Immunol.* 1999 Apr;116(1):127–32.
83. Guimarães MC, Celeste BJ, Franco EL, Cucé LC, Belda W Jr. Evaluation of serological diagnostic indices for mucocutaneous leishmaniasis: immunofluorescence tests and enzyme-linked immunoassays for IgG, IgM and IgA antibodies. *Bull World Health Organ.* 1989;67(6):643–8.
84. Guimarães MC, Celeste BJ, Franco EL. Diagnostic performance indices for immunofluorescent tests and enzyme immunoassays of leishmaniasis sera from northern and north-eastern Brazil. *Bull World Health Organ.* 1990;68(1):39–43.
85. Romero GAS, de la Glória Orge Orge M, de Farias Guerra MV, Paes MG, de Oliveira Macêdo V, de Carvalho EM. Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis infected by

- Leishmania (Viannia) braziliensis or Leishmania (Viannia) guyanensis in Brazil. *Acta Trop.* 2005 Jan;93(1):49–56.
86. Barroso-Freitas APT, Passos SRL, Mouta-Confort E, Madeira MF, Schubach AO, Santos GPL, et al. Accuracy of an ELISA and indirect immunofluorescence for the laboratory diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2009 Apr;103(4):383–9.
 87. Sati MH. Antimony treatment of Sudan kala-azar. *Ann Trop Med Parasitol.* 1942;36.
 88. Kirk R, Sati MH. Further Notes on Some Cases of Sudan Kala-Azar Treated with Certain Aromatic Diamidines. *Ann Trop Med Parasitol.* 1943 Apr 30;37(1):34–7.
 89. Berman JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis.* 1988 Jun;10(3):560–86.
 90. Herwaldt BL, Berman JD. Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Mar;46(3):296–306.
 91. Oliveira Neto MP, Schubach A, Araujo ML, Pirmez C. High and low doses of antimony (Sbv) in American cutaneous leishmaniasis. A five years follow-up study of 15 patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1996 Apr;91(2):207–9.
 92. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Gonçalves-Costa SC, Pirmez C. 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).* 1997 Jun;45(6):496–9.
 93. Oliveira-Neto MP, Schubach A, Mattos M, Goncalves-Costa SC, Pirmez C. A low-dose antimony treatment in 159 patients with American cutaneous leishmaniasis: extensive follow-up studies (up to 10 years). *Am J Trop Med Hyg.* 1997 Dec;57(6):651–5.
 94. Schubach A de O, Marzochi KBF, Moreira JS, Schubach TMP, Araújo ML, Vale ACF do, et al. Retrospective study of 151 patients with cutaneous leishmaniasis treated with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2005 Jun;38(3):213–7.
 95. Schubach AO, Conceição-Silva F. Estado da Arte no Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. In: *Leishmanioses do Continente Americano.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2014.
 96. Saheki MN, Lyra MR, Bedoya-Pacheco SJ, Antônio L de F, Pimentel MIF, Salgueiro M de M, et al. Low versus high dose of antimony for American cutaneous leishmaniasis: A randomized controlled blind non-inferiority trial in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS One.* 2017;12(5):e0178592.
 97. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira RV, Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop.* 2011 May;118(2):87–96.
 98. Wolf Nassif P, DE Mello TFP, Navasconi TR, Mota CA, Demarchi IG, Aristides SMA, et al. Safety and efficacy of current alternatives in the topical treatment of cutaneous leishmaniasis: a systematic review. *Parasitology.* 2017 Apr 3;1–10.
 99. Machado PR, Ampuero J, Guimarães LH, Villasboas L, Rocha AT, Schriefer A, et al. Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(12):e912.
 100. Sundar S, Chakravarty J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. *Expert Opin Pharmacother.* 2013 Jan;14(1):53–63.
 101. Grogil M, Thomason TN, Franke ED. Drug resistance in leishmaniasis: its implication in systemic chemotherapy of cutaneous and mucocutaneous disease. *Am J Trop Med Hyg.* 1992 Jul;47(1):117–26.

102. Romero GA, Guerra MV, Paes MG, Macêdo VO. Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. *Am J Trop Med Hyg.* 2001 Nov;65(5):456–65.
103. de Azeredo-Coutinho RBG, Mendonça SCF. An intermittent schedule is better than continuous regimen of antimonial therapy for cutaneous leishmaniasis in the municipality of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2002 Oct;35(5):477–81.
104. Morgado FN, Schubach A, Vasconcellos E, Azeredo-Coutinho RB, Valeti-Rosalino CM, Quintella LP, et al. Signs of an in situ inflammatory reaction in scars of human American tegumentary leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2010 Apr;32(4):285–95.
105. Mendonça MG, de Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis.* 2004 Mar 15;189(6):1018–23.
106. De Luca PM, Macedo ABB. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of Quality. *Front Immunol.* 2016;7:151.
107. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2016 Sep;16(9):581–92.
108. Carrada G, Cañeda C, Salaiza N, Delgado J, Ruiz A, Sanchez B, et al. Monocyte cytokine and costimulatory molecule expression in patients infected with *Leishmania mexicana*. *Parasite Immunol.* 2007 Mar;29(3):117–26.
109. Schnorr D, Muniz AC, Passos S, Guimaraes LH, Lago EL, Bacellar O, et al. IFN- γ Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012 Dec;6(12):e1947.
110. Abdeladhim M, Kamhawi S, Valenzuela JG. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. *Infect Genet Evol J Mol Epidemiol Evol Genet Infect Dis.* 2014 Dec;28:691–703.
111. de Oliveira Cardoso F, de Souza C da SF, Mendes VG, Abreu-Silva AL, Gonçalves da Costa SC, Calabrese K da S. Immunopathological studies of *Leishmania amazonensis* infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis.* 2010 Jun 15;201(12):1933–40.
112. Ashour DS. Toll-like receptor signaling in parasitic infections. *Expert Rev Clin Immunol.* 2015 Jun;11(6):771–80.
113. Carlsen ED, Liang Y, Shelite TR, Walker DH, Melby PC, Soong L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2015 Nov;182(2):109–18.
114. Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, Froment GS, Soares RPP, Morgado FN, Conceição-Silva F, et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Apr 21;106(16):6748–53.
115. Rochael NC, Guimarães-Costa AB, Nascimento MTC, DeSouza-Vieira TS, Oliveira MP, Garcia e Souza LF, et al. Classical ROS-dependent and early/rapid ROS-independent release of Neutrophil Extracellular Traps triggered by *Leishmania* parasites. *Sci Rep.* 2015 Dec 17;5:18302.
116. Savill J. Apoptosis in resolution of inflammation. *Kidney Blood Press Res.* 2000;23(3–5):173–4.
117. van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2004 Dec 1;173(11):6521–5.
118. Afonso L, Borges VM, Cruz H, Ribeiro-Gomes FL, DosReis GA, Dutra AN, et al. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. *J Leukoc Biol.* 2008 Aug;84(2):389–96.

119. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog.* 2012 Feb;8(2):e1002536.
120. Ribeiro-Gomes FL, Romano A, Lee S, Roffê E, Peters NC, Debrabant A, et al. Apoptotic cell clearance of *Leishmania major*-infected neutrophils by dendritic cells inhibits CD8⁺ T-cell priming in vitro by Mer tyrosine kinase-dependent signaling. *Cell Death Dis.* 2015 Dec 10;6:e2018.
121. Ng LG, Hsu A, Mandell MA, Roediger B, Hoeller C, Mrass P, et al. Migratory dermal dendritic cells act as rapid sensors of protozoan parasites. *PLoS Pathog.* 2008 Nov;4(11):e1000222.
122. Goncalves R, Zhang X, Cohen H, Debrabant A, Mosser DM. Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. *J Exp Med.* 2011 Jun 6;208(6):1253–65.
123. Bogdan C, Röllinghoff M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? *Parasitol Today Pers Ed.* 1999 Jan;15(1):22–8.
124. Novais FO, Nguyen BT, Beiting DP, Carvalho LP, Glennie ND, Passos S, et al. Human classical monocytes control the intracellular stage of *Leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. *J Infect Dis.* 2014 Apr 15;209(8):1288–96.
125. Bogdan C. Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2001 Oct;2(10):907–16.
126. Iniesta V, Gómez-Nieto LC, Corraliza I. The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages. *J Exp Med.* 2001 Mar 19;193(6):777–84.
127. Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A. Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends Parasitol.* 2004 Mar;20(3):126–33.
128. Kreider T, Anthony RM, Urban JF Jr, Gause WC. Alternatively activated macrophages in helminth infections. *Curr Opin Immunol.* 2007 Aug;19(4):448–53.
129. Ruiz JH, Becker I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2007 Dec;29(12):671–8.
130. da Silva Santos C, Brodskyn CI. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human Cutaneous Leishmaniasis. *Front Public Health.* 2014;2:165.
131. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.* 1988 Nov 1;168(5):1675–84.
132. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 2014 Apr;66(2):127–32.
133. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett.* 2005 Nov 15;101(2):226–30.
134. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006 Jun;24(6):677–88.
135. Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood.* 2008 Sep 1;112(5):1557–69.
136. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012 Jul 2;209(7):1241–53.

137. Swain SL, McKinstry KK, Strutt TM. Expanding roles for CD4⁺ T cells in immunity to viruses. *Nat Rev Immunol*. 2012 Jan 20;12(2):136–48.
138. Brown DM. Cytolytic CD4 cells: Direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell Immunol*. 2010;262(2):89–95.
139. 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 Nov 1;159(9):4467–73.
140. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol EJD*. 2002 Oct;12(5):449–51.
141. 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 Aug;31(8):432–9.
142. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2013;9(7):e1003504.
143. Santos C da S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2013 Jun;133(6):1533–40.
144. 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 Mar;83(3):898–906.
145. Wagner H, Starzinski-Powitz A, Jung H, Röllinghoff M. Induction of I region-restricted hapten-specific cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1977 Oct;119(4):1365–8.
146. Feighery C, Stastny P. HLA-D region-associated determinants serve as targets for human cell-mediated lysis. *J Exp Med*. 1979 Feb 1;149(2):485–94.
147. Fleischer B. Acquisition of specific cytotoxic activity by human T4+ T lymphocytes in culture. *Nature*. 1984 Mar 22;308(5957):365–7.
148. Tite JP, Janeway CA Jr. Cloned helper T cells can kill B lymphoma cells in the presence of specific antigen: Ia restriction and cognate vs. noncognate interactions in cytolysis. *Eur J Immunol*. 1984 Oct;14(10):878–86.
149. Lukacher AE, Morrison LA, Braciale VL, Malissen B, Braciale TJ. Expression of specific cytolytic activity by H-2I region-restricted, influenza virus-specific T lymphocyte clones. *J Exp Med*. 1985 Jul 1;162(1):171–87.
150. Maimone MM, Morrison LA, Braciale VL, Braciale TJ. Features of target cell lysis by class I and class II MHC-restricted cytolytic T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1986 Dec 1;137(11):3639–43.
151. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:954602.
152. Juno JA, van Bockel D, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders JJ, Munier CML. Cytotoxic CD4 T Cells—Friend or Foe during Viral Infection? *Front Immunol [Internet]*. 2017 [cited 2017 Feb 13];8. Available from: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2017.00019/abstract>
153. 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 Sep;76(3):311–9.

154. Menezes CAS, Sullivan AK, Falta MT, Mack DG, Freed BM, Rocha MOC, et al. Highly conserved CDR3 region in circulating CD4(+)V β 5(+) T cells may be associated with cytotoxic activity in Chagas disease. *Clin Exp Immunol*. 2012 Aug;169(2):109–18.
155. Kyaw T, Peter K, Li Y, Tipping P, Toh B-H, Bobik A. Cytotoxic lymphocytes and atherosclerosis: significance, mechanisms and therapeutic challenges. *Br J Pharmacol*. 2017 May 4;
156. Meng F, Zhen S, Song B. HBV-specific CD4+ cytotoxic T cells in hepatocellular carcinoma are less cytolytic toward tumor cells and suppress CD8+ T cell-mediated antitumor immunity. *APMIS Acta Pathol Microbiol Immunol Scand*. 2017 May 11;
157. Thewissen M, Somers V, Hellings N, Fraussen J, Damoiseaux J, Stinissen P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Nov 15;179(10):6514–23.
158. Takeuchi A, Saito T. CD4 CTL, a Cytotoxic Subset of CD4(+) T Cells, Their Differentiation and Function. *Front Immunol*. 2017;8:194.
159. Williams NS, Engelhard VH. Identification of a population of CD4+ CTL that utilizes a perforin-rather than a Fas ligand-dependent cytotoxic mechanism. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1996 Jan 1;156(1):153–9.
160. Echchakir H, Bagot M, Dorothée G, Martinvalet D, Le Gouvello S, Boumsell L, et al. Cutaneous T cell lymphoma reactive CD4+ cytotoxic T lymphocyte clones display a Th1 cytokine profile and use a fas-independent pathway for specific tumor cell lysis. *J Invest Dermatol*. 2000 Jul;115(1):74–80.
161. Dotiwala F, Mulik S, Polidoro RB, Ansara JA, Burleigh BA, Walch M, et al. Killer lymphocytes use granulysin, perforin and granzymes to kill intracellular parasites. *Nat Med*. 2016 Feb;22(2):210–6.
162. Faroudi M, Utzny C, Salio M, Cerundolo V, Guiraud M, Müller S, et al. Lytic versus stimulatory synapse in cytotoxic T lymphocyte/target cell interaction: manifestation of a dual activation threshold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Nov 25;100(24):14145–50.
163. Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I, Trapani JA. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol*. 2012 Aug;33(8):406–12.
164. Page LJ, Darmon AJ, Uellner R, Griffiths GM. L is for lytic granules: lysosomes that kill. *Biochim Biophys Acta*. 1998 Feb 4;1401(2):146–56.
165. Balaji KN, Schaschke N, Machleidt W, Catalfamo M, Henkart PA. Surface cathepsin B protects cytotoxic lymphocytes from self-destruction after degranulation. *J Exp Med*. 2002 Aug 19;196(4):493–503.
166. Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krähenbühl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*. 1991 May 1;173(5):1099–109.
167. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods*. 2003 Oct 1;281(1–2):65–78.
168. Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J Immunol Methods*. 2004 Nov;294(1–2):15–22.
169. Sáez-Borderías A, Gumá M, Angulo A, Bellosillo B, Pende D, López-Botet M. Expression and function of NKG2D in CD4+ T cells specific for human cytomegalovirus. *Eur J Immunol*. 2006 Dec;36(12):3198–206.

170. Graham CM, Christensen JR, Thomas DB. Differential induction of CD94 and NKG2 in CD4 helper T cells. A consequence of influenza virus infection and interferon-gamma? *Immunology*. 2007 Jun;121(2):238–47.
171. Workman AM, Jacobs AK, Vogel AJ, Condon S, Brown DM. Inflammation enhances IL-2 driven differentiation of cytolytic CD4 T cells. *PLoS One*. 2014;9(2):e89010.
172. Gagnon SJ, Ennis FA, Rothman AL. Bystander target cell lysis and cytokine production by dengue virus-specific human CD4(+) cytotoxic T-lymphocyte clones. *J Virol*. 1999 May;73(5):3623–9.
173. Appay V, Zaunders JJ, Papagno L, Sutton J, Jaramillo A, Waters A, et al. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2002 Jun 1;168(11):5954–8.
174. Brien JD, Uhrlaub JL, Nikolich-Zugich J. West Nile virus-specific CD4 T cells exhibit direct antiviral cytokine secretion and cytotoxicity and are sufficient for antiviral protection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Dec 15;181(12):8568–75.
175. Brown DM, Kamperschroer C, Dilzer AM, Roberts DM, Swain SL. IL-2 and antigen dose differentially regulate perforin- and FasL-mediated cytolytic activity in antigen specific CD4+ T cells. *Cell Immunol*. 2009;257(1–2):69–79.
176. Bertholet S, Goldszmid R, Morrot A, Debrabant A, Afrin F, Collazo-Custodio C, et al. Leishmania antigens are presented to CD8+ T cells by a transporter associated with antigen processing-independent pathway in vitro and in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 Sep 15;177(6):3525–33.
177. Novais FO, Scott P. CD8(+) T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol*. 2015 Mar 24;
178. Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002 Apr;2(4):251–62.
179. Jordan KA, Hunter CA. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol*. 2010 Nov;126(3):318–25.
180. da Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA, Romero P. Leishmania major infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol*. 1994 Nov;24(11):2813–7.
181. Müller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to Leishmania major. *Infect Immun*. 1994 Jun;62(6):2575–81.
182. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with Leishmania major. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):1137–47.
183. Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu C, Kirman JR, Turon TN, et al. Vaccination with heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell responses and protection against leishmania major infection. *J Exp Med*. 2002 Jun 17;195(12):1565–73.
184. Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose Leishmania major promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1559–66.
185. Bertholet S, Debrabant A, Afrin F, Caler E, Mendez S, Tabbara KS, et al. Antigen requirements for efficient priming of CD8+ T cells by Leishmania major-infected dendritic cells. *Infect Immun*. 2005 Oct;73(10):6620–8.

186. Colmenares M, Kima PE, Samoff E, Soong L, McMahon-Pratt D. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* infection. *Infect Immun*. 2003 Jun;71(6):3172–82.
187. 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 Jun;62(6):2614–8.
188. 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 Jan;31(1):139–42.
189. 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 Mar;9(2):251–6.
190. 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 Sep;153(3):537–43.
191. Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1995 Jan;17(1):21–8.
192. Maretti-Mira AC, Bittner J, Oliveira-Neto MP, Liu M, Kang D, Li H, et al. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(9):e1816.
193. Müller K, van Zandbergen G, Hansen B, Laufs H, Jahnke N, Solbach W, et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. *Med Microbiol Immunol (Berl)*. 2001 Nov;190(1–2):73–6.
194. Bajénoff M, Breart B, Huang AYC, Qi H, Cazareth J, Braud VM, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):619–31.
195. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. 2012 May 29 [cited 2015 Apr 23];2. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3417408/>
196. Cooper MA, Fehniger TA, Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol*. 2001 Nov;22(11):633–40.
197. Moretta A, Bottino C, Mingari MC, Biassoni R, Moretta L. What is a natural killer cell? *Nat Immunol*. 2002 Jan;3(1):6–8.
198. Robertson MJ, Ritz J. Biology and clinical relevance of human natural killer cells. *Blood*. 1990 Dec 15;76(12):2421–38.
199. Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol*. 2005 Jun;6(6):600–7.
200. Loza MJ, Zamai L, Azzoni L, Rosati E, Perussia B. Expression of type 1 (interferon gamma) and type 2 (interleukin-13, interleukin-5) cytokines at distinct stages of natural killer cell differentiation from progenitor cells. *Blood*. 2002 Feb 15;99(4):1273–81.
201. Robertson MJ. Role of chemokines in the biology of natural killer cells. *J Leukoc Biol*. 2002 Feb;71(2):173–83.
202. Dorner BG, Smith HRC, French AR, Kim S, Poursine-Laurent J, Beckman DL, et al. Coordinate expression of cytokines and chemokines by NK cells during murine cytomegalovirus infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Mar 1;172(5):3119–31.

203. Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S, Kaye PM. Posttranscriptional regulation of *IL10* gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity*. 2008 Aug 15;29(2):295–305.
204. Blanca IR, Bere EW, Young HA, Ortaldo JR. Human B cell activation by autologous NK cells is regulated by CD40-CD40 ligand interaction: role of memory B cells and CD5+ B cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Dec 1;167(11):6132–9.
205. Zingoni A, Sornasse T, Cocks BG, Tanaka Y, Santoni A, Lanier LL. Cross-talk between activated human NK cells and CD4+ T cells via OX40-OX40 ligand interactions. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2004 Sep 15;173(6):3716–24.
206. Orange JS, Ballas ZK. Natural killer cells in human health and disease. *Clin Immunol Orlando Fla*. 2006 Jan;118(1):1–10.
207. Chan WK, Kung Sutherland M, Li Y, Zalevsky J, Schell S, Leung W. Antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity overcomes NK cell resistance in MLL-rearranged leukemia expressing inhibitory KIR ligands but not activating ligands. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2012 Nov 15;18(22):6296–305.
208. Zamora-Chimal J, Fernández-Figueroa EA, Ruiz-Remigio A, Wilkins-Rodríguez AA, Delgado-Domínguez J, Salaiza-Suazo N, et al. NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology*. 2017 Feb;222(2):454–62.
209. Chávez-Galán L, Arenas-Del Angel MC, Zenteno E, Chávez R, Lascrain R. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol*. 2009 Feb;6(1):15–25.
210. Lanier LL. Up on the tightrope: natural killer cell activation and inhibition. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):495–502.
211. Yokoyama WM. Mistaken notions about natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):481–5.
212. Yokoyama WM. Inhibitory receptors signal activation. *Immunity*. 2008 Oct 17;29(4):515–7.
213. Lanier LL. On guard--activating NK cell receptors. *Nat Immunol*. 2001 Jan;2(1):23–7.
214. Held W, Kijima M, Angelov G, Bessoles S. The function of natural killer cells: education, reminders and some good memories. *Curr Opin Immunol*. 2011 Apr;23(2):228–33.
215. Maasho K, Sanchez F, Schurr E, Hailu A, Akuffo H. Indications of the protective role of natural killer cells in human cutaneous leishmaniasis in an area of endemicity. *Infect Immun*. 1998 Jun;66(6):2698–704.
216. Nylén S, Maasho K, Söderstrom K, Ilg T, Akuffo H. Live *Leishmania* promastigotes can directly activate primary human natural killer cells to produce interferon-gamma. *Clin Exp Immunol*. 2003 Mar;131(3):457–67.
217. Resnick M, Roguel N, Bercovier H, Enk C, Frankenburg S, Kedar E. Lysis of murine macrophages infected with intracellular pathogens by interleukin 2-activated killer (LAK) cells in vitro. *Cell Immunol*. 1988 Apr 15;113(1):214–9.
218. Scharon TM, Scott P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4+ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. *J Exp Med*. 1993 Aug 1;178(2):567–77.
219. Laskay T, Diefenbach A, Röllinghoff M, Solbach W. Early parasite containment is decisive for resistance to *Leishmania major* infection. *Eur J Immunol*. 1995 Aug;25(8):2220–7.
220. Diefenbach A, Schindler H, Donhauser N, Lorenz E, Laskay T, MacMicking J, et al. Type 1 interferon (IFN α/β) and type 2 nitric oxide synthase regulate the innate immune response to a protozoan parasite. *Immunity*. 1998 Jan;8(1):77–87.

221. Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, Dewan P, Niazi KR, Froelich CJ, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science*. 1998 Oct 2;282(5386):121–5.
222. 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 Oct;62(4):334–41.
223. 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 Sep 9;1–12.
224. Vivier E, Tomasello E, Baratin M, Walzer T, Ugolini S. Functions of natural killer cells. *Nat Immunol*. 2008 May;9(5):503–10.
225. Krebs P, Barnes MJ, Lampe K, Whitley K, Bahjat KS, Beutler B, et al. NK-cell-mediated killing of target cells triggers robust antigen-specific T-cell-mediated and humoral responses. *Blood*. 2009 Jun 25;113(26):6593–602.
226. Prajeeth CK, Haeberlein S, Sebald H, Schleicher U, Bogdan C. *Leishmania*-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity. *Infect Immun*. 2011 Jul;79(7):2699–708.
227. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells: what's in a name? *Nat Rev Immunol*. 2004 Mar;4(3):231–7.
228. Bendelac A, Lantz O, Quimby ME, Yewdell JW, Bennink JR, Brutkiewicz RR. CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes. *Science*. 1995 May 12;268(5212):863–5.
229. Taniguchi M, Seino K-I, Nakayama T. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat Immunol*. 2003 Dec;4(12):1164–5.
230. Brigi M, Brenner MB. CD1: antigen presentation and T cell function. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:817–90.
231. Kronenberg M. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:877–900.
232. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:297–336.
233. Van Kaer L. NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions. *Curr Opin Immunol*. 2007 Jun;19(3):354–64.
234. Porcelli S, Yockey CE, Brenner MB, Balk SP. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J Exp Med*. 1993 Jul 1;178(1):1–16.
235. Dellabona P, Padovan E, Casorati G, Brockhaus M, Lanzavecchia A. An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1171–6.
236. Lantz O, Bendelac A. An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans. *J Exp Med*. 1994 Sep 1;180(3):1097–106.
237. Arrenberg P, Halder R, Kumar V. Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens. *J Cell Physiol*. 2009 Feb;218(2):246–50.

238. Kawano T, Cui J, Koezuka Y, Toura I, Kaneko Y, Motoki K, et al. CD1d-restricted and TCR-mediated activation of valpha14 NKT cells by glycosylceramides. *Science*. 1997 Nov 28;278(5343):1626–9.
239. Rhost S, Sedimbi S, Kadri N, Cardell SL. Immunomodulatory type II natural killer T lymphocytes in health and disease. *Scand J Immunol*. 2012 Sep;76(3):246–55.
240. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med*. 2004 Apr 5;199(7):947–57.
241. Van Rhijn I, Young DC, Im JS, Lavery SB, Illarionov PA, Besra GS, et al. CD1d-restricted T cell activation by nonlipidic small molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Sep 14;101(37):13578–83.
242. Chang DH, Deng H, Matthews P, Krasovsky J, Ragupathi G, Spisek R, et al. Inflammation-associated lysophospholipids as ligands for CD1d-restricted T cells in human cancer. *Blood*. 2008 Aug 15;112(4):1308–16.
243. Arrenberg P, Halder R, Dai Y, Maricic I, Kumar V. Oligoclonality and innate-like features in the TCR repertoire of type II NKT cells reactive to a beta-linked self-glycolipid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Jun 15;107(24):10984–9.
244. Godfrey DI, Pellicci DG, Patel O, Kjer-Nielsen L, McCluskey J, Rossjohn J. Antigen recognition by CD1d-restricted NKT T cell receptors. *Semin Immunol*. 2010 Apr;22(2):61–7.
245. Van Kaer L, Parekh VV, Wu L. Invariant natural killer T cells: bridging innate and adaptive immunity. *Cell Tissue Res*. 2011 Jan;343(1):43–55.
246. Godfrey DI, Kronenberg M. Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells. *J Clin Invest*. 2004 Nov;114(10):1379–88.
247. Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T, Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195(5):625–36.
248. Lee PT, Benlagha K, Teyton L, Bendelac A. Distinct functional lineages of human V(alpha)24 natural killer T cells. *J Exp Med*. 2002 Mar 4;195(5):637–41.
249. Chen X, Wang X, Besra GS, Gumperz JE. Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by CD4. *J Leukoc Biol*. 2007 Dec;82(6):1455–65.
250. Thedrez A, de Lalla C, Allain S, Zaccagnino L, Sidobre S, Garavaglia C, et al. CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4+ invariant NKT cells. *Blood*. 2007 Jul 1;110(1):251–8.
251. Godfrey DI, Stankovic S, Baxter AG. Raising the NKT cell family. *Nat Immunol*. 2010 Mar;11(3):197–206.
252. O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, Atzberger A, Hogan AE, Jackson J, et al. Distinct and Overlapping Effector Functions of Expanded Human CD4+, CD8α+ and CD4-CD8α- Invariant Natural Killer T Cells. *PLoS ONE* [Internet]. 2011 Dec 12 [cited 2013 Jan 11];6(12). Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3236218/>
253. Teige A, Bockermann R, Hasan M, Olofsson KE, Liu Y, Issazadeh-Navikas S. CD1d-dependent NKT cells play a protective role in acute and chronic arthritis models by ameliorating antigen-specific Th1 responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Jul 1;185(1):345–56.
254. Amprey JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Illarionov PA, Besra GS, et al. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J Exp Med*. 2004 Oct 4;200(7):895–904.

255. Karmakar S, Paul J, De T. Leishmania donovani glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. *Eur J Immunol*. 2011 May;41(5):1376–87.
256. Zajonc DM, Girardi E. Recognition of Microbial Glycolipids by Natural Killer T Cells. *Front Immunol* [Internet]. 2015 Aug 4 [cited 2017 Mar 14];6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4523824/>
257. Nagarajan NA, Kronenberg M. Invariant NKT cells amplify the innate immune response to lipopolysaccharide. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2007 Mar 1;178(5):2706–13.
258. Donovan MJ, Jayakumar A, McDowell MA. Inhibition of groups 1 and 2 CD1 molecules on human dendritic cells by Leishmania species. *Parasite Immunol*. 2007 Oct;29(10):515–24.
259. 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 Sep;12(9):1267–74.
260. Wiethe C, Debus A, Mohrs M, Steinkasserer A, Lutz M, Gessner A. Dendritic cell differentiation state and their interaction with NKT cells determine Th1/Th2 differentiation in the murine model of Leishmania major infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Apr 1;180(7):4371–81.
261. Zamora-Chimal J, Hernández-Ruiz J, Becker I. NKT cells in leishmaniasis. *Immunobiology*. 2016 Dec 5;
262. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol*. 2011 Jun;12(6):492–9.
263. Trimble LA, Kam LW, Friedman RS, Xu Z, Lieberman J. CD3zeta and CD28 down-modulation on CD8 T cells during viral infection. *Blood*. 2000 Aug 1;96(3):1021–9.
264. Reignat S, Webster GJM, Brown D, Ogg GS, King A, Seneviratne SL, et al. Escaping high viral load exhaustion: CD8 cells with altered tetramer binding in chronic hepatitis B virus infection. *J Exp Med*. 2002 May 6;195(9):1089–101.
265. Moskophidis D, Lechner F, Pircher H, Zinkernagel RM. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature*. 1993 Apr 22;362(6422):758–61.
266. Zajac AJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, Sourdive DJ, Suresh M, Altman JD, et al. Viral immune evasion due to persistence of activated T cells without effector function. *J Exp Med*. 1998 Dec 21;188(12):2205–13.
267. Wherry EJ, Blattman JN, Murali-Krishna K, van der Most R, Ahmed R. Viral persistence alters CD8 T-cell immunodominance and tissue distribution and results in distinct stages of functional impairment. *J Virol*. 2003 Apr;77(8):4911–27.
268. Virgin HW, Wherry EJ, Ahmed R. Redefining chronic viral infection. *Cell*. 2009 Jul 10;138(1):30–50.
269. Chang W-S, Kim J-Y, Kim Y-J, Kim Y-S, Lee J-M, Azuma M, et al. Cutting edge: Programmed death-1/programmed death ligand 1 interaction regulates the induction and maintenance of invariant NKT cell anergy. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2008 Nov 15;181(10):6707–10.
270. Moll M, Kuylensstierna C, Gonzalez VD, Andersson SK, Bosnjak L, Sönnernborg A, et al. Severe functional impairment and elevated PD-1 expression in CD1d-restricted NKT cells retained during chronic HIV-1 infection. *Eur J Immunol*. 2009 Mar;39(3):902–11.
271. Durgan K, Ali M, Warner P, Latchman YE. Targeting NKT cells and PD-L1 pathway results in augmented anti-tumor responses in a melanoma model. *Cancer Immunol Immunother Cll*. 2011 Apr;60(4):547–58.

272. Kee S-J, Kwon Y-S, Park Y-W, Cho Y-N, Lee S-J, Kim T-J, et al. Dysfunction of natural killer T cells in patients with active Mycobacterium tuberculosis infection. *Infect Immun*. 2012 Jun;80(6):2100–8.
273. Singh A, Dey AB, Mohan A, Mitra DK. Programmed death-1 receptor suppresses γ -IFN producing NKT cells in human tuberculosis. *Tuberc Edinb Scotl*. 2014 May;94(3):197–206.
274. Della Chiesa M, Pesce S, Muccio L, Carlomagno S, Sivori S, Moretta A, et al. Features of Memory-Like and PD-1(+) Human NK Cell Subsets. *Front Immunol*. 2016;7:351.
275. Schön MP, Zollner TM, Boehncke W-H. The Molecular Basis of Lymphocyte Recruitment to the Skin: Clues for Pathogenesis and Selective Therapies of Inflammatory Disorders. *J Invest Dermatol*. 2003 Nov 1;121(5):951–62.
276. Santamaría-Babí LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol EJD*. 2004 Feb;14(1):13–8.
277. Sigmundsdóttir H, Gudjónsson JE, Jónsdóttir I, Lúdvíksson BR, Valdimarsson H. The frequency of CLA+ CD8+ T cells in the blood of psoriasis patients correlates closely with the severity of their disease. *Clin Exp Immunol*. 2001 Nov;126(2):365–9.
278. Antúnez C, Torres MJ, Mayorga C, Cornejo-García JA, Santamaría-Babí LF, Blanca M. Different cytokine production and activation marker profiles in circulating cutaneous-lymphocyte-associated antigen T cells from patients with acute or chronic atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy J Br Soc Allergy Clin Immunol*. 2004 Apr;34(4):559–66.
279. Mendes-Aguiar C de O, Gomes-Silva A, Nunes E, Pereira-Carvalho R, Nogueira RS, Oliveira-Neto M de P, et al. 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*. 2009 Sep;157(3):377–84.
280. Cunha CF. Avaliação da Citotoxicidade na Evolução para a Cura Clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana [Dissertação de Mestrado]. [Rio de Janeiro]: Instituto Oswaldo Cruz; Fundação Oswaldo Cruz; 2013.
281. 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 Jan;97(1):31–8.
282. Macedo ABB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, Mendonça SCF, Marins-Dos-Santos A, de Fatima Madeira M, et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol*. 2012 Mar;167(3):505–13.
283. Billings P, Burakoff S, Dorf ME, Benacerraf B. Cytotoxic T lymphocytes specific for I region determinants do not require interactions with H-2K or D gene products. *J Exp Med*. 1977 May 1;145(5):1387–92.
284. Appay V. The physiological role of cytotoxic CD4(+) T-cells: the holy grail? *Clin Exp Immunol*. 2004 Oct;138(1):10–3.
285. Bengsch B, Ohtani T, Herati RS, Bovenschen N, Chang K-M, Wherry EJ. Deep immune profiling by mass cytometry links human T and NK cell differentiation and cytotoxic molecule expression patterns. *J Immunol Methods* [Internet]. [cited 2017 Apr 6]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022175917301321>
286. Voskoboinik I, Whisstock JC, Trapani JA. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nat Rev Immunol*. 2015 Jun;15(6):388–400.
287. Cruz-Guilloty F, Pipkin ME, Djuretic IM, Levanon D, Lotem J, Lichtenheld MG, et al. Runx3 and T-box proteins cooperate to establish the transcriptional program of effector CTLs. *J Exp Med*. 2009 Jan 16;206(1):51–9.

288. Glennie ND, Scott P. Memory T cells in cutaneous leishmaniasis. *Cell Immunol.* 2016 Nov;309:50–4.
289. 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 Jan;96(1):89–98.
290. Reis LC, Brito MEF, Souza MA, Medeiros ACR, Silva CJ, Luna CF, et al. Cellular immune response profile in patients with American tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. *J Clin Lab Anal.* 2009;23(1):63–9.
291. Carvalho AM, Magalhães A, Carvalho LP, Bacellar O, Scott P, Carvalho EM. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis.* 2013;13:529.
292. Naouar I, Boussoffara T, Ben Ahmed M, Belhaj Hmida N, Gharbi A, Gritli S, et al. Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. *Mediators Inflamm.* 2014;2014:636039.
293. Mou Z, Muleme HM, Liu D, Jia P, Okwor IB, Kuriakose SM, et al. Parasite-derived arginase influences secondary anti-*Leishmania* immunity by regulating programmed cell death-1-mediated CD4+ T cell exhaustion. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2013 Apr 1;190(7):3380–9.
294. 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(1):74.
295. 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 Mar;33(3):317–25.
296. de Oliveira Mendes-Aguiar C, Vieira-Gonçalves R, Guimarães LH, de Oliveira-Neto MP, Carvalho EM, Da-Cruz AM. Effector memory CD4+ T cells differentially express activation associated molecules depending on the duration of American cutaneous leishmaniasis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2016 Aug 1;185(2):202–9.
297. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, Lyra MR, Pereira-Da-Silva T, Schubach AO, et al. CD3(+)CD4(neg)CD8(neg) (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a(+) cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors.* 2017 May 3;10(1):219.
298. Trautmann A, Rückert B, Schmid-Grendelmeier P, Niederer E, Bröcker E-B, Blaser K, et al. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. *Immunology.* 2003 Mar;108(3):305–12.
299. Cañeda-Guzmán IC, Salaiza-Suazo N, Fernández-Figueroa EA, Carrada-Figueroa G, Aguirre-García M, Becker I. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: a comparative study of TLRs and cytokines. *PloS One.* 2014;9(11):e112410.
300. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, et al. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol.* 2008 Aug;153(2):221–30.
301. 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.
302. Inngjerdigen M, Kveberg L, Naper C, Vaage JT. Natural killer cell subsets in man and rodents. *Tissue Antigens.* 2011 Aug;78(2):81–8.

303. Campos-Martín Y, Colmenares M, Gozalbo-López B, López-Núñez M, Savage PB, Martínez-Naves E. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2006 May 15;176(10):6172–9.
304. Joyee AG, Uzonna J, Yang X. Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 α ⁺ dendritic cell subset in inducing type 1 immunity against infection. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2010 Feb 15;184(4):2095–106.
305. Griewank KG, Lorenz B, Fischer MR, Boon L, Lopez Kostka S, von Stebut E. Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after α GalCer analog PBS57 stimulation. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Jun;8(6):e2917.
306. Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, Kumari K, Wasserfall C, Mulder CB, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology*. 2007 Sep;122(1):1–14.
307. Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, Snyder-Cappione JE, Nixon DF, Costa-Carvalho BT, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PloS One*. 2010;5(9).
308. 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 May;73(1):53–60.
309. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Joyce R, Avigan D, et al. A major fraction of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2001 Nov 15;167(10):5531–4.
310. Dhodapkar MV, Kumar V. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2017 Feb 1;198(3):1015–21.
311. Tatituri RV, Watts GFM, Bhowruth V, Barton N, Rothchild A, Hsu F-F, et al. Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with diverse TCRs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2013 Jan 29;110(5):1827–32.
312. Carvalho LP, PASSOS S, BACELLAR O, LESSA M, ALMEIDA RP, MAGALHÃES A, et al. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol*. 2007 May;29(5):251–8.
313. Zhang C, Zhang J, Niu J, Zhang J, Tian Z. Interleukin-15 improves cytotoxicity of natural killer cells via up-regulating NKG2D and cytotoxic effector molecule expression as well as STAT1 and ERK1/2 phosphorylation. *Cytokine*. 2008 Apr;42(1):128–36.
314. Alonso-Arias R, Moro-García MA, Vidal-Castiñeira JR, Solano-Jaurrieta JJ, Suárez-García FM, Coto E, et al. IL-15 preferentially enhances functional properties and antigen-specific responses of CD4⁺CD28^{null} compared to CD4⁺CD28⁺ T cells. *Aging Cell*. 2011 Oct;10(5):844–52.
315. Becker TC, Wherry EJ, Boone D, Murali-Krishna K, Antia R, Ma A, et al. Interleukin 15 is required for proliferative renewal of virus-specific memory CD8 T cells. *J Exp Med*. 2002 Jun 17;195(12):1541–8.
316. Dooms H, Desmedt M, Vancaeneghem S, Rottiers P, Goossens V, Fiers W, et al. Quiescence-inducing and antiapoptotic activities of IL-15 enhance secondary CD4⁺ T cell responsiveness to antigen. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1998 Sep 1;161(5):2141–50.
317. Carson WE, Giri JG, Lindemann MJ, Linett ML, Ahdieh M, Paxton R, et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. *J Exp Med*. 1994 Oct 1;180(4):1395–403.

318. Fehniger TA, Caligiuri MA. Interleukin 15: biology and relevance to human disease. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):14–32.
319. Ohteki T, Ho S, Suzuki H, Mak TW, Ohashi PS. Role for IL-15/IL-15 receptor beta-chain in natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha beta+ cell development. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1997 Dec 15;159(12):5931–5.
320. Kennedy MK, Glaccum M, Brown SN, Butz EA, Viney JL, Embers M, et al. Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15-deficient mice. *J Exp Med*. 2000 Mar 6;191(5):771–80.
321. Hasan MS, Kallas EG, Thomas EK, Looney J, Campbell M, Evans TG. Effects of interleukin-15 on in vitro human T cell proliferation and activation. *J Interferon Cytokine Res Off J Int Soc Interferon Cytokine Res*. 2000 Feb;20(2):119–23.
322. van Leeuwen EMM, Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory CD4(+) T Cells. *Curr Opin Immunol*. 2009 Apr;21(2):167–72.
323. Antonio L de F, Pimentel MIF, Lyra MR, Madeira M de F, Miranda L de FC, Paes RA, et al. *Sporothrix schenckii* Sensu Lato identification in fragments of skin lesion cultured in NNN medium for differential diagnosis of cutaneous leishmaniasis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2017 Feb;87(2):118–20.
324. Morgado FN, Schubach AO, Barros MBL, Conceição-Silva F. The in situ inflammatory profile of lymphocutaneous and fixed forms of human sporotrichosis. *Med Mycol*. 2011 Aug;49(6):612–20.
325. 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 Jun 15;34(12):E69–73.
326. Stefanidou MP, Antoniou M, Koutsopoulos AV, Neofytou YT, Krasagakis K, Krüger-Krasagakis S, et al. A rare case of leishmaniasis recidiva cutis evolving for 31 years caused by *Leishmania tropica*. *Int J Dermatol*. 2008 Jun;47(6):588–9.
327. Lessa HA, Machado P, Lima F, Cruz AA, Bacellar O, Guerreiro J, et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg*. 2001 Aug;65(2):87–9.
328. Antonio L de F, Fagundes A, Oliveira RVC, Pinto PG, Bedoya-Pacheco SJ, Vasconcellos É de CF e, et al. MONTENEGRO SKIN TEST AND AGE OF SKIN LESION AS PREDICTORS OF TREATMENT FAILURE IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS. *Rev Inst Med Trop São Paulo*. 2014 Sep;56(5):375–80.
329. Deps PD, Viana MC, Falqueto A, Dietze R. [Comparative assessment of the efficacy and toxicity of N-methyl-glucamine and BP88 sodium stibogluconate in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2000 Dec;33(6):535–43.
330. Rodrigues AM, Hueb M, Santos TARR dos, Fontes CJF. [Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006 Apr;39(2):139–45.
331. Teixeira AC, Paes MG, Guerra J de O, Prata A, Silva-Vergara ML. Failure of both azithromycin and antimony to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2008 Jun;50(3):157–60.
332. Lima JR. ESTUDO PROSPECTIVO DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA EM MANAUS (AM): FATORES IMUNOLÓGICOS ENVOLVIDOS NO CURSO TERAPÊUTICO COM ANTIMONIAL PENTAVALENTE [Dissertação de Mestrado]. [Rio de Janeiro]: FIOCRUZ; 2017.

333. Elmekki MA, Elhassan MM, Ozbak HA, Mukhtar MM. Elevated TGF-beta levels in drug-resistant visceral leishmaniasis. *Ann Saudi Med.* 2016 Feb;36(1):73–7.
334. Pereira L de OR, Moreira RB, de Oliveira MP, Reis S de O, de Oliveira Neto MP, Pirmez C. Is *Leishmania (Viannia) braziliensis* parasite load associated with disease pathogenesis? *Int J Infect Dis IJID Off Publ Int Soc Infect Dis.* 2017 Apr;57:132–7.

9. ANEXOS

9.1. ANEXO 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO Voluntário

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

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

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

Executores do Projeto: Raquel Ferraz
Clarissa Cunha

Nome do Voluntário: _____

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

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

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

Esclarecimento sobre os procedimentos e inconvenientes:

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

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

Voluntário: _____

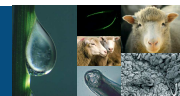
Assinatura

Investigador: _____

Assinatura

9.2. ANEXO 2

Artigo publicado: Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. (2016)



Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure

C. F. CUNHA,¹ R. FERRAZ,^{1,2} M. I. F. PIMENTEL,³ M. R. LYRA,³ A. O. SCHUBACH,³ A. M. DA-CRUZ⁴ & A. L. BERTHO^{1,2}

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ²Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ³Laboratory of Surveillance for Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectology (INI), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, ⁴Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute (IOC), FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

SUMMARY

Cutaneous leishmaniasis (CL) is an important public health issue worldwide. The control of Leishmania infection depends on cellular immune mechanisms, and the inflammatory response may contribute to pathogenesis. A beneficial role of CD8⁺ T lymphocytes has been proposed; nevertheless, other studies suggest a cytotoxic role of CD8⁺ T lymphocytes involved in tissue damage, showing controversial role of these cells. The goal of the current study was to understand the immunopathology of CL and determine the profile of cytotoxic cells – such as CD4⁺ T, natural killer and natural killer T cells – that might be involved in triggering immunological mechanisms, and may lead to cure or disease progression. The frequencies of cytotoxic cell populations in peripheral blood, obtained from patients with active disease, during treatment and after clinical healing, were assessed by flow cytometry. Cytotoxicity could not be related to a deleterious role in Leishmania braziliensis infection, as patients with active CL showed similar percentages of degranulation to healthy individuals (HI). Cured patients exhibited a lower percentage of degranulating cells, which may be due to a downregulation of the immune response. The understanding of the immunopathological mechanisms involved in CL and the commitment of cytotoxic cells enables improvements in therapeutic strategies.

Keywords CD107a, cytotoxic T cells, flow cytometry, human cutaneous leishmaniasis, NK cells, NKT cells

Correspondence: Alvaro Luiz Bertho, Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, IOC/FIOCRUZ, Av. Brazil, 4365, Manguinhos, Pavilhão Leônidas Deane, sala 408-A, CEP: 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil (e-mail: alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br).

Received: 15 September 2015

Accepted for publication: 23 February 2016

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a neglected parasitic disease that affects humans and generates about 1.3 million new cases worldwide annually (1). Its aetiological agent is *Leishmania* spp., which is transmitted by sand flies (1). In Brazil, CL is known to occur all over the country, especially in Rio de Janeiro state, where it is endemic and caused mainly by *L. braziliensis*. The disease presents itself with a broad spectrum of clinical, immunological and histopathological manifestations (2), and the host immune response plays an essential role in pathogenesis, being the susceptibility or resistance dependent on cellular behaviour (3).

The immune response against *Leishmania* has been extensively studied in murine models and it has been already demonstrated that CD4⁺ T lymphocytes can drive the immune response to a pro-inflammatory Th1 profile, which was associated with a good prognosis and progression to healing; or to an anti-inflammatory Th2 profile, which was related to a cellular anergy and disease progression (4). However, in humans this polarization is not clearly ascertained, remaining obscure mechanisms that may contribute to an efficient immune response in patients with CL. CD8⁺ T lymphocytes act as cytotoxic cells and cytokine producers; nonetheless, their role in this protozoan infection is still controversial. CD8⁺ T lymphocytes are associated with a cytotoxic function, nevertheless, if they are protective, pathologic, or irrelevant to the process depend on several factors, whose descriptions have recently begun to emerge (5). Our group and others have shown the key role of CD8⁺ T lymphocytes in cure and protection in human CL (6–12). Regardless of that, other studies suggest an antagonistic role, relating CD8⁺ T-lymphocyte performance to tissue damage and CL progression (13–15). It is important to notice that these studies have been focused on CD8⁺ T lymphocytes, which are considered a classical-cytotoxic cell population and are associ-

ated with the development of an antigenic-specific immune response. Nevertheless, other cell populations as natural killer (NK) and natural killer T cells (NKT) are also typically cytotoxic and could exert an important role in CL outcome.

The role of NK cells in CL immunity has been discussed. Some studies suggest a protective role of cytotoxic NK cells on the lysis of *Leishmania*-infected macrophages and the elimination of extracellular promastigotes (16–18). However, there is some evidence that the NK cell-cytotoxic function could contribute to the exacerbation of CL lesions (13). Regarding NKT cells in CL murine models, few reports have demonstrated the role of these cells on blocking parasite expansion and also driving the immune response according to the cytokine milieu produced (19, 20). In spite of that, the cytotoxic role of NKT cells in the immune response in human CL has not yet been described. Apart from the well-defined helper function of CD4⁺ lymphocytes, a novel role as cytotoxic cells for this T cell subpopulation has emerged, along with their immunological relevance in viral infections, tumours and in some infectious diseases (21). Anyhow, the involvement of cytotoxic CD4⁺ T lymphocytes in CL has been barely demonstrated (22). Such potentially cytotoxic cell populations (CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes, NK and NKT cells) share the main cytotoxic pathway of exocytosis of preformed lytic granules. On this perforin–granzyme-mediated pathway, preformed lytic granules surrounded by lipid bilayers containing LAMPs, including CD107a (LAMP-1), are fused to the plasma membrane (23). Cell surface mobilization of LAMPs indicates that degranulation has taken place and it is associated with perforin release by cells (24).

The immunopathological and protective mechanisms in *Leishmania* infections are challenging, as well as the determination of the nature of effector cells involved in resistance and the parasite antigens targeted by this immune response. These features impair the development of vaccines and new therapeutic approaches (22). Thus, a more detailed understanding on the immunological mechanisms involved in CL cure will certainly result in an improvement in treatment schemes. For this purpose, the aim of this study was to investigate the cytotoxic behaviour of peripheral CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes, NK and NKT cells from patients with CL in different clinical stages – active disease, under antimonial treatment and recently clinically cured (CC).

MATERIALS AND METHODS

Ethical consideration

This study is part of a project approved by Committee on Ethics in Research of the Evandro Chagas National

Institute of Infectology (CEP-INI/FIOCRUZ 029/2012), Rio de Janeiro, Brazil. This Committee adheres to the principles established in the Declaration of Helsinki on human subject research. All participants were volunteers, and an informed consent was obtained from them prior to collection of the blood samples.

Study population

In this study, 14 patients with CL from the state of Rio de Janeiro, Brazil, were included and subdivided into three cohorts: (i) patients before antimonial treatment (BT), evaluated after diagnosis confirmation; (ii) patients during treatment (DT), evaluated on the 20th day after the beginning of antimonial therapy; and (iii) patients after the end of treatment, showing recent clinical cure (CC), corresponding to the 80th day after the beginning of treatment. Some patients were repeated in groups, so the number of blood samples processed was eight per group, which amounts to 24 blood samples in the whole study. Healthy individuals without previous history of CL (HI, $n = 11$) were recruited from nonendemic areas for *L. braziliensis* infection to be included as a reference group.

Cutaneous leishmaniasis was diagnosed and treated according to the Surveillance Manual of American Cutaneous Leishmaniasis, Brazilian Ministry of Health (25), in the Laboratory of Surveillance in Leishmaniasis of Evandro Chagas National Institute of Infectology (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil. Diagnosis of leishmaniasis was based on clinical, laboratorial and epidemiological criteria. Ulcerated cutaneous lesions were associated with a positive Montenegro skin test and positive parasitological examinations to confirm the diagnosis. Besides, the differential diagnosis to other diseases through mycological and bacteriological tests was performed. The exclusion criteria were as follows: patients younger than 18 and older than 60 years, presence of comorbidity or pregnancy, previous treatment with anti-*Leishmania* drugs and recent visit to an endemic area. Furthermore, none of the patients showed progression to mucosal or disseminated clinical forms. All patients were submitted to antimonial-*N*-methyl-glucamine treatment according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health (25) and after treatment, all patients presented clinical cure, which was characterized by full epithelialization of ulcerated lesions, regression of crusts, desquamation and infiltration. Basic clinical information on the studied groups is summarized in Table 1.

Isolation of peripheral blood mononuclear cells

Heparinized peripheral venous blood was collected from patients with CL and HI. Peripheral blood mononuclear

Table 1 Clinical and laboratorial characteristics of groups included in the study

Clinical and laboratorial characteristics	Cutaneous leishmaniasis patients			
	BT	DT	CC	HI
Number of volunteers (<i>n</i>)	8	8	8	11
Sex (M/F)	7/1	3/5	2/6	2/9
Age ^a (years)	46.6 ± 16.7	35.6 ± 15.4	41.7 ± 17.1	31.9 ± 11.8
Number of lesions ^a	2.1 ± 2.1	1.3 ± 0.7	1.7 ± 2.1	NA
Montenegro skin test (mm) ^a	11.0 ± 0.8	10.5 ± 1.3	10.6 ± 1.0	NA
Duration of disease (months) ^a	3.6 ± 2.1	3.3 ± 1.5	3.2 ± 1.5	NA

NA, not applicable; BT, before treatment; DT, during treatment; CC, clinically cured; HI, healthy individuals.

^aMean ± standard deviation.

cells (PBMCs) were obtained by Ficoll-Histopaque (Sigma, Saint Louis, MO, USA) density gradient centrifugation at 400 g, 20°C, 30 min, without brake and washed three times in RPMI-1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 1.5 mM L-glutamine, 0.04 mM 2-mercaptoethanol and antibiotics (200 IU/mL penicillin and 200 mg/mL streptomycin) (all from Sigma). The viability of PBMC was higher than 80% after trypan blue (Sigma) exclusion.

For cryopreservation protocol, approximately 1×10^7 PBMCs were suspended in 1 mL of freezing solution [90% inactivated foetal calf serum (FCS; Gibco[®], Invitrogen, Life Technologies, Rockville, MD, USA) plus 10% dimethyl sulfoxide (DMSO – Sigma)] in cryotubes (Nunc A/S, Kamstrupvej, Roskilde, DNK). Afterwards, the cryotubes were placed at *Mr. FrostyTM Freezing Container* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), stored initially at –80°C for 24 h and then transferred to racks and stored in liquid nitrogen.

On the experiment day, cells were thawed by placing cryotubes in a 37°C warm water bath for three minutes and then diluted in RPMI 1640 medium supplemented with 20% FCS, quantified and adjusted to 1.5×10^6 cells/mL to be submitted to flow cytometry staining protocol.

CD107a-degranulation marker and immunophenotyping

The frequencies of CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK and NKT expressing CD107a were determined by a five-colour flow cytometry staining protocol, as follows. Anti-CD107a (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) was added to 200 µL of RPMI 1640 medium supplemented with 20% FCS containing the thawed PBMC suspension (3.0×10^5 cells/well). The solution was incubated for one hour at 37°C in 5% CO₂. After that, six µg/mL of BD GolgiStop containing monensin (BD Biosciences) was

added and then again incubated for additional five hours, based on a protocol described elsewhere (26). Monensin prevents the acidification of endocytic vesicles by avoiding degradation of re-internalized CD107a proteins from the cell surface. As positive control, PBMCs with anti-CD107a were stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA, 10 ng/mL) plus ionomycin (500 ng/mL) (both from Sigma). After six hours of incubation, cells were washed and stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8 and anti-CD56 monoclonal antibodies (BD Biosciences; and Beckman Coulter, Brea, CA, USA). They were incubated for 30 min at 4°C, in the dark. Then, cells were washed, fixed in 1% paraformaldehyde (Sigma) and acquired in flow cytometer within 24 h.

Flow cytometry

At least 50 000 events were acquired per sample using MoFlo Astrios (Beckman Coulter) and BD FACSAria II (BD Biosciences) flow cytometers. Single stained controls were used to set compensation parameters, and fluorescence-minus-one (FMO) and isotype-matched Ab controls were used to set analysis gates.

After acquisition, frequencies of CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, NK cells and NKT cells expressing CD107a were analysed through a 7-parameter flow cytometric protocol created with Kaluza Software v1.2 (Beckman Coulter). As gate strategy, a region based on forward- (FSC) and side-scatter (SSC) profiles was established. Next, cells were gated on singlets regions in two dot-plots created to exclude cell aggregates from analyses: FSC-H vs. FSC-A and FSC-A vs. FSC-W. After that, cell populations of interest were set as follows: CD8⁺ T lymphocytes: CD3⁺CD8⁺CD56^{neg}; CD4⁺ T lymphocytes: CD3⁺CD4⁺CD56^{neg}; NK cells: CD3^{neg}CD56⁺; and NKT cells: CD3⁺CD56⁺. Furthermore, the NK cell

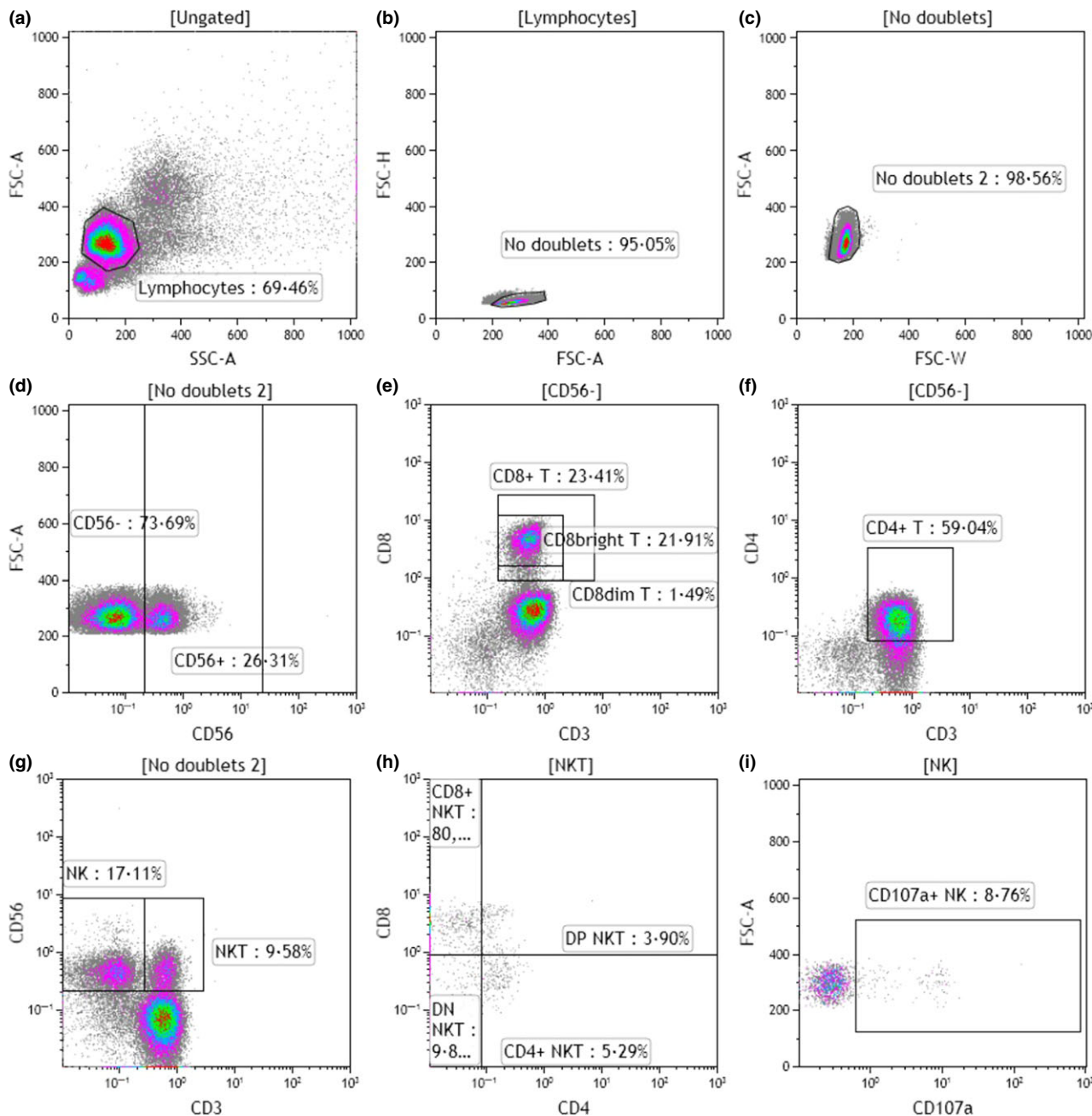


Figure 1 Flow cytometry-representative protocol to determine the frequencies of CD3⁺ T-lymphocyte subsets, natural killer (NK) cells, natural killer T cells (NKT) subsets and expression of CD107a. Peripheral blood mononuclear cells were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56 and anti-CD107a. ‘Lymphocytes’ region were created on forward (FSC) vs. side-scatter (SSC) dot-plot (a). Then, the cells gated on ‘Lymphocytes’ region were analysed through dot-plots FSC-H vs. FSC-A (b) and FSC-A vs. FSC-W (c) to exclude cell aggregates and debris. CD8⁺ and CD4⁺ T-lymphocyte populations were defined using CD8 vs. CD3 (e) and CD4 vs. CD3 (f) dot-plots gated on CD56^{neg} cells defined on a FSC vs. CD56 dot-plot (d), respectively. NK and NKT cell populations were defined through CD56 vs. CD3 dot-plot (g). CD8⁺ and CD4⁺ NKT subsets were defined based on CD8 vs. CD4 dot-plot gated on NKT cells (h). CD107a expression was analysed on a FSC vs. CD107a dot-plots, gated on each defined cell population – represented here for NK cells (i).

subsets and CD8⁺ T lymphocytes were determined based on the density of CD56 and CD8 expressions, respectively, and also NKT subsets were assessed by their CD4

and/or CD8 expressions. The cells in degranulation process were defined based on surface CD107a expression (Figure 1).

Statistical analysis

For comparison between each two groups, Mann–Whitney *U*-test was used for unpaired observations. A probability level of $P < 0.05$ was considered statistically significant. Statistical analysis was performed with GRAPHPAD PRISM version 5.01 for Windows (GraphPad Prism 5 Software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Frequencies of CD8⁺ T, CD4⁺ T and NK cells are altered by *Leishmania* infection

To demonstrate the CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK and NKT cellular profiles during an immunological response, we compared the percentage of these cells from peripheral blood of patients BT, DT and CC, along with samples from HI. Our data showed that CC patients demonstrated high frequency of CD8⁺ T lymphocytes (median \pm interquartile range: 30.7 ± 9.6), which was significant when compared to HI (24.9 ± 8.6 , $P < 0.05$), as well as to BT (24.2 ± 10.3 , $P < 0.05$) and DT (25.6 ± 4.8 , $P < 0.05$) patients (Figure 2a). BT patients exhibited lower frequencies of CD4⁺ T lymphocytes (41.6 ± 19.9) in comparison with HI (50.9 ± 8.8 , $P < 0.01$). The frequency of CD4⁺ T lymphocytes increases with treatment (DT: 44.7 ± 17.4) and CC (43.5 ± 33.3) (Figure 2b). All groups of patients with CL presented significant higher frequencies of NK cells (BT: 9.9 ± 8.8 ; DT: 8.0 ± 12.0 ; CC: 8.2 ± 7.8) than HI (3.4 ± 4.1) ($P < 0.01$, $P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) (Figure 2c). Regarding NKT cells, there were no differences in frequencies among the studied groups (data not shown).

Cells from cured CL patients showed the lowest frequencies of CD107a-cytotoxic marker expression

CD107a expression analysis of T, NK and NKT cells was performed to check their degranulation in samples from CL patients and HI. Degranulation analysis was conducted by comparing the percentage of CD107a expression in all groups of patients with CL and healthy subjects, which is shown in Figure 3. We observed that CC patients presented lower frequencies of CD107a⁺CD8⁺ T lymphocytes (median \pm interquartile range: 1.1 ± 0.8), compared with HI (2.8 ± 2.0 , $P < 0.01$), BT (2.1 ± 3.5 , $P < 0.05$) and DT patients (1.8 ± 3.7 , $P < 0.05$) (Figure 3a). Clinically cured patients showed lower frequencies of CD107a⁺CD4⁺ T lymphocytes (0.7 ± 0.9) in relation to DT patients (2.1 ± 1.5 , $P < 0.05$) (Figure 3b). Natural killer cells displayed low expression of CD107a in all CL

groups (BT: 3.5 ± 8.6 , $P < 0.05$; DT: 5.8 ± 8.4 , $P < 0.05$; CC: 3.8 ± 4.8 , $P < 0.01$), in comparison with HI (12.8 ± 15.7) (Figure 3c). Among the CL groups, CC patients showed low frequencies of CD107a⁺NK cells and it was significant when correlated to DT patients ($P < 0.05$) (Figure 3c). Clinically cured patients also exhibited low percentages of CD107a expression by NKT cells (2.4 ± 3.1), which was significantly lower than DT patients (6.4 ± 10.0 , $P < 0.01$) (Figure 3d).

To determine which cell population would be more relevant to cytotoxicity in clinical phases of CL, we performed another flow cytometry approach, aiming to assess the distribution of each cell population gated on all CD107a-expressing cells. In every group, we could observe that CD4⁺ T lymphocytes represent the largest cell population expressing CD107a, followed by CD8⁺ T lymphocytes and NK cells, and NKT cells in a smaller proportion (Figure 4).

The CD8^{dim} T-lymphocyte subset displays a cytotoxic phenotype

Additionally to the global definition of CD8⁺ T lymphocytes, we also determined the frequencies of CD8^{bright} and CD8^{dim} T cells in the blood of patients with CL in an attempt to define whether the profile of CD8 expression could be related to the clinical phase of the disease. We observed that the majority of CD8⁺ T lymphocytes in peripheral blood from all CL patients and HI were CD8^{bright}. However, when we analysed the frequencies of CD107a⁺CD8⁺ T lymphocytes, about 70% of these cells showed the CD8^{dim} phenotype in all subjects, both in CL patients and HI. Such differences on CD8 expression were extremely significant ($P < 0.001$) (data not shown).

The majority of circulating NK cells are CD56^{dim} and shows a cytotoxic profile

We analysed CD56 expression in NK cells obtained from CL patients and HI to ascertain a profile of the expression of CD56, correlating with the clinical phase of disease. Corroborating other reports, we observed that more than 95% of NK and CD107a⁺ NK cells from both HI and CL patients presented a CD56^{dim} phenotype (data not shown).

Patients with active disease have lower frequencies of CD4⁺CD8⁺ NKT cells

We also analysed the subsets of NKT cells based on their expressions of CD4 and CD8 molecules. Our results clearly showed that about half of the sum of circulating

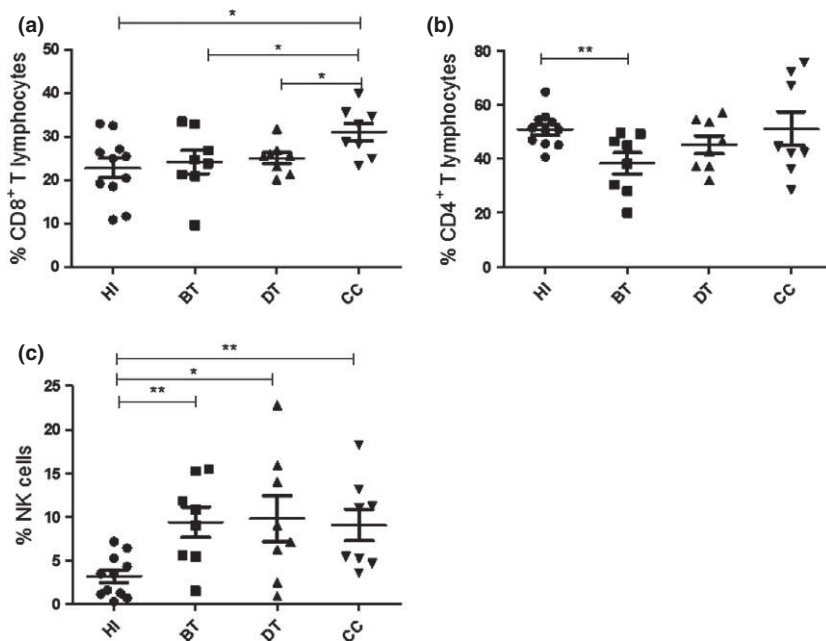


Figure 2 Scatter plots of cell population frequencies. (a) Total CD8⁺ T lymphocytes; (b) CD4⁺ T lymphocytes; and (c) natural killer cells. HI, healthy individuals (*n* = 11); BT, before treatment patients (*n* = 8); DT, during treatment patients (*n* = 8); CC, clinically cured patients (*n* = 8). The data are represented by median ± interquartile range. Each dot represents one subject. Statistical comparisons were performed with the Mann–Whitney *U*-test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01

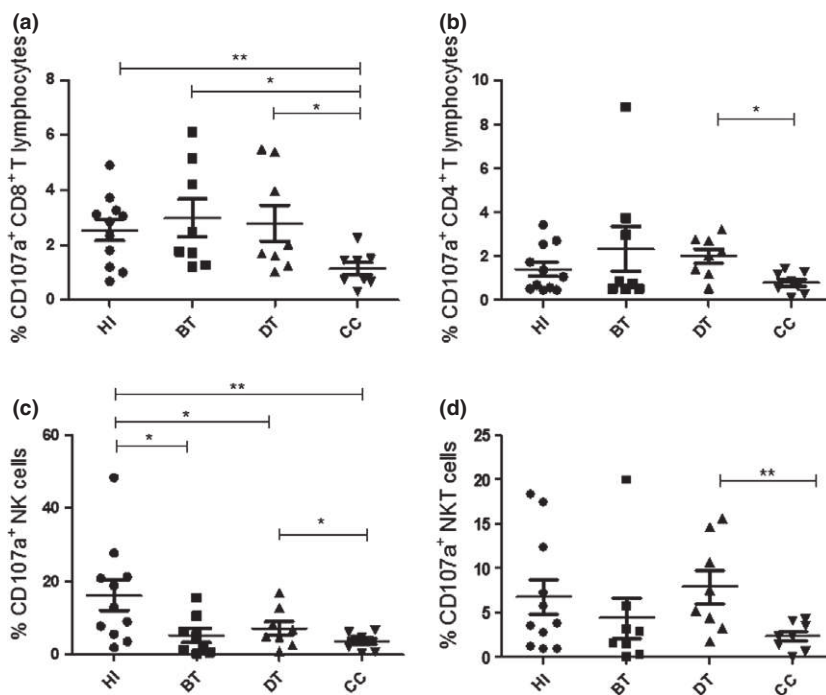


Figure 3 Scatter plots of CD107a expression by (a) CD8⁺ T lymphocytes; (b) CD4⁺ T lymphocytes; (c) natural killer cells; and (d) natural killer T cells. HI, healthy individuals (*n* = 11); BT, before treatment patients (*n* = 8); DT, during treatment patients (*n* = 8); CC, clinically cured patients (*n* = 8). The data are represented by median ± interquartile range. Each dot represents one subject. Statistical comparisons were performed with the Mann–Whitney *U*-test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01

NKT cells from the entirety of groups studied was from the CD8⁺ NKT subset. Moreover, all groups showed intermediate proportions of CD4⁺ and CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative – DN) NKT subsets and lower frequencies of CD4⁺CD8⁺ (double positive – DP) NKT subset (Figure 5a). Even though DP NKT subset was detected in small amounts in each group, there were differences

among them. Before treatment patients presented significant lower DP NKT cells percentage (mean ± SEM: 1.2 ± 0.5%), compared with HI (6.6 ± 1.9%; *P* < 0.05), as well as to other patient groups (DT: 5.1 ± 1.7, *P* < 0.05; CC: 3.9 ± 1.1, *P* < 0.05) (Figure 5c). We also observed differences in DN NKT frequencies, which were significantly higher in CC patients (21.3 ± 4.0%), in comparison

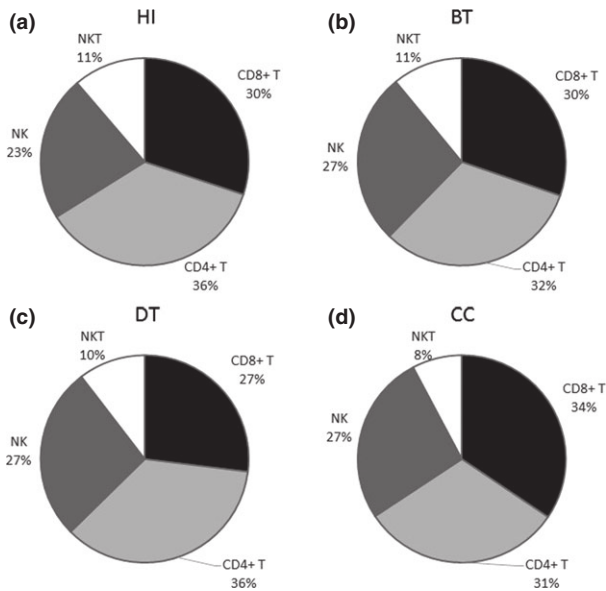


Figure 4 Distribution of CD8⁺ T lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, natural killer cells and natural killer T cells gated on CD107a⁺ cells. The pie graphs show the mean of data observed in: (a) HI (healthy individuals – *n* = 11); (b) BT (before treatment patients – *n* = 8); (c) DT (during treatment patients – *n* = 8); and (d) CC (clinically cured patients – *n* = 8).

to HI ($12.8 \pm 5.4\%$; $P < 0.05$) (Figure 5d). CD8⁺ and CD4⁺ single-positive NKT subsets have similar percentages through the studied groups.

We also evaluated the frequencies of CD107a⁺ NKT subsets and it varied widely among all subjects. Regardless of the high frequencies of the CD107a⁺CD8⁺ NKT subset presented by HI and patients before and during treatment, CC patients showed the highest frequency of the CD107a⁺CD4⁺ NKT and CD107a⁺DN NKT subsets (Figure 5b). Concerning variations of CD107a-expressing NKT subsets, it is possible to highlight the lower frequency of CD107a⁺CD8⁺ NKT subset in CC patients, related to DT patients (Figure 5e); also, there was a higher frequency of CD107a⁺ DN NKT in DT patients (Figure 5f) and a lower frequency of CD107a⁺ DP NKT in CC patients, both correlated to HI (Figure 5g).

DISCUSSION

The immunopathogenesis of human CL is still not completely understood and there are some controversial aspects, which need to be elucidated. Disease outcome depends on both the parasite specie and the immune response developed by patient (27). In this context, it is known that patients infected by *L. braziliensis* exhibit a Th1 immune response, leading to resolution of the lesions, or to an exaggerated inflammatory response that produces

tissue damage (28). Thus, these dichotomy patterns of the immune response may guide to cure or disease progression, with an imperative participation of specific activated T lymphocytes (29). Even so, the role of these cells remains paradoxical, once they can either protect from disease or contribute to aggravation (5). The understanding of the immunopathological mechanisms and the involvement of each cell population in immune response is essential for the development of therapeutic and vaccine strategies.

In human CL, CD8⁺ T lymphocytes activate and proliferate in response to *Leishmania*-antigenic presentation, framing a population of specific T cells able to assemble an immune response against the parasite (6). Hence, the critical question is what role CD8⁺ T lymphocytes play after their activation. Our group and others have reported the increase in CD8⁺ T-lymphocyte frequencies in cured patients, suggesting the beneficial participation of these cells on immune response against *Leishmania*. These cells would also exert direct cytotoxic effects over infected macrophages, possibly along with regulatory effects (6–8, 30, 31). In the present study, we observed high frequencies of CD8⁺ T lymphocytes in cured patients, in comparison with patients with active disease, patients under treatment and HI, and this corroborates the statements above. Despite the high frequency of CD8⁺ T lymphocytes noticed in cured patients, the cytotoxic activity was lower in this group.

Some studies attribute a deleterious cytotoxic role to CD8⁺ T lymphocytes in human CL, especially in *L. braziliensis* infection. CD8⁺ T cells isolated from the skin of patients with CL exhibit markers of granule-dependent cytotoxicity and the frequency of granzyme A⁺ CD8⁺ T cells was higher in patients with larger skin ulcers than in those with nodular lesions (14). A wide transcriptional genome analysis comparing cutaneous lesions from *L. braziliensis* patients with normal skin also points to cytotoxicity as the hallmark of the disease (32). In addition, transcriptional profiling correlating lesions from *L. braziliensis*-infected patients with CL and mucosal leishmaniasis (ML) showed greater mRNA levels for cytolytic markers in mucosal milieu (33). Furthermore, it was demonstrated that cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes obtained from lesions express CD107a (15, 32). Taken together, these observations suggest that the cytolytic activity of CD8⁺ T lymphocytes promotes disease progression. Nevertheless, according to our results, CD8⁺ T lymphocyte-mediated cytotoxicity may not be related to tissue damage, as the percentage of CD107a⁺CD8⁺ T lymphocytes of patients with active leishmaniasis were similar to HI, at least in peripheral blood pool. An interesting issue of discussion relates to the phenotypic evaluation

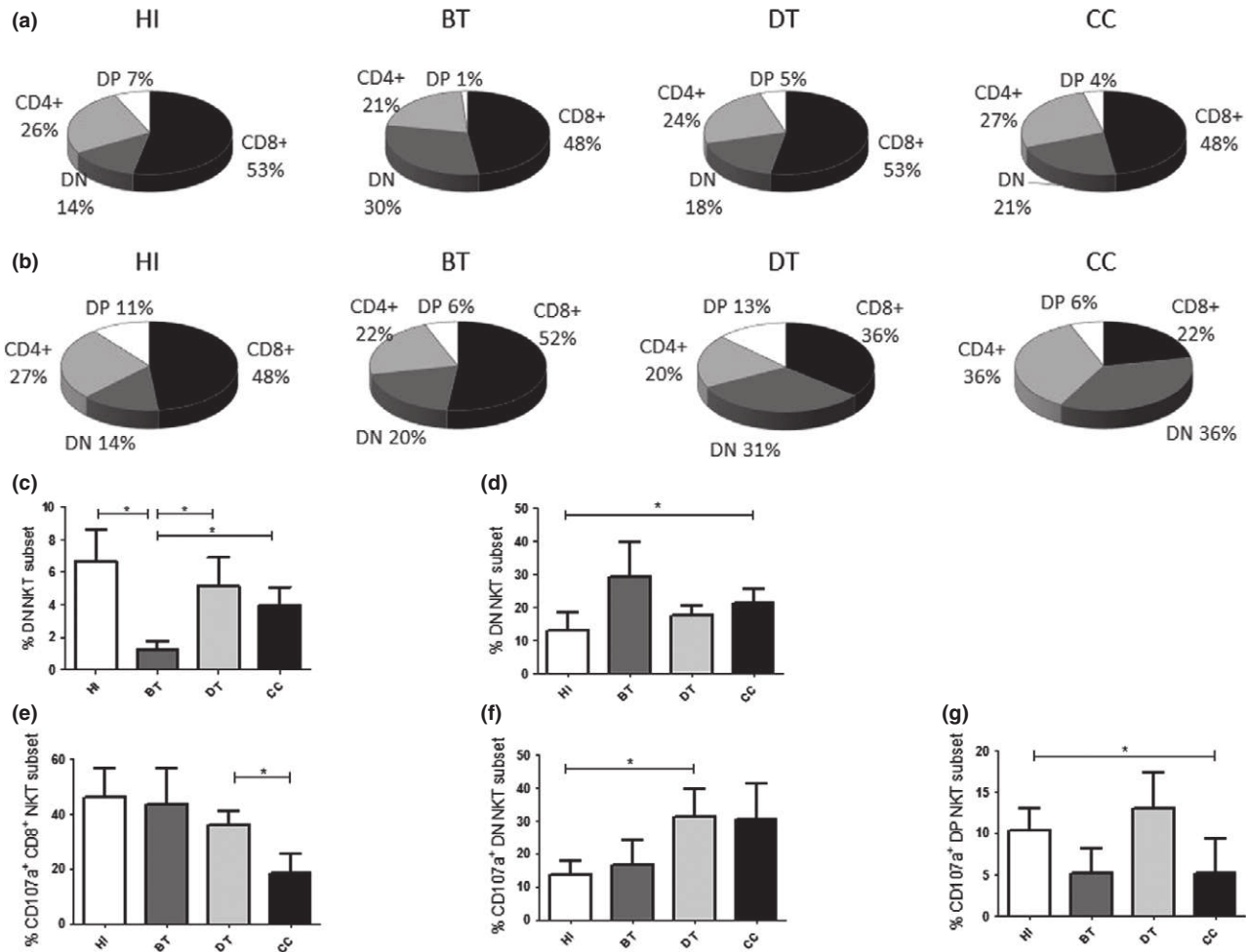


Figure 5 Analysis of frequency and CD107a expression of natural killer T cells subsets. The pie graphs show the mean of data observed in HI, BT, DT and CC: (a) frequency; (b) CD107a expression. The bar graphs represent mean \pm SEM of the comparison between groups: (c) frequency of DP NKT subset; (d) frequency of DN NKT subset; (e) frequency of CD107a⁺CD8⁺ NKT subset; (f) frequency of CD107a⁺ DN NKT subset; and (g) frequency of CD107a⁺ DP NKT subset. HI, healthy individuals ($n = 11$); BT, before treatment patients ($n = 8$); DT, during treatment patients ($n = 8$); CC, clinically cured patients ($n = 8$). Statistical comparisons were performed with the Mann-Whitney *U*-test. * $P < 0.05$.

strategies, as some studies defined the population of CD8⁺ T lymphocytes using CD3 and CD8 biomarkers, without NKT exclusion. In this study, we excluded the CD56⁺ cells from CD8⁺ T-lymphocyte gate, to avoid a mistaken analysis due to the presence of NKT cells on it. According to this, our group also observed that CD8⁺ T lymphocytes do not seem to be responsible for the tissue destruction observed in CL lesions caused by *L. braziliensis*. This study showed that in a leishmanial-lesion microenvironment, the highest expression of CD107a was detected in NKT cells, when compared to other cytotoxic cell populations. CD8⁺ T lymphocytes were the less committed cytotoxic population, showing the lowest CD107a expression. In the same study, we also observed a positive correlation between the frequency of cytotoxic-CD107a⁺ cells and the

production of granzyme B on the lesion site (Ferraz *et al.*, personal communication).

Regarding the low frequencies of cytotoxic cell populations observed in CC patients, other authors have described a lower activity of CD8⁺ T lymphocytes after therapy, as detected by the decrease in anti-*Leishmania* IFN- γ levels in cured CL and ML patients (34). In this context, Ferraz *et al.* (12) demonstrated low frequencies of circulating effector CD8⁺ T lymphocytes in CC CL patients. Additionally, these CL cured patients exhibited higher frequencies of memory CD8⁺ T lymphocytes compared with patients with active disease or during treatment, as observed by Ferraz *et al.* (personal communication). Hence, the low frequency of CD107a⁺CD8⁺ T lymphocytes detected in cured patients

seems to be a consequence of differentiation into memory CD8⁺ T cells.

CD8 marker is not expressed on the surface of human peripheral blood T cells in a homogeneous way. CD8⁺ T lymphocytes can be gathered based on the level of CD8 expression in CD8^{bright} and CD8^{dim} cells. CD8^{dim} T subset represents activated-effector CD8⁺ T cells, while CD8^{bright} T subset is the mostly found CD8⁺ T lymphocytes in circulation, and has been reported to have a regulatory function (35). In accordance with these published data, our findings showed a predominance of circulating CD8^{bright} T lymphocytes and that CD8^{dim} T cells were the most cytotoxicity-committed subset. As previously reported, other authors described abundant perforin and granzyme B in CD8^{dim} T lymphocytes, which may indicate their role as cytotoxic/effector T cells (35). It has been discussed that circulating CD8^{dim} T lymphocytes may rapidly perform their effector functions after antigen recognition. Thus, the presence of these cells could reflect a continuous state of low-level-antigenic stimulation. However, our results do not show differences in frequencies of CD8^{dim} or CD8^{bright} T cells between patients with CL and HI.

The paucity of knowledge regarding cytotoxicity phenomena in CL immunopathogenesis led us to investigate which cell populations were able to perform this function, besides CD8⁺ T lymphocytes. Reports refer to NK and NKT cells, as well as to CD4⁺ T lymphocytes, being able to play the cytotoxic function through granule exocytosis pathway and probably being involved in pathological and protective mechanisms in CL (27). CD4⁺ T lymphocytes are known to play a key role in CL by driving the immune response according to the milieu of cytokines they produce, along with the cytotoxic function of CD4⁺ T cells that have been already described (21). The role of cytotoxic CD4⁺ T lymphocytes in CL is still unclear, and a recent study demonstrated a cytotoxic activity by these lymphocytes in patients infected with *L. major* (22). In our results, the frequencies of CD4⁺ T lymphocytes are impaired in active disease, being predisposed to reestablishment with therapy and recovery to normal levels after cure, which suggests that these cells would take part in the CL healing process. We observed substantial frequencies of CD107a⁺CD4⁺ T lymphocytes in all studied subjects. Cured patients exhibit lower percentages of CD107a⁺ expression by these cells, despite the high frequency of total CD4⁺ T lymphocytes that were observed in this group.

Natural killer cells are activated at the beginning of CL infection, but whether their cytotoxic role is beneficial or deleterious is not well known (36). Some reports suggest that NK cell-mediated cytotoxicity acts in host defence, which has been demonstrated in studies about interaction between human NK cells and *L. major* promastigotes (18).

Likewise, susceptibility of *L. major* to granzysin (16) and killing of promastigotes by human-activated NK cells (17, 18) have been evidenced. However, other authors propose that NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tissue damage (13). We observed that the frequency of NK cells in patients with active disease was much higher than in HI, corroborating previous data (37). Moreover, the frequency of NK cells remains high during treatment, as well as after clinical cure. Interestingly, we observed low frequencies of CD107a⁺ NK cells in all patients with CL, which are in fact lower than in HI. Still, the percentage of CD107a expression by NK cells was low in cured patients. This finding confirms previous studies that showed the suppression of NK cell activity during leishmaniasis. Some factors may contribute to this low activity, such as the action of cytokines, mainly TGF- β and IL-10 (38, 39). Additionally, the parasite could contribute to the inhibition of proliferation, cytotoxicity and IFN- γ production by human NK cells during infection (18). Despite the apparent suppression of NK cell activity in CL, our results showed that NK cells are a population firmly committed to cytotoxicity. Human NK cells are generally divided into two subsets based on the relative surface density of CD56 antigen: CD56^{bright} NK cells, predominant in secondary lymphoid tissues, and CD56^{dim} NK cells, predominant in peripheral blood (40). It is commonly accepted that CD56^{bright} NK cells are the main source of cytokine production, while CD56^{dim} are mostly responsible for cytotoxic activity and killing of targeted cells (40, 41). Our results are in agreement with that, since over 95% of the circulating NK cells showed the CD56^{dim} phenotype in all studied individuals. When we assessed cell degranulation, we could observe that most of the CD107a⁺ NK cells presented the CD56^{dim} phenotype, strengthening the commitment of this subset with cytotoxic function. Such NK subset dichotomy was not related to the presence of disease, demonstrating the constancy of these subsets.

Studies on the distribution and function of NKT cells in CL are scarce and mostly focused on the role of NKT cells as producer of cytokines, leading to an inflammatory response type I or II through their interaction with dendritic cells (20, 42). In our study, there were no differences in NKT cells frequency among the groups of patients and HI. Nonetheless, the frequency of CD107a⁺ NKT cells varied widely between the studied subjects and CC patients presented the lowest percentages of CD107a⁺ NKT cells. Human NKT cells differ from one another based on their expression of CD8 and CD4 molecules and are commonly subdivided into CD8⁺, CD4⁺ or DN NKT (43). Apart from these, some authors reported a subset with DP phenotype (44–46), which was also observed in our study. We detected high frequencies of CD8⁺ NKT

cells and low frequencies of DP NKT cells in both patients with CL and HI. Despite the quite variable distribution of NKT cell subsets, other authors also observed high frequencies of CD8⁺ NKT subsets in HI and in patients with other diseases (47, 48). We found that the CD8⁺ NKT cells are the main subset involved in cytotoxicity and this also corroborates data previously described (45), except for cured patients. A recent study about NKT cells in visceral leishmaniasis (VL) showed that patients with active disease had lower frequencies of CD4⁺ NKT and CD8⁺ NKT subsets, compared with HI. After the end of therapy, patients with VL kept low frequency of CD4⁺ NKT subset, while the CD8⁺ NKT subset levels returned to normal, thereby associating CD8⁺ NKT subset with a protective role in VL (49). We observed a lower frequency of DP NKT cells in patients with active disease, which was re-established to healthy subject's levels with therapy and after healing, suggesting a protective role of this subset in CL.

Finally, our study provides new insights and strong evidence regarding the involvement of CD8⁺ T and CD4⁺ T lymphocytes, NK cells and NKT cells in the cytotoxic response to CL. Cytotoxicity could not be linked to a deleterious role in *L. braziliensis* infection, as patients with active CL showed similar or lower levels of degranulation, in comparison with HI. Still, cured patients showed low percentages of CD107a expression by the studied cell populations. Such low cytotoxic activity could be related to a recovery of the immune system to a resting state and/or to differentiation of some cell populations, probably into memory cells. We would like to emphasize the involvement of different NKT subsets in CL healing process and the presence of cytotoxic CD4⁺ T lymphocytes. These cell populations deserve further consideration during *Leishma-*

nia infection, to figure out whether they are actually involved in the promotion or protection of CL.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Cunha, CF performed most of the experiments; designed the research study; analysed the data; and wrote the manuscript. Ferraz, R helped perform some experiments and performed flow cytometry acquisitions. Da-Cruz, AM contributed with scientific discussion and reviewed manuscript. Pimentel, MIF; Lyra, MR; and Schubach, AO followed the patients, helped in parasite isolation, collected the patient's blood smears and were in charge of evaluation of clinical aspects of the study. Bertho AL designed the research study; helped perform Flow Cytometry analysis; wrote and reviewed the manuscript; obtained the grant; and coordinated the research.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Alessandro Marins dos Santos of the Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ (MoFlo ASTRIOS) and Iris Peixoto Alvim of Platform of Flow Cytometry, PDTIS-FIOCRUZ (FACSARIA II) for flow cytometry acquisitions. 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. CFC and RF had a fellowship from CNPq and CAPES, respectively.

DISCLOSURE

None.

REFERENCES

- 1 WHO|Leishmaniasis [Internet]. WHO. [cited 2015 Mar 25]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- 2 De Oliveira-Neto MP, Mattos MS, Perez MA, et al. American tegumentary leishmaniasis (ATL) in Rio de Janeiro State, Brazil: main clinical and epidemiologic characteristics. *Int J Dermatol* 2000; **39**: 506–514.
- 3 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**: 180–186.
- 4 Kaye P & Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol* 2011; **9**: 604–615.
- 5 Novais FO & Scott P. CD8(+) T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol* 2015; **37**: 251–259.
- 6 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**: 2614–2618.
- 7 Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, 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**: 251–256.
- 8 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**: 537–543.
- 9 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**: 139–142.
- 10 Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; **102**: 625–630.
- 11 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**: 317–325.
- 12 Ferraz R, Cunha CF, Gomes-Silva A, et al. Apoptosis and frequency of total and effec-

- tor CD8⁺ T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients during antimonial therapy. *BMC Infect Dis* 2015; **15**: 74.
- 13 Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalou A, Araújo C & Carvalho EM. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 2002; **12**: 449–451.
- 14 Faria DR, Souza PEA, Durães FV, et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 2009; **31**: 432–439.
- 15 Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 2013; **133**: 1533–1540.
- 16 Stenger S, Hanson DA, Teitelbaum R, et al. An antimicrobial activity of cytolytic T cells mediated by granulysin. *Science* 1998; **282**: 121–125.
- 17 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**: 334–341.
- 18 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; **9**: 1–12.
- 19 Ishikawa H, Hisaeda H, Taniguchi M, et al. CD4(+) α 14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int Immunol* 2000; **12**: 1267–1274.
- 20 Joyee AG, Uzonna J & Yang X. Invariant NKT cells preferentially modulate the function of CD8 α ⁺ dendritic cell subset in inducing type I immunity against infection. *J Immunol Baltim Md 1950* 2010; **184**: 2095–2106.
- 21 Brown DM. Cytolytic CD4 cells: direct mediators in infectious disease and malignancy. *Cell Immunol* 2010; **262**: 89–95.
- 22 Naouar I, Boussoffara T, Ben Ahmed M, et al. Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. *Mediators Inflamm* 2014; **2014**: 636039.
- 23 Lopez JA, Brennan AJ, Whisstock JC, Voskoboinik I & Trapani JA. Protecting a serial killer: pathways for perforin trafficking and self-defence ensure sequential target cell death. *Trends Immunol* 2012; **33**: 406–412.
- 24 Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G & Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol* 2009; **254**: 149–154.
- 25 SVS, Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana [Internet]. 2010 [cited 2012 Nov 13]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual2_lta_2ed.pdf.
- 26 Betts MR, Brechley JM, Price DA, et al. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 2003; **281**: 65–78.
- 27 Cardoso TM, Machado A, Costa DL, et al. Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection. *Infect Immun* 2015; **83**: 898–906.
- 28 Da Silva Santos C & Brodskyn CI. The role of CD4 and CD8 T cells in human cutaneous leishmaniasis. *Front Public Health* 2014; **2**: 165.
- 29 Macedo ABB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol* 2012; **167**: 505–513.
- 30 Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, et al. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania* pifanoi amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol* 1996; **84**: 144–155.
- 31 Toledo VP, Mayrink W, Gollob KJ, et al. Immunochemotherapy in American cutaneous leishmaniasis: immunological aspects before and after treatment. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2001; **96**: 89–98.
- 32 Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, et al. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 2013; **9**: e1003504.
- 33 Maretta-Mira AC, Bittner J, Oliveira-Neto MP, et al. Transcriptome patterns from primary cutaneous *Leishmania braziliensis* infections associate with eventual development of mucosal disease in humans. *PLoS Negl Trop Dis* 2012; **6**: e1816.
- 34 Carvalho AM, Magalhães A, Carvalho LP, Bacellar O, Scott P & Carvalho EM. Immunologic response and memory T cells in subjects cured of tegumentary leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 2013; **13**: 529.
- 35 Trautmann A, Rückert B, Schmid-Grendelmeier P, et al. Human CD8 T cells of the peripheral blood contain a low CD8 expressing cytotoxic/effector subpopulation. *Immunology* 2003; **108**: 305–312.
- 36 Bajénoff M, Breart B, Huang AYC, et al. Natural killer cell behavior in lymph nodes revealed by static and real-time imaging. *J Exp Med* 2006; **203**: 619–631.
- 37 Cañeda-Guzmán IC, Salaiza-Suazo N, Fernández-Figueroa EA, Carrada-Figueroa G, Aguirre-García M & Becker I. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: a comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS One* 2014; **9**: e112410.
- 38 Laouar Y, Sutterwala FS, Gorelik L & Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. *Nat Immunol* 2005; **6**: 600–607.
- 39 Maroof A, Beattie L, Zubairi S, Svensson M, Stager S & Kaye PM. Posttranscriptional regulation of III0 gene expression allows natural killer cells to express immunoregulatory function. *Immunity* 2008; **29**: 295–305.
- 40 Cooper MA, Fehniger TA & Caligiuri MA. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends Immunol* 2001; **22**: 633–640.
- 41 Inngjerdengen M, Kveberg L, Naper C & Vaage JT. Natural killer cell subsets in man and rodents. *Tissue Antigens* 2011; **78**: 81–88.
- 42 Griewank KG, Lorenz B, Fischer MR, Boon L, Lopez Kostka S & von Stebut E. Immune modulating effects of NKT cells in a physiologically low dose *Leishmania major* infection model after α GalCer analog PBS57 stimulation. *PLoS Negl Trop Dis* 2014; **8**: e2917.
- 43 Bendelac A, Savage PB & Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol* 2007; **25**: 297–336.
- 44 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**: 31–38.
- 45 O'Reilly V, Zeng SG, Bricard G, et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, CD8 α ⁺ and CD4-CD8 α - invariant natural killer T cells. *PLoS One* 2011; **6**: e28648.
- 46 Montoya CJ, Pollard D, Martinson J, et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. *Immunology* 2007; **122**: 1–14.
- 47 Gumperz JE, Miyake S, Yamamura T & Brenner MB. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. *J Exp Med* 2002; **195**: 625–636.
- 48 Carvalho KI, Melo KM, Bruno FR, et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). *PLoS One* 2010; **5**: e12652.
- 49 Kumari S, Jamal F, Shivam P, et al. Leishmania donovani skews the CD56(+) natural killer T cell response during human visceral leishmaniasis. *Cytokine* 2015; **73**: 53–60.

9.3. ANEXO 3

Artigo submetido: Contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells in *Leishmania*-specific *in vitro* immune response: cytotoxicity, activation and exhaustion processes in human cutaneous leishmaniasis. (2017)

PLOS ONE

Contributions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, NK and CD3+CD56+NKT cells in Leishmania-specific in vitro immune response: cytotoxicity, activation and exhaustion processes in human cutaneous leishmaniasis

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Article
Full Title:	Contributions of CD4+ and CD8+ T lymphocytes, NK and CD3+CD56+NKT cells in Leishmania-specific in vitro immune response: cytotoxicity, activation and exhaustion processes in human cutaneous leishmaniasis
Short Title:	Contributions of cytotoxic cell populations in human leishmaniasis
Corresponding Author:	Alvaro Luiz Bertho, Ph.D Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ Rio de Janeiro, Rio de Janeiro BRAZIL
Keywords:	T lymphocytes, NK, NKT, Flow cytometry, cytotoxicity, CD107a, exhaustion, Leishmania braziliensis
Abstract:	<p>The pathogenesis of human leishmaniasis is dictated largely by the immune response developed. The understanding of the immunological mechanisms that generate the tissue damage or resolution and protection is the key for the development of effective vaccine protocols and therapeutic schemes. It is clear that the specific response mediated by T cells is responsible for the resolution of the disease, however, the role that T cells play in immunopathogenesis has been discussed and their cytotoxic function has been associated with tissue damage in Leishmania braziliensis infection. The present report explores the specific-cytotoxic response of CD8+ T, CD4+ T, NK and CD3+CD56+ NKT cells in L. braziliensis infection, as well as their activation and exhaustion profiles. Peripheral blood cells from patients with active cutaneous leishmaniasis, patients under therapy and after clinical cure were assessed by flow cytometry. We detected high frequencies of CD8+, NK and CD3+CD56+ NKT cells in Ag-stimulated cell cultures from patients with active disease, while low frequencies of CD4+ T lymphocytes were observed from these patients due to antigenic stimulation. All groups of patients showed expansion of activated and cytotoxic CD4+ T, NK and CD3+CD56+ NKT cells in response to L. braziliensis antigens, and also presented high frequencies of NK cells in an exhaustion state. In contrast, no changes due to the antigenic stimulation were detected in percentages of cytotoxic CD8+ T lymphocytes in the studied groups. The increased antigen-specific activation and cytotoxic activity is in line with the strong inflammatory response described in the disease, a likely cause of tissue damage. These findings reinforce the involvement of different cytotoxic cell populations in the immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis, highlighting a large contribution of CD4+ T lymphocytes and a non-cytotoxic-deleterious role of CD8+ T lymphocytes in contrast to other cell populations.</p>
Order of Authors:	Clarissa Cunha Raquel Ferraz Thaize Quiroga Chometon Maria Ines F. Pimentel Marcelo Lyra Armando Oliveira Schubach Alda Maria Da-Cruz Alvaro Luiz Bertho, Ph.D
Opposed Reviewers:	
Additional Information:	
Question	Response

1 **Title:** Contributions of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, NK and CD3⁺CD56⁺NKT cells in
2 *Leishmania*-specific *in vitro* immune response: cytotoxicity, activation and exhaustion
3 processes in human cutaneous leishmaniasis.

4

5 **Short Title:** Contributions of cytotoxic cell populations in human leishmaniasis

6

7 Clarissa F. CUNHA¹, Raquel FERRAZ^{1, 2, 3}, Thaize Q. CHOMETON² Maria Inês F.
8 PIMENTEL⁴, Marcelo R. LYRA⁴, Armando O. SCHUBACH⁴, Alda Maria DA-CRUZ⁵,
9 Alvaro Luiz BERTHO^{1, 2, *}

10

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

13 2. Flow Cytometry Core Facility, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ,
14 Brazil.

15 3. Beckman Coulter Life Sciences, São Paulo, Brazil (current affiliations)

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

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

20

21 * **Corresponding author:** Dr. Alvaro Luiz Bertho, Laboratório de Imunoparasitologia,
22 Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ. Av. Brasil, 4365, Manguinhos, Pavilhão Leônidas
23 Deane, sala 408-A, CEP: 21040-900, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. Email:
24 alvaro.bertho@hotmail.com

25

26

27 **Abstract**

28 The pathogenesis of human leishmaniasis is dictated largely by the immune
29 response developed. The understanding of the immunological mechanisms that
30 generate the tissue damage or resolution and protection is the key for the development
31 of effective vaccine protocols and therapeutic schemes. It is clear that the specific
32 response mediated by T cells is responsible for the resolution of the disease, however,
33 the role that T cells play in immunopathogenesis has been discussed and their cytotoxic
34 function has been associated with tissue damage in *Leishmania braziliensis* infection.
35 The present report explores the specific-cytotoxic response of CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK and
36 CD3⁺CD56⁺ NKT cells in *L. braziliensis* infection, as well as their activation and
37 exhaustion profiles. Peripheral blood cells from patients with active cutaneous
38 leishmaniasis, patients under therapy and after clinical cure were assessed by flow
39 cytometry. We detected high frequencies of CD8⁺, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells in Ag-
40 stimulated cell cultures from patients with active disease, while low frequencies of CD4⁺
41 T lymphocytes were observed from these patients due to antigenic stimulation. All groups
42 of patients showed expansion of activated and cytotoxic CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺
43 NKT cells in response to *L. braziliensis* antigens, and also presented high frequencies of
44 NK cells in an exhaustion state. In contrast, no changes due to the antigenic stimulation
45 were detected in percentages of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes in the studied groups.
46 The increased antigen-specific activation and cytotoxic activity is in line with the strong
47 inflammatory response described in the disease, a likely cause of tissue damage. These
48 findings reinforce the involvement of different cytotoxic cell populations in the
49 immunopathogenesis of cutaneous leishmaniasis, highlighting a large contribution of
50 CD4⁺ T lymphocytes and a non-cytotoxic-deleterious role of CD8⁺ T lymphocytes in
51 contrast to other cell populations.

52 **Key terms:** T lymphocytes, NK, NKT, Flow cytometry, cytotoxicity, CD107a, exhaustion,
53 *Leishmania braziliensis*

54 Introduction

55 Leishmaniasis are a complex of world-wide diseases with a range of clinical and
56 epidemiological features caused by *Leishmania spp.* protozoan parasites [1]. The
57 transmission is mediated by the sandfly and may follow an anthroponotic or zoonotic
58 cycle that also varies by region [2]. The range of clinical manifestations depends on the
59 species and strain of *Leishmania*, degree of virulence and the magnitude of the immune
60 response of the host [3]. Cutaneous leishmaniasis (CL) is the most common form and
61 manifests as localized skin lesions that may resolve but can become chronic, leading to
62 severe tissue destruction and disfigurement [3]. Endemic in Brazil, CL has an incidence
63 rate of 20.000 cases per year, and has been recorded in all states [4,5].

64 Current therapeutic approaches used worldwide are unable to achieve sterile
65 cure and there is no vaccine available [6,7]. A detailed understanding of the mechanisms
66 involved in the immune response, which lead to healing and to protection, is still a
67 challenge and is the key for a better comprehension of the pathogenesis and to develop
68 satisfactory therapeutic schemes to be applied.

69 Since the definition of CD4⁺ T helper 1 (Th1) and T helper 2 (Th2) cells, studies
70 about CL immunopathogenesis in mice have answered some immunological questions
71 concerning the development and maintenance of T-cell subsets in the immune response
72 against the parasite [8,9]. Advances in our knowledge about which cells can contribute
73 in the protection against *Leishmania* infection and the exacerbation of the disease led to
74 new approaches for vaccine development and immunotherapy [10]. However, it is still
75 unclear which mechanisms are actually involved in these processes because the
76 dynamics of the disease are quite complex in humans. Much is discussed about the
77 events associated with the infection and it has been suggested that CD4⁺ T lymphocytes
78 mediate protective immunity, whereas CD8⁺ T lymphocytes would have a pathological-
79 cytotoxic role [11,12]. Nevertheless, in *L. braziliensis*-caused-human CL, some
80 evidences suggest that high percentages of producing IFN- γ CD4⁺ T lymphocytes are

81 associated with larger lesions and an exacerbated Th1 response is observed in mucosal
82 leishmaniasis (ML) [13,14]. Furthermore, a protective role for CD8⁺ T lymphocytes has
83 been reported [15–21], which imprints a controversial character to this discussion.
84 Recently, our group reported a significant participation of CD4⁺ T lymphocytes in CL
85 immune response acting as cytotoxic cells, along with other ones, such as classical-
86 cytotoxic CD8⁺ T and NK cells, as well as NKT cells. In such study, cytotoxicity could not
87 be related to a deleterious status of immune response, since it was observed that
88 patients with active disease showed similar or lower frequencies of degranulating cells
89 in comparison to healthy individuals [22].

90 Cytotoxic-CD4⁺ T lymphocytes have been highlighted in studies on their
91 contributions in immune response against viral infections [23], however little is known
92 about their role in protozoan diseases, particularly in leishmaniasis [24,25]. Furthermore,
93 reports about the cytotoxic action of NK cells are scarce in such diseases, regarding NKT
94 cells there are even fewer [26,27]. Besides cytotoxic activity, it is important to evaluate
95 the activation features of these cell populations to understand their functional status. It
96 is well established that chronic parasite persistence has a profound impact on the
97 effector capacity of antigen-specific T cells, inducing their gradual loss of function [28].
98 CD279, also known as programmed death-1 (PD-1), which is a major inhibitory receptor
99 involved in T-cell exhaustion, which is a status defined by poor effector function,
100 sustained expression of inhibitory receptors and a transcriptional state distinct from that
101 of functional-effector or memory T cells, thus preventing optimal control of the infection
102 [28].

103 In this context, we developed in this present manuscript a longitudinal study with
104 CL patients to evaluate the specific response of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, NK and
105 NKT cells to *L. braziliensis*-antigens, concerning their cytotoxic profiles and functional
106 status (activation and exhaustion), to determine their contribution to the promotion or
107 resolution of CL.

108 **Materials and Methods**

109 **Ethical consideration**

110 This study is part of a project approved by the Ethics in Research Committee of
111 the Evandro Chagas National Institute of Infectology (CEP-INI/FIOCRUZ 029/2012), Rio
112 de Janeiro, Brazil. This Committee adheres to the principles established in the
113 Declaration of Helsinki on human subject research. All participants were volunteers and
114 an informed consent was obtained from them prior to collection of the blood samples.

115

116 **Study population**

117 Twenty-four CL patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil, where
118 *L. braziliensis* is endemic, were sub-divided into three cohorts: 1) patients with an active
119 form of the disease, evaluated after diagnosis confirmation (AD, n=17, 36.71 ± 3.74 years
120 old, 82.35% males); 2) patients during antimonial treatment, evaluated between the 15th
121 and 20th day after beginning antimonial therapy (DT, n=16, 40.0 ± 3.65 years old, 81.25%
122 males); 3) patients after the end of treatment, showing recent clinical cure, corresponding
123 to the 80th day after the beginning of treatment (CC, n=10, 42.20 ± 4.38 years old, 70.0%
124 males). Healthy individuals (HI, n=7, 30.29 ± 4.78 years old, 14.20% males) had no
125 clinical or epidemiological evidence of *Leishmania* infection and were recruited from *L.*
126 *braziliensis*-non-endemic areas. Some patients were found repeated in groups, so the
127 number of blood samples processed was varied in each group, totalizing 43 blood
128 samples from patients throughout the study.

129 Cutaneous leishmaniasis was diagnosed and treated according to the
130 Surveillance Manual of American Cutaneous Leishmaniasis, Brazilian Ministry of Health,
131 in the Laboratory of Leishmaniasis Surveillance of Evandro Chagas National Institute of
132 Infectology (INI), Oswaldo Cruz Foundation (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, Brazil.
133 Diagnosis of leishmaniasis was based on clinical, laboratorial and epidemiological

134 criteria. Ulcerated cutaneous lesions were associated to a positive Montenegro skin test
135 (MST) and positive parasitological exams to confirm the diagnosis. Besides that, the
136 differential diagnosis to other diseases through mycological and bacteriological tests was
137 also performed. The exclusion criteria were: patients younger than 18 and older than 70
138 years old, presence of comorbidity or pregnancy, previous treatment with anti-
139 *Leishmania* drugs and recent visit to an endemic area outside Rio de Janeiro state.
140 Furthermore, none of the patients showed progression to mucosal or disseminated
141 clinical forms. All patients were submitted to antimoniate-N-methyl-glucamine treatment
142 according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health. After treatment, all patients
143 presented clinical cure, which was characterized by full epithelialization of ulcerated
144 lesions, regression of crusts, desquamation and infiltration.

145

146 **Isolation of peripheral blood mononuclear cells**

147 Heparinized peripheral venous blood was collected from CL patients and healthy
148 individuals. Afterwards, peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were obtained
149 through Ficoll-Histopaque (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) density gradient
150 centrifugation at 400xg, 20°C, 30 minutes, without brake and washed three times in
151 RPMI-1640 medium supplemented with 10 mM HEPES, 1.5 mM L-glutamine, 0.04 mM
152 2-mercaptoethanol and antibiotics (200 IU/mL penicillin and 200 mg/mL streptomycin)
153 (all from Sigma-Aldrich). The viability of the PBMC was higher than 80% after trypan blue
154 (Sigma-Aldrich) exclusion.

155 For cryopreservation protocol, approximately 1×10^7 PBMCs were suspended in
156 1 mL of freezing solution [90% inactivated fetal calf serum (FCS; Gibco®, Invitrogen, Life
157 Technologies, Rockville, MD, USA) plus 10% dimethyl sulfoxide (DMSO - Sigma-
158 Aldrich)] in cryotubes (Nunc®, Kamstrupvej, Roskilde, DNK). Afterwards the cryotubes
159 were placed in a Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Fisher Scientific, Waltham,
160 MA, USA), stored initially at -80°C for 24 h, and then transferred to racks and stored in

161 liquid nitrogen. On the experiment day, cells were thawed by placing cryotubes in a 37°C-
162 warm water bath for three minutes and then diluted in supplemented RPMI-1640 medium
163 added with 20% FCS.

164

165 ***L. braziliensis* cell response *in vitro* assay**

166 The recovered cells were adjusted (3×10^5 /well) in supplemented RPMI medium
167 with 10% FCS and displaced in 96-well round-bottomed plates (Nunc®) in a final volume
168 of 200 μ L per well. PBMC were then incubated for 72 hours at 37°C in a humidified
169 atmosphere of 5% CO₂ air, in the presence of particulate antigens of *L. braziliensis* (Lb-
170 Ag) (obtained after disruption in repeated freeze/thaw cycles and a subsequent 5-
171 minutes ultrasonication). Non-stimulated and 1 μ g/well-Phytohemagglutinin (PHA)-
172 stimulated cells (Sigma-Aldrich) were used as negative and positive controls of
173 stimulation, respectively. Six hours before the end of incubation time, anti-CD107a (BD
174 Biosciences, San Jose, CA, USA) was added to the cell cultures and, after one hour, 6
175 μ g/mL of BD GolgiStop containing monensin (BD Biosciences) was added, according to
176 the protocol described elsewhere [29]. Monensin is important to prevent the acidification
177 of endocytic vesicles, avoiding degradation of reinternalized CD107a proteins from the
178 cell membrane.

179 After 72-hour incubation, the PBMC were collected, washed and submitted to a
180 staining protocol, using the following monoclonal-antibody panel: anti-CD3, anti-CD4,
181 anti-CD8, anti-CD56, anti-CD38, anti-CD279 (BD Biosciences; Beckman Coulter, Brea,
182 CA, USA; and BioLegend, San Diego, CA); and 7AAD (Sigma-Aldrich) for dead-cell
183 exclusion. Then, cells were incubated for 20 minutes at 4°C in the dark, washed and
184 acquired in flow cytometer. In some samples [AD (n=9) and HI (n=7)], a staining protocol
185 including anti-TCR V α 24-J α 18 monoclonal antibody (BioLegend) was also performed to
186 define invariant NKT (iNKT) cell population.

187 **Flow cytometry**

188 At least 50,000 events from each sample were acquired using MoFlo Astrios Cell
189 Sorter flow cytometer (Beckman Coulter). Single stained controls were used to set
190 compensation parameters and fluorescence-minus-one (FMO), and isotype-matched Ab
191 controls were used to set analysis gates. After acquisition, frequencies of CD8⁺ T
192 lymphocytes, CD4⁺ T lymphocytes, NK cells and CD3⁺CD56⁺ NKT cells and their
193 expressions of CD107a, CD38 and CD279 were determined using Kaluza Software
194 v1.5a (Beckman Coulter). As gate strategy, a region surrounding cells based on forward-
195 (FSC-A) and side-scatter (SSC-A) parameters was established (Figure 1A). Next, to
196 exclude cell aggregates from analyses, cells were gated on singlets regions in FSC-H
197 vs. FSC-A dot-plot (Figure 1B). 7AAD^{neg} cells (viable cells) were defined by a gate in
198 FSC-A vs. 7AAD dot-plot (Figure 1C). From this gate, CD56^{neg} cells were defined based
199 on a FSC-A vs. CD56 dot-plot (Figure 1D) and then CD8⁺ T lymphocytes (Figure 1E) and
200 CD4⁺ T lymphocytes (Figure 1F) were determined. A CD3 vs. CD56 dot-plot, gated on
201 'Viable cells', was used to set NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells (Figure 1G). From a gate
202 on each cell population, the expressions of CD107a, CD38 and CD279 were determined
203 in respective histograms, represented here for CD4⁺ T-lymphocyte population (Figures
204 1H-J). In another approach of analysis, we also evaluated the percentages of each cell
205 population based on gates encompassing the total expression of CD107a, CD38 and
206 CD279. Based on "Viable cells" gate, we defined the total expression of CD107a, CD38
207 and CD279 represented here only the CD279⁺ cells dot-plot (Figure 1K). Then, we
208 placed the dot-plots in which we previously defined the studied cell populations (CD8⁺ T,
209 CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells) in function of each of the gates of the total
210 expression, represented here only as the CD4⁺ T lymphocytes dot-plot gated on
211 "CD279⁺" cells (Figure 1L). Besides, for some samples, another gate strategy was done
212 including the assessment of invariant NKT cells (iNKT) based on a CD3 vs. TCR Vα24-
213 Jα18 dot-plot (Figure 1M).

214 **Fig 1: Flow cytometry-representative protocol.** Peripheral blood mononuclear cells
215 were stained with 7AAD, anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD107a, anti-
216 CD38 and anti-CD279; as well as with anti-V α 24J α 18-TCR in some cases.
217 'Lymphocytes' region were created on forward (FSC-A) vs. side-scatter (SSC-A) dot-plot
218 (A). Then, the cells gated on 'Lymphocytes' region were analyzed through dot-plots FSC-
219 H vs. FSC-A (B) to exclude cell aggregates and debris – 'No doublets' gate. The viable
220 cells were then selected based on the non-labeling of 7AAD (C). CD8⁺ and CD4⁺ T
221 lymphocyte populations were defined using CD8 vs. CD3 (E) and CD4 vs. CD3 (F) dot-
222 plots, respectively, gated on CD56^{neg} viable cells defined on a FSC vs. CD56 dot-plot
223 (D). NK and CD3⁺CD56⁺NKT cell populations were defined through CD56 vs. CD3 dot-
224 plot gated on 'Viable cells' (G). Expressions of CD107a, CD38 and CD279 were analyzed
225 on dot-plots by FSC-A, gated on each defined cell population – represented here for
226 CD4⁺ T lymphocytes (H-J), respectively. Another analysis strategy was adopted to
227 evaluate the proportion of CD107a, CD38 and CD279 expression by the different studied
228 cell populations: the total expression of each molecule was determined from the "Viable
229 cells" – represented here for CD279 expression (K); and then these gates were used for
230 determined the expressions by each previously defined cell population – represented
231 here the CD4⁺ T lymphocytes based on "CD279⁺" gate (L). For some samples, was also
232 performed the analysis of invariant NKT (iNKT) cells through a CD3 vs. invariant TCR
233 (V α 24J α 18-TCR) dot-plot gated on 'Viable cells' (M).

234

235 **Statistical analysis**

236 The *Wilcoxon matched-pairs signed rank test* was used for comparison between
237 two related samples, and the *Mann-Whitney U-test* was used for comparison between
238 each two groups, for unpaired observations. A probability level of $P \leq 0.05$ was considered
239 statistically significant. Statistical analysis was performed with GraphPad Prism version
240 6.0 for Windows (GraphPad Prism 6 Software, San Diego, CA, USA).

241 **Results**

242 **Patients' characteristics**

243 The mean age of 24 CL patients was 37 ± 14.26 (\pm SEM) years and 79% of them
 244 (19) were of male sex. The number of lesions ranged from one to five and the illness
 245 duration from 15 to 330 days. The lesion sizes were variable, with diameters ranging
 246 from 14 to 130 mm. The MST was positive in all patients tested (Table 1).

247

248 **Table 1: Characteristics of cutaneous leishmaniasis patients enrolled in this study.**

249

<i>Patient number</i>	<i>Age (years)</i>	<i>Gender</i>	<i>Number of lesions</i>	<i>Duration of illness (days)</i>	<i>Lesion size (largest diameter - mm)</i>	<i>MST^d (mm)</i>
1	22	M ^a	1	40	34	24
2	56	F ^b	1	60	36	36
3	24	M	1	90	45	n.d. ^c
4	28	M	1	30	20	11
5	44	M	1	120	28	n.d.
6	29	M	1	120	50	n.d.
7	70	M	1	15	-	25
8	46	M	4	180	75	27
9	52	M	1	90	24	47
10	51	F	1	60	40	n.d.
11	32	F	1	120	130	n.d.
12	30	M	5	45	-	20
13	52	M	1	120	22	n.d.
14	31	M	1	330	47	n.d.
15	59	M	1	120	60	11
16	23	F	1	120	35	n.d.
17	31	M	1	150	58	19
18	19	M	1	60	22	18
19	26	M	4	60	-	n.d.
20	47	M	1	30	45	14
21	19	M	1	30	30	22
22	30	M	4	120	-	n.d.
23	25	M	1	-	14	n.d.
24	42	F	1	90	35	10

250

251 ^aM - male

252 ^bF – female

253 ^cn.d.- not determined

254 ^dMST - Montenegro skin test

255

256 ***L. braziliensis* antigens induce expansion of CD8⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells,**
257 **and contraction of CD4⁺ T lymphocytes in CL patients**

258 In order to determine the influence of the *L. braziliensis* antigens (*Lb*-Ag) on the
259 frequencies of CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells, from all groups of
260 patients (AD, DT and CC) and HI, we evaluated by flow cytometry (Figure 1) the
261 percentages of these cell populations without (background – BG) or with *in vitro*-*Lb*-Ag
262 stimulation. We observed in cell cultures from AD patients higher percentages of CD8⁺
263 T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells after *Lb*-Ag stimulation (mean ± SEM: 28.56 ± 1.74;
264 7.47 ± 1.13; and 3.86 ± 0.72, respectively) compared to non-stimulated cells [27.43 ±
265 1.76 (P≤0.01); 6.51 ± 1.09 (P≤0.5); and 3.19 ± 0.66 (P≤0.5)] (Figures 2A-2C). In contrast,
266 the antigenic stimulation induced a contraction in CD4⁺ T lymphocytes of AD (68.24 ±
267 3.55) and DT (65.11 ± 2.08) patients, when compared to mean percentages observed in
268 non-stimulated cells [70.50 ± 3.38 (P≤0.01); and 66.07 ± 2.16 (P≤0.05), respectively]
269 (Figures 2D and 2E). HI showed no significant changes in the frequencies of the cell
270 population when stimulated with *Lb*-Ag (data not shown).

271

272 **Fig 2: *L. braziliensis* antigens induce expansion of CD8⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT**
273 **cells, and contraction of CD4⁺ T lymphocytes in CL patients.** Comparison between
274 stimulated (*Lb*-Ag) and non-stimulated (BG – background): (A) CD8⁺ T (B) NK and (C)
275 CD3⁺CD56⁺ NKT cells from AD (n=17); and (D) CD4⁺ T lymphocytes from AD (n=17)
276 and (E) DT (n=16). Solid lines connect the results for the same individual. Statistical
277 analyses were performed by nonparametric Wilcoxon matched pairs test. Results were
278 considered significant with P≤0.05. *(P≤0.05) **(P≤0.01).

279

280 **Most CD3⁺CD56⁺ NKT cells did not express invariant TCR**

281 NKT cells co-expresses T-cell receptors (as CD3) together with markers
282 associated with NK cell lineages (as CD56, CD16 and/or CD161). This lymphocyte

283 subset recognizes lipid antigens presented by a class I MHC-like molecule CD1d and is
284 subdivided into type I, which expresses an invariant-TCR, and type II NKT cells,
285 presenting diverse TCR. Thereby, we decided to verify the proportion of CD3⁺CD56⁺
286 NKT cells that express the invariant Va24-Ja18 TCR by flow cytometry analyses. We
287 detected a small proportion of CD3⁺CD56⁺ NKT cells expressing Va24-Ja18 TCR
288 (Figure 1M), data observed in all studied individuals, regardless of antigenic stimulation.
289 The *Lb*-Ag did not induce change in iNKT cell frequency, since the percentages observed
290 with and without antigenic stimulation were similar in both AD patients (*Lb*-Ag: 0.69 ±
291 0.22; BG: 0.81 ± 0.15) and HI (*Lb*-Ag: 0.59 ± 0.11; BG: 0.77 ± 0.12) (data not shown).

292

293 ***L. braziliensis* antigens induce increase of activated and degranulating CD4⁺ T, NK**
294 **and CD3⁺CD56⁺ NKT cells in all CL patients groups**

295 Aiming to determine changes in the activation and degranulation profiles of cells
296 involved in a *Leishmania*-specific response, we analyzed CD38 and CD107a
297 expressions by CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells in samples from CL
298 patients and HI, in presence or lack of *Lb*-Ag stimuli. We observed high frequencies of
299 CD107a⁺CD4⁺ T, CD107a⁺ NK and CD107a⁺CD3⁺CD56⁺ NKT cells in *Lb*-Ag-stimulated-
300 cell cultures from AD (0.52 ± 0.07; 3.24 ± 0.52 and 2.96 ± 0.76, respectively), DT (0.9 ±
301 0.19, 5.12 ± 1.03 and 4.02 ± 0.9, respectively) and CC (0.68 ± 0.08; 5.75 ± 1.08; and
302 2.86 ± 0.66, respectively) patients, compared to non-stimulated cells from AD (0.38 ±
303 0.04; P≤0.05; 1.87 ± 0.28, P≤0.05; and 2.1 ± 0.66, P≤0.05; respectively), DT (0.72 ±
304 0.19, P≤0.01; 3.92 ± 1.06, P≤0.05; and 2.33 ± 0.57, P≤0.001; respectively) and CC (0.45
305 ± 0.04, P≤0.01; 2.87 ± 0.7, P≤0.01; and 1.61 ± 0.35, P≤0.01; respectively). It is important
306 to note that HI showed no changes in CD107a expression in response to *Lb*-Ag (Figure
307 3). Likewise, all groups of CL patients (AD, DT and CC) have increased their percentages
308 of activated CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells in response to *Lb*-Ag (AD: 15.21 ±
309 2.29; 55.52 ± 5.73 and 19.69 ± 2.49; DT: 20.68 ± 2.13; 70.17 ± 4.92; and 23.95 ± 4.53;

310 CC: 16.67 ± 2.29 ; 72.05 ± 3.63 ; and 26.7 ± 5.98 , respectively), comparing to non-
311 stimulated cells (AD: 13.46 ± 2.22 , $P \leq 0.05$; 49.03 ± 5.78 , $P \leq 0.05$; and 15.33 ± 2.46 ,
312 $P \leq 0.001$; DT: 18.23 ± 2.2 , $P \leq 0.001$; 65.37 ± 4.53 , $P \leq 0.05$; and 18.82 ± 3.69 , $P \leq 0.001$;
313 CC: 13.32 ± 2.11 , $P \leq 0.001$; 58.07 ± 6.88 , $P \leq 0.001$; and 23.01 ± 5.42 , $P \leq 0.05$;
314 respectively). Interestingly, in the HI group the percentages of all cell populations
315 expressing CD38 were not altered by the presence of *Lb*-Ag (Figure 4A).

316

317 **Fig 3: *L. braziliensis* antigens induce increase of degranulating CD4⁺ T, NK and**
318 **CD3⁺CD56⁺ NKT cells.** Comparison of CD107a expression between stimulated (*Lb*-Ag)
319 and non-stimulated (BG – background) CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells from AD
320 (n=16), DT (n=16) and CC (n=10). Solid lines connect the results for the same individual.
321 Statistical analyses were performed by nonparametric Wilcoxon matched pairs test.
322 Results were considered significant with $P \leq 0.05$. *($P \leq 0.05$) **($P \leq 0.01$) ***($P \leq 0.001$).

323

324 **Fig 4: *L. braziliensis* antigens induce increase of activated CD4⁺ T, NK and**
325 **CD3⁺CD56⁺ NKT cells.** Comparison of CD38 expression between stimulated (*Lb*-Ag)
326 and non-stimulated (BG – background): (A) CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells from
327 AD (n=17), DT (n=16) and CC (n=10); (B) CD8⁺ T lymphocytes from DT (n=17). Solid
328 lines connect the results for the same individual. Statistical analyses were performed by
329 nonparametric Wilcoxon matched pairs test. Results were considered significant with
330 $P \leq 0.05$. *($P \leq 0.05$) **($P \leq 0.01$).

331

332 Regarding CD8⁺ T lymphocytes, no differences were observed in their
333 frequencies of CD107a expression between non- and stimulated cell cultures, even to
334 patient's (AD, DT and CC) and to HI groups (data not shown). Concerning evaluation of
335 CD38⁺CD8⁺ T lymphocytes, it was possible to observe that *Lb*-Ag induced higher
336 frequency of activated CD8⁺ T cells from DT patients, when compared to non-stimulated
337 cells (11.65 ± 1.81 and 9.25 ± 1.68 , respectively; $P \leq 0.05$) (Figure 4B). AD and CC, as

338 well as HI, did not present differences in percentage of CD38⁺CD8⁺ T lymphocytes in
339 presence of *Lb*-Ag (data not shown).

340

341 ***L. braziliensis* antigens induce NK exhaustion in CL patients**

342 CD279 expression was analyzed to check whether *Lb*-Ag-stimulation induces
343 cellular exhaustion during evolution to CL healing. Exhaustion analysis was conducted
344 by comparing the percentage of CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells
345 expressing CD279 after *Lb* -Ag stimulation with those non-stimulated. We observed in
346 all CL patients' groups a higher frequency of CD279⁺NK cells under
347 *Lb*-Ag stimulation (AD: 6.17 ± 1.7; DT: 6.06 ± 1.26; CC: 7.33 ± 1.55) than those detected
348 in non-stimulated cultures (AD: 4.22 ± 1.27, P≤0.001; DT: 4.34 ± 1.1, P≤0.05; CC: 3.42
349 ± 1.05, P≤0.01) (Figure 5A). We also detected higher frequencies of CD279⁺CD8⁺ T
350 lymphocytes and of CD279⁺CD3⁺CD56⁺ NKT cells in DT (5.04 ± 1.38) and CC (10.85 ±
351 3.83) patients, respectively, when compared to the same cells without antigenic
352 stimulation (4.18 ± 1.15 and 7.29 ± 2.75, respectively) (P≤0.05) (Figure 5B). HI have not
353 presented any changes in the percentages of cell populations expressing CD279 when
354 stimulated with *Lb*-Ag (data not shown).

355

356 **Fig 5: *L. braziliensis* antigens induce NK exhaustion in CL patients.** Comparison of
357 CD279 expression between stimulated (*Lb*-Ag) and non-stimulated (BG – background):
358 (A) NK cells from AD (n=17), DT (n=16) and CC (n=10); (B) CD8⁺ T lymphocytes from
359 DT (n=17) and CD3⁺CD56⁺ NKT cells from CC (n=10). Solid lines connect the results for
360 the same individual. Statistical analyses were performed by nonparametric Wilcoxon
361 matched pairs test. Results were considered significant with P≤0.05. *(P≤0.05)
362 **(P≤0.01).

363

364

365 **CD4⁺ T lymphocytes represent the highest proportion of cells expressing CD107a,**
366 **CD38 and CD279 biomarkers**

367 Using another flow cytometry approach, we evaluated which cell population
368 would be more relevant in cytotoxic function and represent the majority of cells
369 expressing CD38 and CD279 in the clinical stages of evolution for CL healing. In such
370 approach, we determined the total-expression of CD107a, CD38 and CD279 based on
371 a gate encompassing all viable cells (Figure 1C) and then verified the percentages that
372 each cell population represented. We observed in all studied groups (both CL patients
373 and HI), regardless of antigenic stimulation, that CD4⁺ T lymphocytes constituted the
374 majority of cells expressing CD107a, CD38 and CD279. Considering the total-expression
375 of CD107a, CD38 and CD279, their expression profile was maintained in all studied
376 groups and regardless of *Lb*-Ag stimulus: CD4⁺ T lymphocytes represented the majority,
377 CD8⁺ T and NK cells constituted intermediate and similar percentages, and
378 CD3⁺CD56⁺NKT cells represented the smallest frequency. Figure 6 shows the results
379 after *Lb*-Ag stimulation of CD107a total-expression detected in HI (CD4⁺ T: 42.37 ±
380 3.55%; CD8⁺ T: 15.40 ± 2.81%; NK: 13.7 ± 2.12%; CD3⁺CD56⁺NKT: 5.13 ± 1.35%)
381 (Figure 6A) and AD patients (CD4⁺ T: 36.14 ± 5.18%; CD8⁺ T: 17.51 ± 4.0%; NK: 17.78
382 ± 3.60%; CD3⁺CD56⁺NKT: 7.44 ± 1.72%) (Figure 6B), as well as CD38 total-expression
383 observed in HI (CD4⁺ T: 55.1 ± 1.91%; CD8⁺ T: 15.25 ± 1.50%; NK: 22.88 ± 5.85%;
384 CD3⁺CD56⁺NKT: 3.94 ± 1.57%) (Figure 6C) and AD patients (CD4⁺ T: 51.65 ± 3.24%;
385 CD8⁺ T: 12.89 ± 1.23%; NK: 18.95 ± 2.76%; CD3⁺CD56⁺NKT: 6.17 ± 2.47%) (Figure 6D)
386 and CD279 total-expression observed in HI (CD4⁺ T: 44.79 ± 2.91%; CD8⁺ T: 21.88 ±
387 1.80%; NK: 25.56 ± 7.10%; CD3⁺CD56⁺NKT: 4.21 ± 0.69%) (Figure 6E) and AD patients
388 (CD4⁺ T: 48.41 ± 3.47%; CD8⁺ T: 23.88 ± 2.04%; NK: 19.14 ± 3.66%; CD3⁺CD56⁺NKT:
389 6.35 ± 2.18%) (Figure 6F).

390

391 **Fig 6. Total expression of CD107a, CD38 and CD279.** Column bar graphs represent
392 the percentages of CD4⁺ T, CD8⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells based on analyses
393 of the total-expression of CD107a (**A** and **B**), CD38 (**C** and **D**) and CD279 (**E** and **F**).
394 Results obtained from healthy individuals (HI; n=7) and patients with active cutaneous
395 leishmaniasis (AD; n=17). The data are represented by median ± standard error.
396 Statistical comparisons were performed with the *Mann–Whitney U-test*. *P ≤ 0.05, **P <
397 0.01, ***P < 0.001.

398

399 **Discussion**

400 The immunopathogenesis of human CL is dictated largely by the type and
401 magnitude of the host's immune response, but also by differences between the infecting
402 *Leishmania spp* [11]. The cytokine profiles produced by T cells were associated with the
403 healing process [15,18,30] or with the development of the disease [31–33], as well as
404 protective mechanisms [34]. Studies in the literature have shown the important role
405 played by CD4⁺ T lymphocytes in protection against CL by producing cytokines able to
406 activate the macrophages that kill the parasites [12]. Additionally, a protective role
407 performed by CD8⁺ T lymphocytes has also been reported [15–21]. Nevertheless, a
408 strong inflammatory response contributes to lesion development and the pathogenesis
409 of the disease, which has been associated with cytotoxic function, mainly by CD8⁺ T
410 lymphocytes [12]. Recently, our group demonstrated cytotoxic activity by different cell
411 populations, other than the classical-cytotoxic NK and CD8⁺ T cells. Cytotoxic-CD4⁺ T
412 lymphocytes and NKT cells are also able to have a cytotoxic function in *L. braziliensis*
413 infection, thus augmenting the discussion about the real role of these cell populations in
414 the CL pathogenesis [22]. Advances in our knowledge about which cells participate in
415 protection and mediate the exacerbation of the disease will certainly assist in new
416 protocols for vaccine development and immunotherapy.

417 Protective immunity against parasitic infection is critically dependent on the
418 development of a multifunctional T cell response that directly kills infected cells or

419 induces phagocyte activation to destroy intracellular parasites [35]. CD4⁺ T lymphocytes
420 are crucial for directing appropriate immune responses during host defense and it is well
421 established that CD4⁺ Th1 cells are essential for controlling *Leishmania* [11]. In addition
422 to their key roles as helper cells, they may play a pathogenic role as cytotoxic cells, and
423 it is necessary to consider the impact of this fact on the multifaceted pathology of
424 immune-related diseases [23,36]. Cytotoxic-CD4⁺ T lymphocytes have been implicated
425 in the control of a variety of persistent viral infections, such as HIV-1, CMV, EBV,
426 influenza, hantavirus and dengue infections [23]. However, the role of cytotoxic-CD4⁺ T
427 lymphocytes in CL is poorly understood. Analyses of cytotoxic-CD4⁺ T lymphocytes
428 demonstrated that they have lytic granules containing cytotoxic factors, such as
429 granzymes and perforin [37]. Our group evaluated CD4⁺ T lymphocyte degranulation
430 through CD107a expression [22], a lysosomal protein that is transiently exposed at the
431 cell surface upon degranulation process [29]. We could observe through this *ex vivo*
432 study the presence of degranulating-CD4⁺ T lymphocytes both in CL patients at different
433 clinical stages and in healthy individuals [22]. Still, cured patients exhibit lower
434 percentages of cells expressing CD107a⁺, which was associated with a possible
435 differentiation of these lymphocytes into memory cells [22]. In this present study, we
436 aimed to evaluate the specific cytotoxicity in response to *L. braziliensis* antigens. We
437 included in our study patients with active CL (AD), during treatment (DT) and clinically
438 cured (CC) and observed that *in vitro* assays from patients of all groups studied
439 presented an increase of degranulating-CD4⁺ T lymphocytes specifically when
440 stimulated with *L. braziliensis* antigen (*Lb*-Ag). Healthy individuals (HI) were used as
441 controls and it was not possible to verify any increase of this cell population in response
442 to *Lb*-Ag. It has been shown that cured CL patients from endemic areas for *L. major*
443 exhibit increased percentages of GranzymeB⁺CD4⁺ T lymphocytes in response to *L.*
444 *major* antigen, while the percentage of GranzymeB⁺CD8⁺ T lymphocytes was not altered
445 by the antigen [25]. This observation reinforces our findings that *Leishmania* induces an
446 increase of cytotoxic CD4⁺ T lymphocytes, which seem to be activated and exert their

447 cytotoxicity-effecting functions in the disease. We evaluated cell activation through CD38
448 expression, which allowed us to state that all groups of CL patients exhibit expansion of
449 activated CD4⁺ T lymphocytes in response to *Lb*-Ag. When evaluating the frequency of
450 total CD4⁺ T lymphocytes, we observed that the *Lb*-Ag induced a decrease of the
451 percentages in patients with active disease and in those under therapy. Recent results
452 from our group showed a lower frequency of CD4⁺ T lymphocytes in patients with active
453 CL [22]. However, despite a frequency contraction in CL patients due to *Lb*-Ag, the
454 functionality of these cells does not appear to be altered, since their activation and
455 degranulation percentages increase in these patients. In addition, precisely in order to
456 evaluate whether *L. braziliensis* induces impairment of cellular functionality, we
457 evaluated the CD279 expression. We observed that *Lb*-Ag did not influence the
458 expression of CD279 by CD4⁺ T lymphocytes when evaluating CL patients, evidencing
459 a functional status of these lymphocytes during the disease. A study in *L. major* mouse
460 model associated chronic disease with impaired antigen-specific cell proliferation and
461 IFN- γ production, with a concomitant increase in CD279 expression by CD4⁺ T
462 lymphocytes [38]. However, in the present study, we did not observe high percentages
463 of circulating CD279⁺CD4⁺ T cells in CL patients compared to HI and it was not possible
464 to associate such CD279 expression with disease evolution time (data not shown).

465 Following infection with *Leishmania*, CD8⁺ T lymphocytes respond to the MHC I-
466 peptide complexes by proliferating, leading to a population of *Leishmania*-specific T cells.
467 It is not fully understood how CD8⁺ T cells get activated in leishmaniasis, but it is clear
468 that they do respond during *Leishmania* infection [39]. Indeed, we detected an expansion
469 of CD8⁺ T lymphocytes from patients with active disease in response to *L. braziliensis*.
470 In the same way, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells from these patients also had antigen-
471 specific expansion. CD8⁺ T lymphocytes contribute to resistance against primary and
472 secondary infection and have been targeted for vaccine development, mainly because
473 their rapid IFN- γ production was associated with protection in *L. major* infection models
474 [40–45]. However, recent studies in human CL caused by *L. braziliensis* show that CD8⁺

475 T cells may increase pathology due to their cytotoxic role [46–49]. Nevertheless, in some
476 cases, the cytotoxic role of CD4⁺ T lymphocytes was not evaluated and/or no analysis
477 was performed to exclude NK and/or NKT cells in their methodologies. It is known that
478 NK and NKT cells can express CD4 and/or CD8, so they may be included when
479 analyzing only the expression of these markers. In this present study, during flow
480 cytometry analysis, we delimited a positive CD3 expression to define the T lymphocyte
481 population and excluded CD56 positive cells to eliminate any possible presence of NK
482 and NKT cells. Our results did not show *Leishmania*-specific cytotoxic activity by CD8⁺
483 T cells, since these lymphocytes from CL patients at any clinical stage presented no
484 change in their degranulation percentages in response to *Lb*-Ag. Conversely, we found
485 that CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells increase their degranulation percentages in
486 response to *Lb*-Ag, a fact observed in all CL patient groups. Furthermore, we also
487 detected expansion of activated antigen-specific CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells
488 in all CL patient groups. A recent study of our group approached the cellular cytotoxic
489 profile in lesions of CL patients from *L. braziliensis* endemic area. It was shown that
490 CD3⁺CD56⁺ NKT cells, CD4⁺ T and double-negative (DN) T cells are the most
491 compromised cell populations with cytotoxic activity, given their high percentages of
492 CD107a expression. When the pool of CD107a⁺ cells was analyzed, it was possible to
493 observe high proportions of DN and CD3⁺CD56⁺ NKT cells. Surprisingly, NK and CD8⁺
494 T cells represented only 3% and 4%, respectively, of the total-CD107a⁺-cell pool [50].
495 Therefore, it seems that the cytotoxicity, hallmark of *L. braziliensis* infection, is even
496 deleterious in the evolution of the disease. Moreover, the cell population responsible for
497 cytotoxicity should be carefully analyzed, since such results may reflect the discovery of
498 vaccine targets and immunotherapies.

499 Little is known about the role of NK cells in CL caused by *L. braziliensis*. Studies
500 in experimental models with other species of *Leishmania* have been discussing that they
501 are non-essential for the pathology resolution [27] and some authors have proposed that

502 NK cell-mediated cytotoxicity contributes to tissue damage in *L. braziliensis* infection
503 [51]. We observed that *Lb*-Ag induced an expansion of the total, activated and
504 degranulating-NK cells in all CL patient groups. In a previous *ex vivo* study [22], low
505 percentages of CD107a⁺ NK cells in CL patients were detected, which was associated
506 with a possible suppression of NK cell activity by the parasite, phenomenon noted in *L.*
507 *major* infection [52]. These authors also observed that *Leishmania* reduces the ability of
508 NK cells to lyse target cells and that direct contact of NK cells with promastigotes results
509 in the destruction of both cells. In this sense, our results show clearly an expansion of
510 CD279⁺ NK cells in all CL patient groups, evidencing an antigen-induced cell exhaustion
511 state. A behavior of poor NK cell functionality, characteristic of the exhaustion state, was
512 observed in diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL) by *L. mexicana* and it was associated
513 with the severity of the disease [53]. In DCL caused by *L. mexicana*, a correlation of
514 pathological severity with CD279 expression by circulating CD8⁺ T lymphocytes has
515 already been demonstrated [54]. We only observed increased expression of CD279⁺
516 CD8⁺ T lymphocytes in DT, group which also showed an increase in activated CD8⁺ T
517 lymphocytes, suggesting that it may be associated with some effect of the drug therapy
518 along with the antigen.

519 The role of NKT cells in the resistance or susceptibility
520 towards *Leishmania* infections remains to be defined, since controversial data persist
521 [26]. NKT cells have been better studied in visceral leishmaniasis (VL), their activation
522 was demonstrated by a direct pathway where *Leishmania*-glycocalyx antigens presented
523 by a CD1d bind to invariant TCR and their participation both in producing cytokines and
524 with cytotoxic activity lysing target cells [55–57]. Studies in CL are scarce. It has recently
525 been shown that NKT cell activation in CL may also occur through an indirect pathway,
526 where *L. mexicana* LPG activates dendritic cells which results in the induction of IFN- γ
527 production by NKT cells [58]; and these cells act as cytotoxic through the externalization
528 of lytic granules [22]. We observed that *Lb*-Ag induces CD3⁺CD56⁺ NKT cell activation,

529 leading to an increase in the frequency of total and activated-NKT cells in all CL patient
530 groups. Furthermore, an expansion of CD107a⁺ CD3⁺CD56⁺ NKT cells was clearly
531 demonstrated in CL patients due to the *Lb*-Ag. Ferraz *et al* (2017) found high
532 percentages of total and degranulating-NKT cells in CL patient's lesions, reinforcing the
533 involvement of NKT cells with cytotoxic activity in CL [50]. It is well known that NKT cells
534 are sub-divided into two distinct subsets in humans: type I or invariant NKT (iNKT) cells,
535 which express an invariant V α 24-J α 18 TCR; and a type II or variant NKT cells, which
536 include all other CD1d-dependent T cells [59]. It has been reported that about 70% of
537 NKT cells had an invariant profile [60], however, such frequency varies in humans and
538 some authors point to high percentages of type II NKT cells as well [61,62]. For this
539 reason, we decided to analyze which proportion of invariant NKT cells was present in
540 our sampling. Unexpectedly, we found very low frequency of CD3⁺CD56⁺ NKT cells
541 expressing V α 24-J α 18 TCR, both in CL patients and HI. It is already established that
542 type II NKT cells are reactive to both glycolipids and phospholipids derived from self, as
543 well as microbes. Studies focusing on this subset have emerged and suggest that these
544 cells may impact the biology of diverse parasitic infections and may either promote
545 protective innate and adaptive immune responses or contribute to pathogen-mediated
546 tissue injury [61,63]. Phosphatidylglycerol and diphosphatidylglycerol derived from the
547 *Mycobacterium tuberculosis* have been reported to be ligands for type II NKT cells [64].

548 In summary, our work shows with originality a great contribution of type II NKT
549 cells in CL pathogenesis, since *Lb*-Ag were able to induce an increase in their frequency,
550 activation and degranulation from CL patients. We still observed that *Lb*-Ag induced
551 increase of CD279⁺CD3⁺CD56⁺ NKT cells in healing CL patients. A mechanism of
552 inhibition of NKT cell activity by CD279 was described in patients with tuberculosis,
553 where it was observed that the blockage of CD279 prevented the apoptosis of IFN- γ ⁺NKT
554 cells and enhanced their lytic degranulation [65]. Further studies are needed to
555 understand why healed CL patients showed increases of exhausted NKT cells in the

556 presence of *Lb*-Ag and, furthermore, verify whether blockade of CD279 pathway results
557 in an increase in the cell activity in CL. In DCL it was possible to restore the effector
558 mechanisms of exhausted CD8⁺ T lymphocytes [54].

559 Due to the importance of lymphocyte trafficking in dynamics of infection and their
560 relation with the formation of the inflammatory infiltrate and healing process, we also
561 intended to evaluate the CLA expression, important homing molecule for skin [66], in
562 order to verify whether *Lb*-Ag modulates CLA expression, as this may influence the
563 function and migration pattern of effector cells. However, we did not observe modulation
564 of CLA expression by *Lb*-Ag in CD8⁺ T, CD4⁺ T, NK and CD3⁺CD56⁺ NKT cells neither
565 in CL patient groups nor in HI (data not shown). Otherwise, Mendes-Aguiar *et al* (2009)
566 suggested that *L. braziliensis* antigens up-regulate CLA expression in T lymphocytes
567 during active CL [67]. Such divergence of the results may be due to the difference in the
568 analysis strategy, where we compared the CLA expression results of the *Lb*-Ag-
569 stimulated cells with the non-stimulated cells under the same culture conditions; while
570 the other authors compared the stimulated T lymphocytes with *ex vivo* results. We
571 believe that this non-modulation in CLA expression may be due to the fact that soluble
572 chemotactic factors tissue-derived are required for T cell tracking into the inflamed
573 tissues [68].

574

575 **Conclusions**

576 In summary, we show that specific cytotoxic response in CL is exerted by different
577 cell populations, highlighting the role of CD4⁺ T lymphocytes as the most expressive
578 population in activation, degranulation process and exhaustion receptor expression. The
579 specific response to *L. braziliensis* antigen resulted in expansion of activated and
580 degranulating-CD4⁺ T lymphocytes, NK and CD3⁺CD56⁺NKT cells from CL patients,
581 besides exhaustion of NK cells. Such increase of cytotoxic activity and cellular activation
582 may be related to the tissue damage observed due to the strong inflammatory response

583 characteristic of the disease. However, CD8⁺ T lymphocytes surprisingly did not show
584 specific cytotoxic activity to *L. braziliensis* antigens, indicating that these cells participate
585 in the CL immunopathogenesis, they are able to expand in response to the antigens, but
586 are not responsible for the deleterious cytotoxicity in CL.

587

588 **References**

- 589 1. Gramiccia M, Gradoni L. The current status of zoonotic leishmaniases and
590 approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005;35: 1169–1180.
591 doi:10.1016/j.ijpara.2005.07.001
- 592 2. Pace D. Leishmaniasis. *J Infect.* 2014;69 Suppl 1: S10-18.
593 doi:10.1016/j.jinf.2014.07.016
- 594 3. Gupta G, Oghumu S, Satoskar AR. Mechanisms of immune evasion in
595 leishmaniasis. *Adv Appl Microbiol.* 2013;82: 155–184. doi:10.1016/B978-0-12-
596 407679-2.00005-3
- 597 4. WHO | Brazil. In: WHO [Internet]. [cited 17 Jan 2017]. Available:
598 <http://www.who.int/gho/countries/bra/en/>
- 599 5. Brasil, 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose tegumentar Americana, 3rd Ed.
600 Ministério da Saúde, Brasília (DF).;
- 601 6. Mendonça MG, de Brito MEF, Rodrigues EHG, Bandeira V, Jardim ML, Abath FGC.
602 Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American
603 cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? *J Infect Dis.* 2004;189: 1018–1023.
604 doi:10.1086/382135
- 605 7. Schubach A, Haddad F, Oliveira-Neto MP, Degraive W, Pirmez C, Grimaldi G Jr, et
606 al. Detection of Leishmania DNA by polymerase chain reaction in scars of treated
607 human patients. *J Infect Dis.* 1998;178: 911–914.
- 608 8. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A. Immunoregulation of cutaneous
609 leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong
610 to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J Exp Med.*
611 1988;168: 1675–1684.
- 612 9. Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal
613 expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression
614 of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J*
615 *Exp Med.* 1989;169: 59–72.
- 616 10. De Luca PM, Macedo ABB. Cutaneous Leishmaniasis Vaccination: A Matter of
617 Quality. *Front Immunol.* 2016;7: 151. doi:10.3389/fimmu.2016.00151
- 618 11. Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and
619 pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 2016;16: 581–592. doi:10.1038/nri.2016.72

- 620 12. da Silva Santos C, Brodskyn CI. The Role of CD4 and CD8 T Cells in Human
621 Cutaneous Leishmaniasis. *Front Public Health*. 2014;2: 165.
622 doi:10.3389/fpubh.2014.00165
- 623 13. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ.
624 Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous
625 leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2005;101: 226–230. doi:10.1016/j.imlet.2005.06.004
- 626 14. Oliveira WN, Ribeiro LE, Schrieffer A, Machado P, Carvalho EM, Bacellar O. The
627 role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human
628 tegumentary leishmaniasis. *Cytokine*. 2014;66: 127–132.
629 doi:10.1016/j.cyto.2013.12.016
- 630 15. Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-reactive
631 CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis.
632 *Infect Immun*. 1994;62: 2614–2618.
- 633 16. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V,
634 et al. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal
635 leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2002;9:
636 251–256.
- 637 17. Da-Cruz AM, Bertho AL, Oliveira-Neto MP, Coutinho SG. Flow cytometric analysis
638 of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J*
639 *Dermatol*. 2005;153: 537–543. doi:10.1111/j.1365-2133.2005.06647.x
- 640 18. Coutinho SG, Da-Cruz AM, Bertho AL, Santiago MA, De-Luca P. Immunologic
641 patterns associated with cure in human American cutaneous leishmaniasis. *Braz J*
642 *Med Biol Res Rev Bras Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al*.
643 1998;31: 139–142.
- 644 19. Bittar RC, Nogueira RS, Vieira-Gonçalves R, Pinho-Ribeiro V, Mattos MS, Oliveira-
645 Neto MP, et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection
646 in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem Inst*
647 *Oswaldo Cruz*. 2007;102: 625–630.
- 648 20. Bertho AL, Santiago MA, Da-Cruz AM, Coutinho SG. Detection of early apoptosis
649 and cell death in T CD4+ and CD8+ cells from lesions of patients with localized
650 cutaneous leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res Rev Bras Pesqui Medicas E Biol*.
651 2000;33: 317–325.
- 652 21. Ferraz R, Cunha CF, Gomes-Silva A, Schubach AO, Pimentel MIF, Lyra MR, et al.
653 Apoptosis and frequency of total and effector CD8+ T lymphocytes from cutaneous
654 leishmaniasis patients during antimonial therapy. *BMC Infect Dis*. 2015;15: 74.
655 doi:10.1186/s12879-015-0799-x
- 656 22. Cunha CF, Ferraz R, Pimentel MIF, Lyra MR, Schubach AO, Da-Cruz AM, et al.
657 Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in
658 active disease, under therapy and after clinical cure. *Parasite Immunol*. 2016;38:
659 244–254. doi:10.1111/pim.12312
- 660 23. Juno JA, van Bockel D, Kent SJ, Kelleher AD, Zaunders JJ, Munier CML. Cytotoxic
661 CD4 T Cells—Friend or Foe during Viral Infection? *Front Immunol*. 2017;8.
662 doi:10.3389/fimmu.2017.00019

- 663 24. Sallusto F. Heterogeneity of Human CD4(+) T Cells Against Microbes. *Annu Rev*
664 *Immunol.* 2016;34: 317–334. doi:10.1146/annurev-immunol-032414-112056
- 665 25. Naouar I, Boussoffara T, Ben Ahmed M, Belhaj Hmida N, Gharbi A, Gritli S, et al.
666 Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune
667 response to *Leishmania major* antigens. *Mediators Inflamm.* 2014;2014: 636039.
668 doi:10.1155/2014/636039
- 669 26. Zamora-Chimal J, Hernández-Ruiz J, Becker I. NKT cells in leishmaniasis.
670 *Immunobiology.* 2016; doi:10.1016/j.imbio.2016.11.014
- 671 27. Bogdan C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. *Front Cell*
672 *Infect Microbiol.* 2012;2. doi:10.3389/fcimb.2012.00069
- 673 28. Wherry EJ. T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2011;12: 492–499.
- 674 29. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, et al.
675 Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow
676 cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods.* 2003;281: 65–78.
- 677 30. Coutinho SG, Oliveira MP, Da-Cruz AM, De Luca PM, Mendonça SC, Bertho AL,
678 et al. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to
679 purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis*
680 promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp Parasitol.*
681 1996;84: 144–155. doi:10.1006/expr.1996.0100
- 682 31. Bomfim G, Nascimento C, Costa J, Carvalho EM, Barral-Netto M, Barral A.
683 Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous
684 leishmaniasis. *Exp Parasitol.* 1996;84: 188–194. doi:10.1006/expr.1996.0104
- 685 32. Carvalho EM, Johnson WD, Barreto E, Marsden PD, Costa JL, Reed S, et al. Cell
686 mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J Immunol*
687 *Baltim Md* 1950. 1985;135: 4144–4148.
- 688 33. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM. Cytokine
689 profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res Rev Bras*
690 *Pesqui Médicas E Biológicas Soc Bras Biofísica Al.* 1998;31: 143–148.
- 691 34. Mendonca SC, De Luca PM, Mayrink W, Restom TG, Conceicao-Silva F, Da-Cruz
692 AM, et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses
693 induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med*
694 *Hyg.* 1995;53: 195–201.
- 695 35. Macedo ABB, Sánchez-Arcila JC, Schubach AO, Mendonça SCF, Marins-Dos-
696 Santos A, de Fatima Madeira M, et al. Multifunctional CD4⁺ T cells in patients with
697 American cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2012;167: 505–513.
698 doi:10.1111/j.1365-2249.2011.04536.x
- 699 36. Hirahara K, Nakayama T. CD4⁺ T-cell subsets in inflammatory diseases: beyond
700 the Th1/Th2 paradigm. *Int Immunol.* 2016;28: 163–171.
701 doi:10.1093/intimm/dxw006
- 702 37. Soghoian DZ, Streeck H. Cytolytic CD4(+) T cells in viral immunity. *Expert Rev*
703 *Vaccines.* 2010;9: 1453–1463. doi:10.1586/erv.10.132

- 704 38. Mou Z, Muleme HM, Liu D, Jia P, Okwor IB, Kuriakose SM, et al. Parasite-derived
705 arginase influences secondary anti-Leishmania immunity by regulating
706 programmed cell death-1-mediated CD4+ T cell exhaustion. *J Immunol Baltim Md*
707 1950. 2013;190: 3380–3389. doi:10.4049/jimmunol.1202537
- 708 39. Novais FO, Scott P. CD8(+) T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad,
709 and the ugly. *Semin Immunopathol.* 2015; doi:10.1007/s00281-015-0475-7
- 710 40. Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T
711 helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing
712 CD8+ T cells. *J Exp Med.* 2004;199: 1559–1566. doi:10.1084/jem.20040172
- 713 41. Müller I, Kropf P, Louis JA, Milon G. Expansion of gamma interferon-producing
714 CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to *Leishmania major*.
715 *Infect Immun.* 1994;62: 2575–2581.
- 716 42. Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, et al.
717 Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen
718 confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med.*
719 1997;186: 1137–1147.
- 720 43. Bertholet S, Debrabant A, Afrin F, Caler E, Mendez S, Tabbara KS, et al. Antigen
721 requirements for efficient priming of CD8+ T cells by *Leishmania major*-infected
722 dendritic cells. *Infect Immun.* 2005;73: 6620–6628. doi:10.1128/IAI.73.10.6620-
723 6628.2005
- 724 44. Rhee EG, Mendez S, Shah JA, Wu C, Kirman JR, Turon TN, et al. Vaccination with
725 heat-killed leishmania antigen or recombinant leishmanial protein and CpG
726 oligodeoxynucleotides induces long-term memory CD4+ and CD8+ T cell
727 responses and protection against leishmania major infection. *J Exp Med.* 2002;195:
728 1565–1573.
- 729 45. da Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA, Romero P. *Leishmania major* infection
730 in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+
731 cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol.* 1994;24: 2813–2817.
732 doi:10.1002/eji.1830241135
- 733 46. Santos C da S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha
734 A, et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated
735 parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2013;133:
736 1533–1540. doi:10.1038/jid.2013.4
- 737 47. Cardoso TM, Machado Á, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, et al.
738 Protective and pathological functions of CD8+ T cells in *Leishmania braziliensis*
739 infection. *Infect Immun.* 2015;83: 898–906. doi:10.1128/IAI.02404-14
- 740 48. Faria DR, Souza PEA, Durães FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, et al.
741 Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion
742 progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2009;31: 432–
743 439. doi:10.1111/j.1365-3024.2009.01125.x
- 744 49. de Oliveira Mendes-Aguiar C, Vieira-Gonçalves R, Guimarães LH, de Oliveira-Neto
745 MP, Carvalho EM, Da-Cruz AM. Effector memory CD4+ T cells differentially
746 express activation associated molecules depending on the duration of American

- 747 cutaneous leishmaniasis lesions. *Clin Exp Immunol.* 2016;185: 202–209.
748 doi:10.1111/cei.12798
- 749 50. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, Lyra MR, Pereira-da-Silva T, Da-Cruz AM, et
750 al. CD3+CD4negCD8neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the
751 main cytotoxic-related-CD107a+ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused
752 by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasit Vectors.* 2017; Forthcoming.
- 753 51. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araújo C, Carvalho EM. Evidence
754 of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol EJD.*
755 2002;12: 449–451.
- 756 52. Lieke T, Nylén S, Eidsmo L, Schmetz C, Berg L, Akuffo H. The interplay between
757 *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct
758 lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania*
759 promastigotes. *Parasitology.* 2011; 1–12. doi:10.1017/S0031182011001363
- 760 53. Cañeda-Guzmán IC, Salaiza-Suazo N, Fernández-Figueroa EA, Carrada-Figueroa
761 G, Aguirre-García M, Becker I. NK cell activity differs between patients with
762 localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*:
763 a comparative study of TLRs and cytokines. *PLoS One.* 2014;9: e112410.
764 doi:10.1371/journal.pone.0112410
- 765 54. Hernández-Ruiz J, Salaiza-Suazo N, Carrada G, Escoto S, Ruiz-Remigio A,
766 Rosenstein Y, et al. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis
767 display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists.
768 *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4: e871. doi:10.1371/journal.pntd.0000871
- 769 55. Amprey JL, Im JS, Turco SJ, Murray HW, Illarionov PA, Besra GS, et al. A subset
770 of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound
771 lipophosphoglycan. *J Exp Med.* 2004;200: 895–904. doi:10.1084/jem.20040704
- 772 56. Karmakar S, Paul J, De T. *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates
773 antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected
774 macrophages. *Eur J Immunol.* 2011;41: 1376–1387. doi:10.1002/eji.201040981
- 775 57. Campos-Martín Y, Colmenares M, Gozalbo-López B, López-Núñez M, Savage PB,
776 Martínez-Naves E. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania*
777 *infantum* are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by
778 NKT cells. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2006;176: 6172–6179.
- 779 58. Zamora-Chimal J, Fernández-Figueroa EA, Ruiz-Remigio A, Wilkins-Rodríguez
780 AA, Delgado-Domínguez J, Salaiza-Suazo N, et al. NKT cell activation by
781 *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. *Immunobiology.*
782 2017;222: 454–462. doi:10.1016/j.imbio.2016.08.003
- 783 59. Godfrey DI, MacDonald HR, Kronenberg M, Smyth MJ, Van Kaer L. NKT cells:
784 what's in a name? *Nat Rev Immunol.* 2004;4: 231–237. doi:10.1038/nri1309
- 785 60. Bendelac A, Savage PB, Teyton L. The biology of NKT cells. *Annu Rev Immunol.*
786 2007;25: 297–336. doi:10.1146/annurev.immunol.25.022106.141711
- 787 61. Dhodapkar MV, Kumar V. Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health
788 and Disease. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2017;198: 1015–1021.
789 doi:10.4049/jimmunol.1601399

- 790 62. Exley MA, Tahir SM, Cheng O, Shaulov A, Joyce R, Avigan D, et al. A major fraction
791 of human bone marrow lymphocytes are Th2-like CD1d-reactive T cells that can
792 suppress mixed lymphocyte responses. *J Immunol Baltim Md 1950.* 2001;167:
793 5531–5534.
- 794 63. Jahng A, Maricic I, Aguilera C, Cardell S, Halder RC, Kumar V. Prevention of
795 autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population
796 reactive to sulfatide. *J Exp Med.* 2004;199: 947–957. doi:10.1084/jem.20031389
- 797 64. Tatituri RVV, Watts GFM, Bhowruth V, Barton N, Rothchild A, Hsu F-F, et al.
798 Recognition of microbial and mammalian phospholipid antigens by NKT cells with
799 diverse TCRs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110: 1827–1832.
800 doi:10.1073/pnas.1220601110
- 801 65. Singh A, Dey AB, Mohan A, Mitra DK. Programmed death-1 receptor suppresses
802 γ -IFN producing NKT cells in human tuberculosis. *Tuberc Edinb Scotl.* 2014;94:
803 197–206. doi:10.1016/j.tube.2014.01.005
- 804 66. Santamaria-Babí LF. CLA(+) T cells in cutaneous diseases. *Eur J Dermatol EJD.*
805 2004;14: 13–18.
- 806 67. Mendes-Aguiar C de O, Gomes-Silva A, Nunes E, Pereira-Carvalho R, Nogueira
807 RS, Oliveira-Neto M de P, et al. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-
808 associated antigen (CLA) is up-regulated by Leishmania antigens in T lymphocytes
809 during active cutaneous leishmaniasis. *Clin Exp Immunol.* 2009;157: 377–384.
810 doi:10.1111/j.1365-2249.2009.03970.x
- 811 68. Schön MP, Zollner TM, Boehncke W-H. The Molecular Basis of Lymphocyte
812 Recruitment to the Skin: Clues for Pathogenesis and Selective Therapies of
813 Inflammatory Disorders. *J Invest Dermatol.* 2003;121: 951–962.
814 doi:10.1046/j.1523-1747.2003.12563.x

815

816 **Conflict of Interest Disclosure**

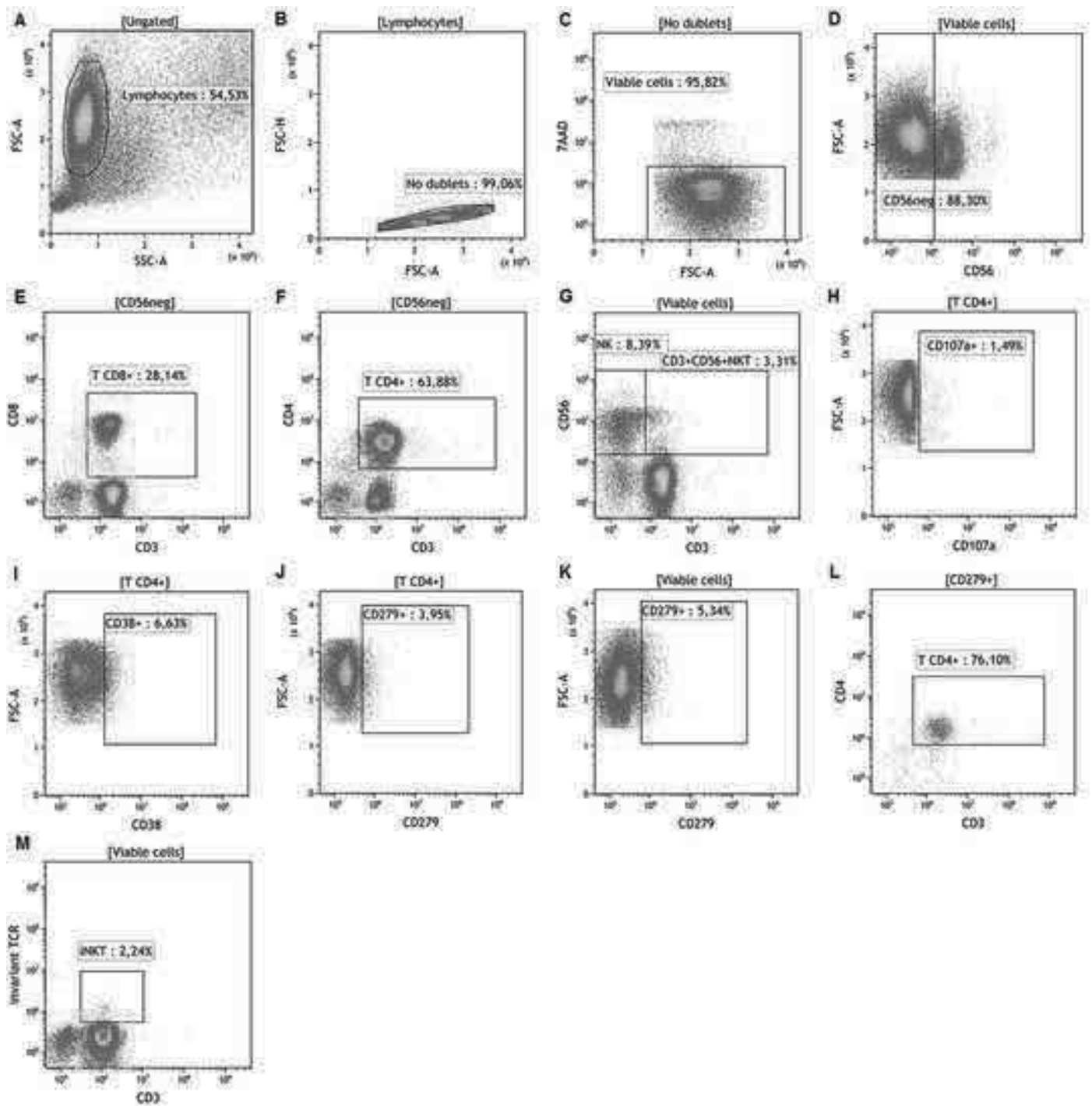
817 All the authors have declared that no competing interest exists.

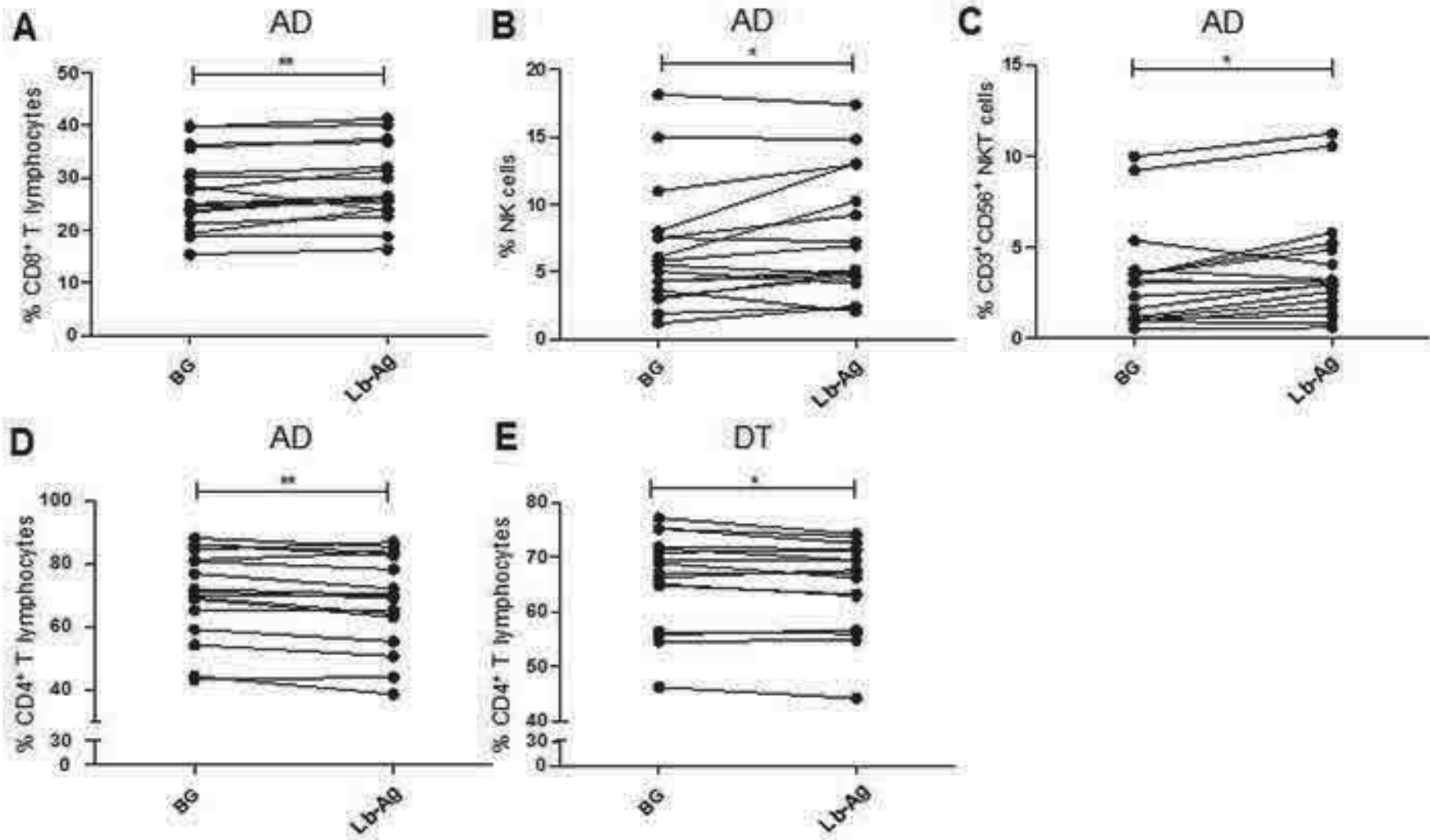
818

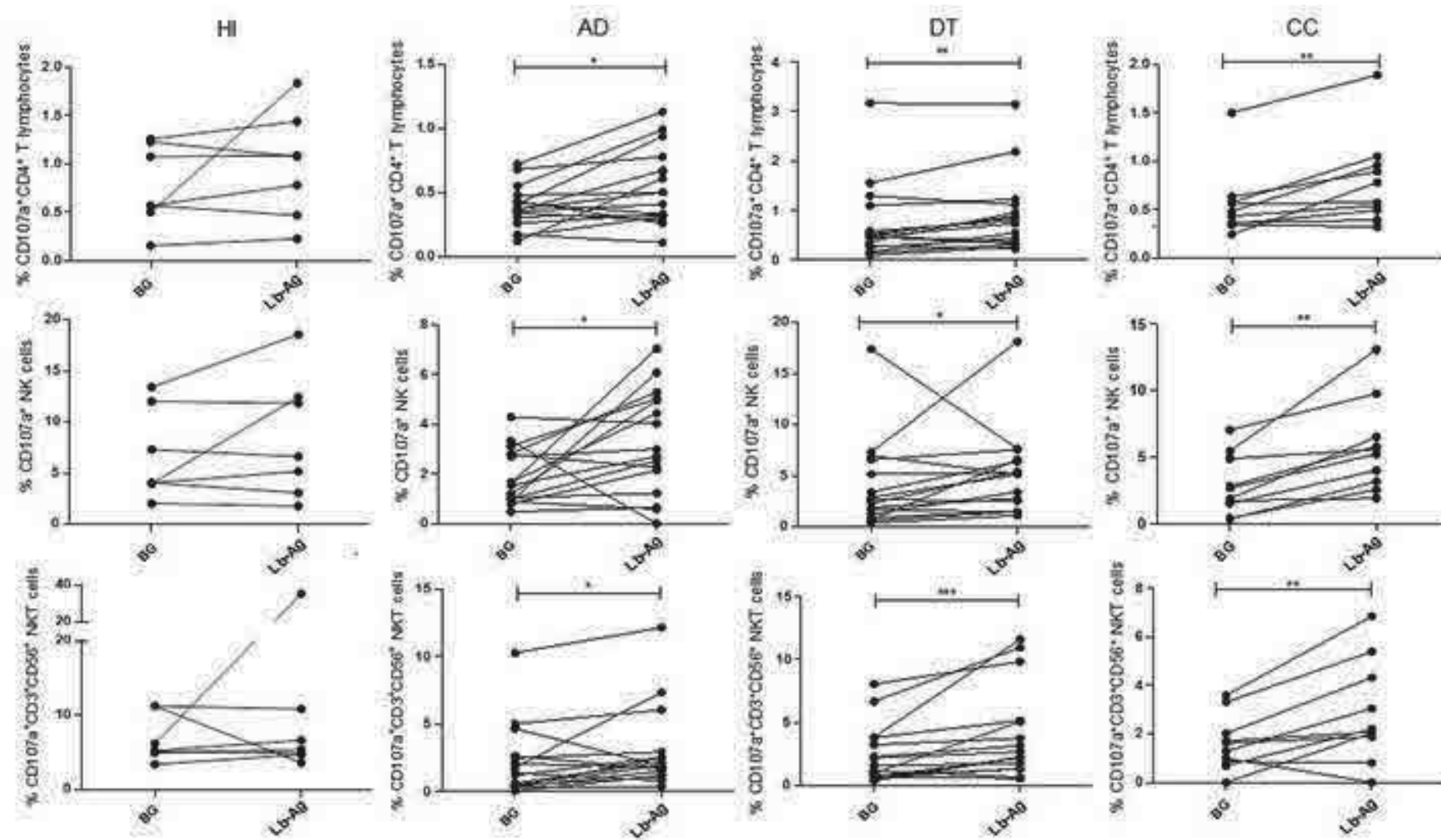
819 **Acknowledgments**

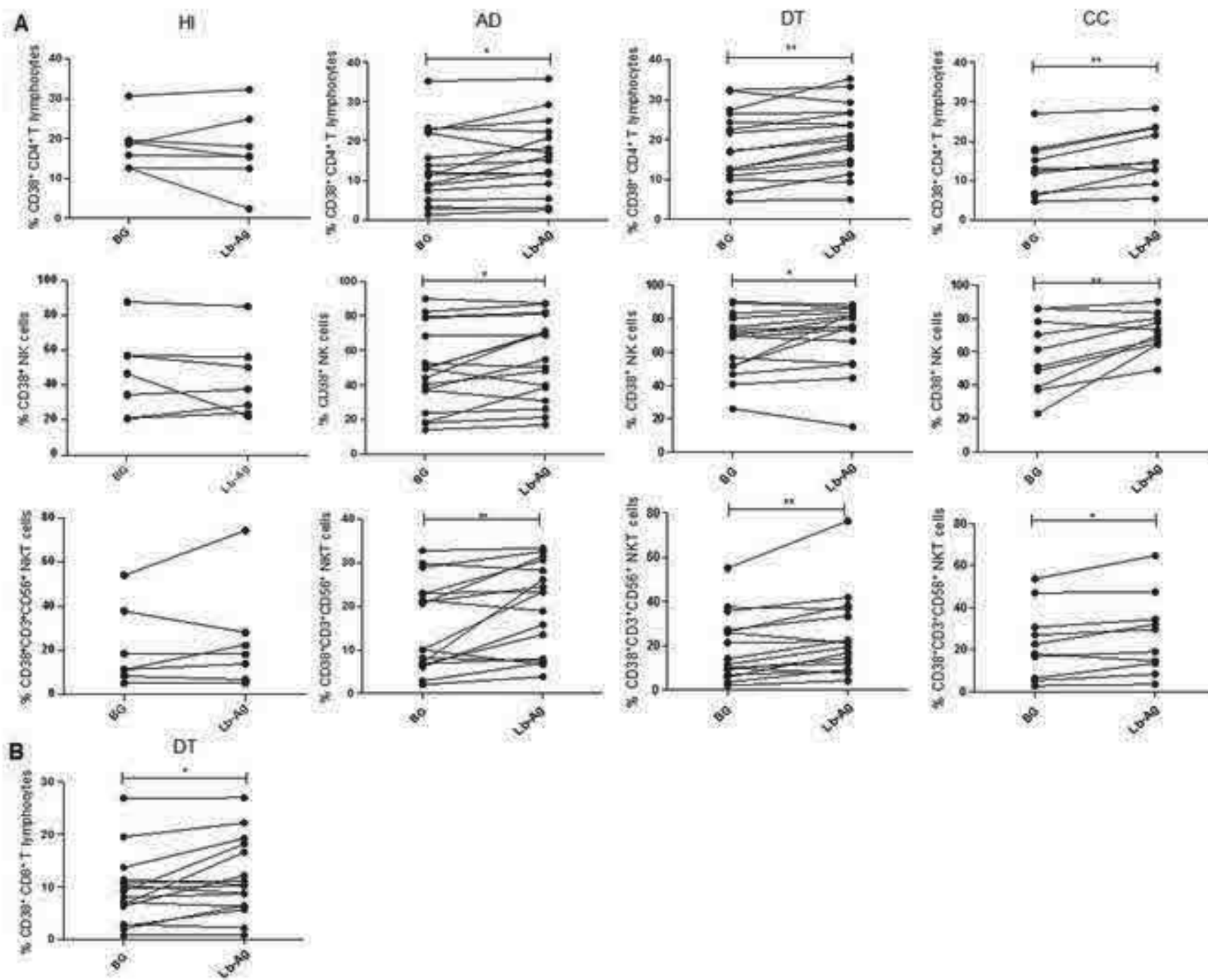
820 The authors would like to thank the Flow Cytometry Sorting Core, Oswaldo Cruz
821 Institute, FIOCRUZ for availability to flow cytometry acquisitions (MoFlo ASTRIOS Cell
822 Sorter, Beckman Coulter, FL, USA). This research was supported in part by an internal
823 funding from IOC-FIOCRUZ and PROEP-CNPq-IOC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

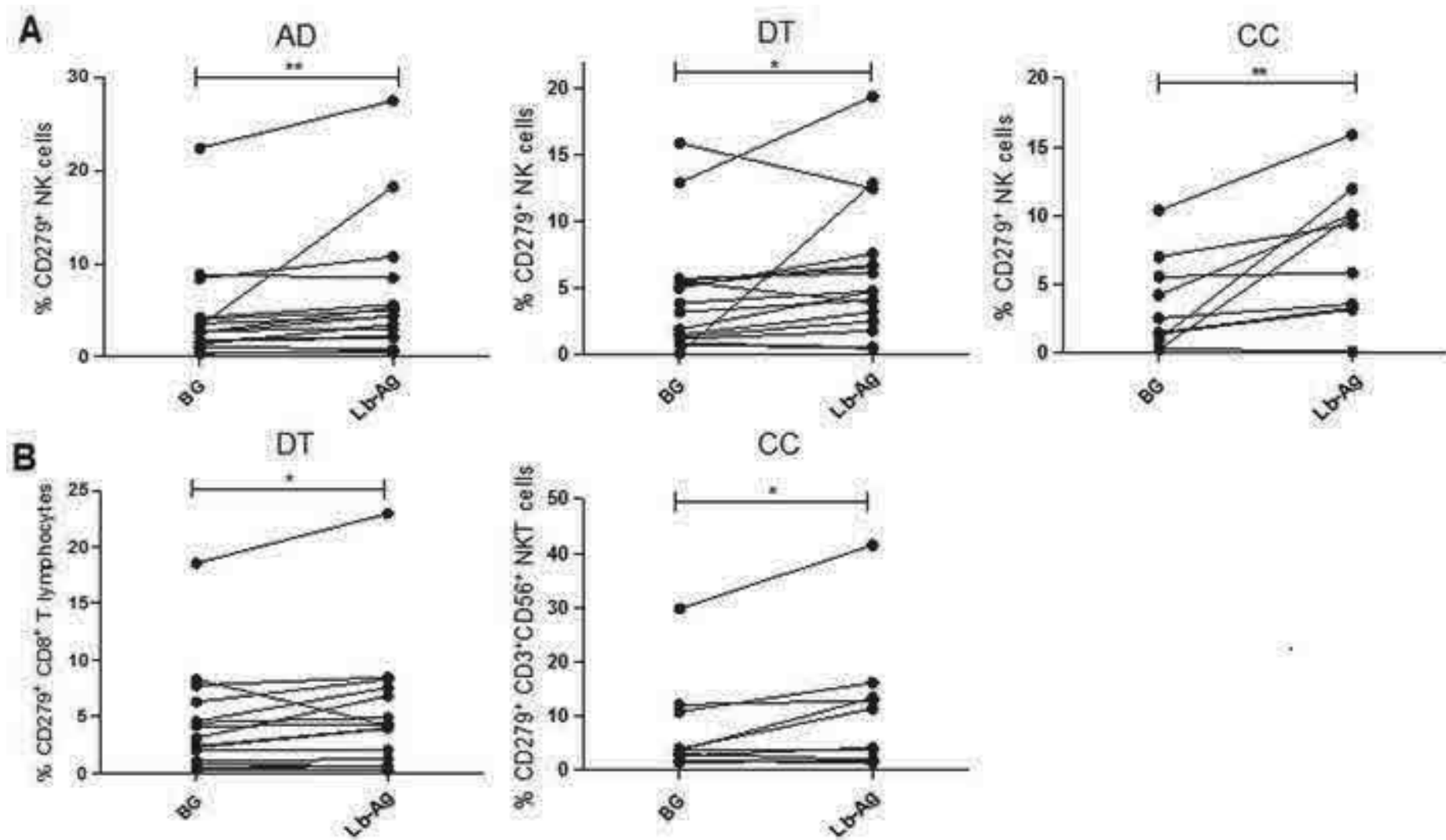
825

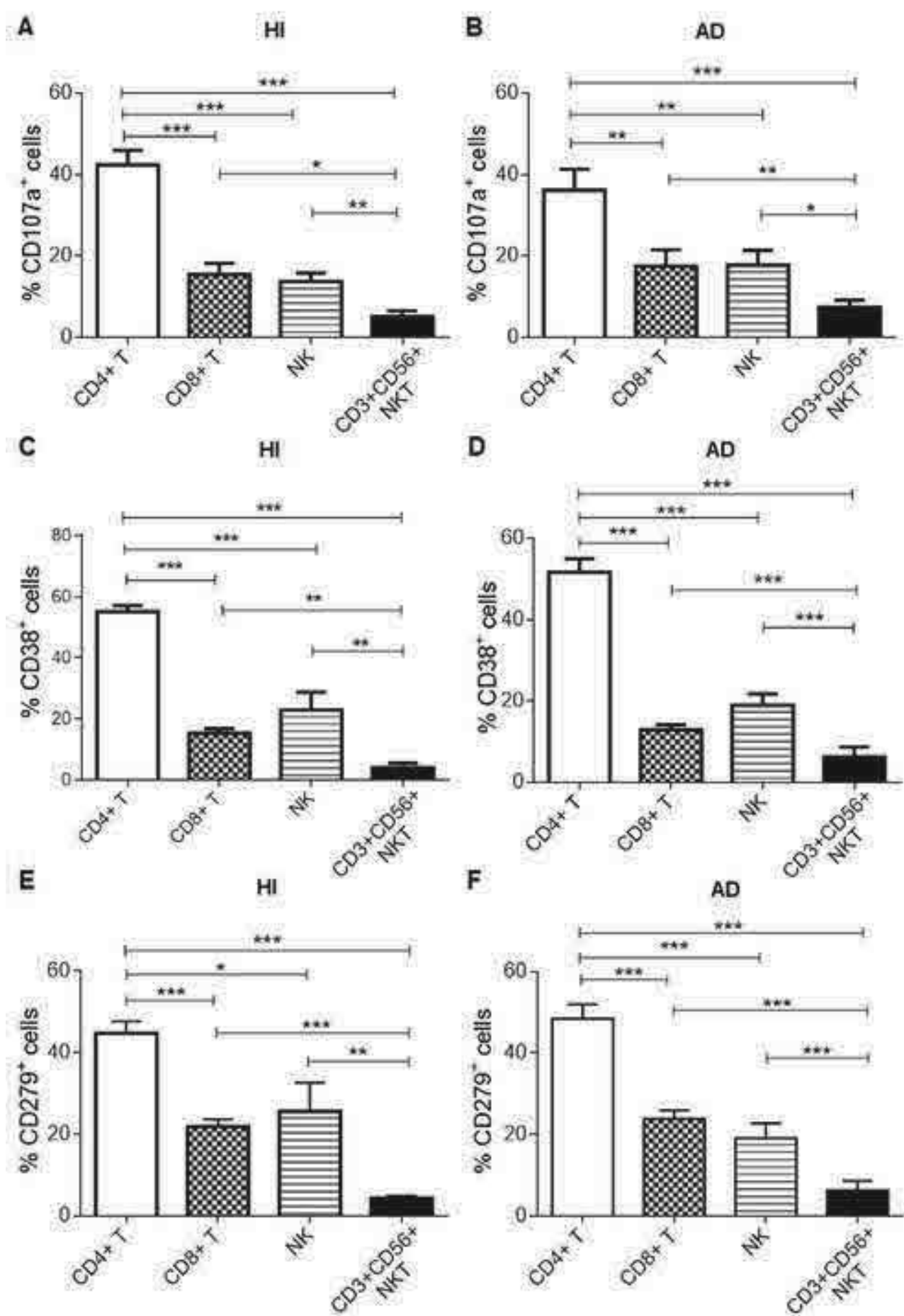












9.4. ANEXO 4

Artigo publicado: CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. (2017)

RESEARCH

Open Access



CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*

Raquel Ferraz^{1,2}, Clarissa F. Cunha¹, Maria Inês F. Pimentel³, Marcelo R. Lyra³, Tatiana Pereira-Da-Silva⁴, Armando O. Schubach³, Alda Maria Da-Cruz⁵ and Alvaro Luiz Bertho^{1,2*}

Abstract

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which infects dermal macrophages and dendritic cells, causing an intense immune-mediated-tissue inflammation and a skin ulcer with elevated borders that can heal spontaneously or after antimonial therapy. The resolution of lesions depends on an adaptive immune response, and cytotoxic cells seem to have a fundamental role in this process. The aim of this study is to better understand the role of cytotoxicity mediated mechanisms that occur during the immune response in the CL lesion milieu, considering distinct cytotoxic-related CD107a⁺ cells, such as CD8⁺, CD4⁺, CD4^{neg}CD8^{neg} (double-negative, DN) and CD4⁺CD8⁺ (double-positive, DP) T lymphocytes, as well as NK and NKT cells.

Methods: Lesion derived cells were assessed for T cell subpopulations and NK cells, as well as CD107a expression by flow cytometry. In addition, cytometric bead array (CBA) was used to quantify cytokines and granzyme B concentrations in supernatants from macerated lesions.

Results: Flow cytometry analyses revealed that NKT cells are the major CD107a-expressing cell population committed to cytotoxicity in CL lesion, although we also observed high frequencies of CD4⁺ and DN T cells expressing CD107a. Analysing the pool of CD107a⁺-cell populations, we found a higher distribution of DN T cells (44%), followed by approximately 25% of NKT cells. Interestingly, NK and CD8⁺ T cells represented only 3 and 4% of the total-CD107a⁺-cell pool, respectively.

Conclusions: The cytotoxicity activity that occurs in the lesion milieu of CL patients seems to be dominated by DN T and NKT cells. These findings suggest the need for a reevaluation of the role of classical-cytotoxic NK and CD8⁺ T cells in the pathogenesis of CL, implicating an important role for other T cell subpopulations.

Keywords: Flow cytometry, Cytotoxicity, CD107a, Double-negative T lymphocytes, NKT cells, Lesion, Human cutaneous leishmaniasis, *Leishmania (Viannia) braziliensis*

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

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

²Flow Cytometry Sorting Core Facility, 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 a major neglected tropical disease affecting humans globally [1]. In Brazil, American tegumentary leishmaniasis (ATL) is caused mainly by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and is present in all states, including Rio de Janeiro, where it is endemic. The disease presents a broad spectrum of clinical, immunological and histopathological manifestations, ranging from self-healing localised cutaneous leishmaniasis (CL) to destructive mucosal leishmaniasis (ML). CL is the most frequent clinical form of ATL and is characterised by the parasitic infection of derma, which results in an intense immune-mediated tissue inflammation and a skin ulcer with elevated borders that can heal spontaneously or after antimonial therapy. *Leishmania* induces a chronic granulomatous inflammatory disease, given it involves the recruitment of lymphocytes, plasmocytes and macrophages to the skin [2]. Several authors have demonstrated that the pathogenesis of ATL is dependent on the cellular immune response and it seems to affect the clinical outcome of the disease by T-lymphocyte effector functions and cytokine profiles [3–5]. Thus, even though the host immune response contributes to protection, it may also be deleterious favouring the establishment and persistence of the disease. Studying the cellular immune response in ATL lesions allows us to propose mechanism involved in the formation, persistence or healing of leishmaniasis lesions.

Although CD4⁺ T cells are clearly an important source of cytokines to activate leishmanicidal activities, it is equally evident that several other cell types are essential for an efficient immune response in the lesion microenvironment of leishmaniasis. In this context, some reports have shown that CD8⁺ T cells may have an imperative role in the immune response in this disease, mainly acting as IFN- γ producers, as well as cytotoxic cells. However, their role as a beneficial or deleterious subpopulation is controversial, depending on their functional status.

It is worthy to highlight that the majority of studies about the immune response in ATL were performed with samples obtained from peripheral blood of patients; however, the immunopathogenic events take place in situ, which highlights the importance of studying the lesion microenvironment. Previous observations from our group have shown an expansion of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory infiltrate, suggesting that they are recruited to the site of infection, and therefore committed to the healing process of the CL lesion [6–12]. In contrast, other authors have associated CD8⁺ T lymphocytes with tissue injury in CL and ML [12–17]. Observing cell subpopulations in CL lesions, the cell infiltration and pathology suggest that tissue damage is a consequence of the immune response, mostly related to T-cell-mediated

cytotoxicity, rather than the parasite itself [18]. Moreover, other authors have shown that the production of granzyme A is associated with lesion progression, while granzyme B is necessary for cytolysis of *L. braziliensis*-infected monocytes, but also induces tissue damage in CL patients [16, 17].

Aside from CD8⁺ T lymphocytes, other cell populations, like NK and NKT cells, are known as cytotoxic cells and have a crucial influence on the development of the disease or cure. Furthermore, other two T-lymphocyte populations, CD4^{neg}CD8^{neg} double-negative (DN) and CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP), can also contribute to the cytotoxic activity. Hence, the controversy about the cytotoxicity in the immunopathogenesis of ATL needs further study.

Cytotoxic T lymphocytes and NK cells share the same route of cytotoxicity, by exocytosis of lytic granules. This activity is performed by perforin and granzyme, which are stored in lipid bilayer vesicles, containing lysosomal-associated membrane protein (LAMP), including CD107a (LAMP-1). This vesicle fuses with the plasma membrane at the time of exocytosis, thus mobilising CD107a to the cell surface, indicating a functional degranulation and this phenomenon has been exploited in cytotoxicity studies [19–21].

Since lesions of CL patients are the hallmarks of the clinical course of the disease, it is fundamental to explore how the cytotoxic activity might be involved in the lesion environment. Some authors have previously reported a heterogeneity in the distribution of T-cell subsets in the lesion milieu [8, 9, 21], while other reports concerning in situ immunopathological analysis, have helped understand the local immune response, although the histopathological patterns may differ within the same lesion, depending on the site of ulcer or the duration of the disease [22–24]. Thus, it is imperative to determine which cell subset effectively prevails in the lesion environment and their cytotoxic profiles.

The results shown here were based on the investigation of the frequency and distribution of T lymphocyte subpopulations, NK and NKT cells in lesions of patients with their first manifestation of CL. Moreover, cell subpopulation cytotoxic activity through CD107a staining and granzyme B quantification was determined using flow cytometry. We also investigated correlations between the immunological findings and clinical features, to determine protective or inflammatory profiles, established at lesion milieu.

Methods

Subjects

Eighteen patients were selected according to the inclusion criteria of a clinical and epidemiological history compatible with CL. All of the 18 patients enrolled in the study were diagnosed for leishmaniasis and were known to

have acquired the disease in *L. braziliensis*-endemic areas of 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 features of the 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 light microscopy observation; (iii) isolation of *Leishmania* parasites by culture fragment in Nicolle-Nevy-McNeal (NNN) medium; and histopathologic analysis of the inflammatory infiltrate. We maintained the fragments of lesion biopsy in PBS supplemented with antimicrobials (penicillin and streptomycin) for a maximum of 4 hours before processing. The species of isolated parasites were characterised by isoenzyme electrophoresis profiles [25]. All patients were submitted to meglumine antimoniate treatment according to the guidelines of the Brazilian Ministry of Health.

Collection and processing of tissue sample

Incisional skin biopsy was performed for diagnosis purposes and experimental procedures. Cells were obtained from lesions as described elsewhere [7]. Briefly, after local anaesthesia with lidocaine, the biopsy was performed using a 6 mm punch including 1/3 edge of the lesion. The obtained fragment was immediately stored in RPMI 1640 (Gibco, Carlsbad, CA, USA), supplemented with HEPES (10 mM), L-glutamine (1.5 mM), 2-mercapto-ethanol (1 mM), penicillin (200 UI), and streptomycin (200 µg/ml) enriched with 20% of fetal calf serum (all reagents from Sigma-Aldrich Co (St Louis, MO, USA) for up to 4 hours at 4 °C. We placed the skin specimen onto a cell dissociation sieve (Tissue Grinder kit, Sigma-Aldrich), stripped off the subcutaneous fat, and macerated it on a 64 µm-stainless steel mesh in Petri dish, containing supplemented RPMI 1640 medium. After that, we transferred the cell suspension with macerated tissue to a 15 ml Falcon tube and let it rest for five minutes to decant large epithelial cells, dermal cells and fat tissue. Afterwards, we collected the cell-containing supernatant, centrifuged to pellet cells and separate the supernatant for cytometric bead array

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

Number of volunteers	18
Sex: Male/Female	17/1
Age (years) ^a	39.5 ± 6.0
Number of lesions ^a	1.0 ± 0.4
Diameter of lesions (mm) ^a	41.3 ± 5.0
Montenegro Skin Test (MST) (mm) ^a	19 ± 2.8
Duration of disease (months) ^a	57.9 ± 15.0

^aMean ± Standard deviation

(CBA). To obtain a more pure-cell sample, we resuspended the cell pellet and filtered the cell suspension into Falcon® 12 × 75 mm tube with cell strainer cap with 35 µm nylon mesh (BD Biosciences, San Jose, USA). Additionally, we resuspended the cells in PBS supplemented with 0.1% sodium azide and 2% fetal calf serum (PBSaz, Sigma-Aldrich) and adjusted to 1 × 10⁶ cells per 50 µl, for 6-color flow cytometry staining, described below.

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 follow: anti-CD3; anti-CD56; anti-CD8 (Beckman Coulter, Kendon, FL, USA); anti-CD4 and anti-CD107a (BD, Bioscience, San Jose, CA, USA). The cells were also stained with 7-aminoactinomycin D (7-AAD; Beckman Coulter) for cell viability determination. After 20 min on ice and protected from light, we washed cells once and incubated with BD FACS lysing solution (BD Biosciences) to lyse erythrocytes.

In each sample, 500,000 events were acquired using MoFlo Astrios Cell Sorter Flow Cytometer (Beckman Coulter) in a low-flow rate (max 800 eps) to avoid clogging. Single stained controls were used to set compensation parameters, as well as fluorescence-minus-one (FMO) and isotype controls were used to set analysis gates.

After the acquisition, this staining panel and gate strategies allowed us to evaluate the distributions of DN; DP T lymphocytes; NK cells; NKT cells; and cytotoxic-related CD107a expression, through a 7-parameter flow cytometry protocol using Kaluza analysis 1.5A software (Beckman Coulter) (Fig. 1a-f). The limits for the regions in dot plots and histograms were set based on non-staining cells, isotype controls and FMO control for CD107a.

Cytometric Bead Array (CBA)

The cytokines measured were TNF, IL-8, IL-10 and IFN γ . The Cytometric Bead Array (CBA) Human Flex Set system (BD Biosciences) provides a method of capturing a soluble analyte or set of analytes with beads of a known size and fluorescence, enabling the detection of analytes using flow cytometry. The detection reagent supplied in the kit is a mixture of phycoerythrin (PE)-conjugated antibodies, which emits a fluorescent signal proportionally to the amount of bound analyte. When the capture beads and detectors reagents are incubated with an unknown sample containing identified analytes, sandwich complexes are formed. Granzyme B, IFN- γ and TNF- α levels were quantified in culture media from macerated lesions from ten patients. Thirty microliters of all samples were prepared following CBA multiplex

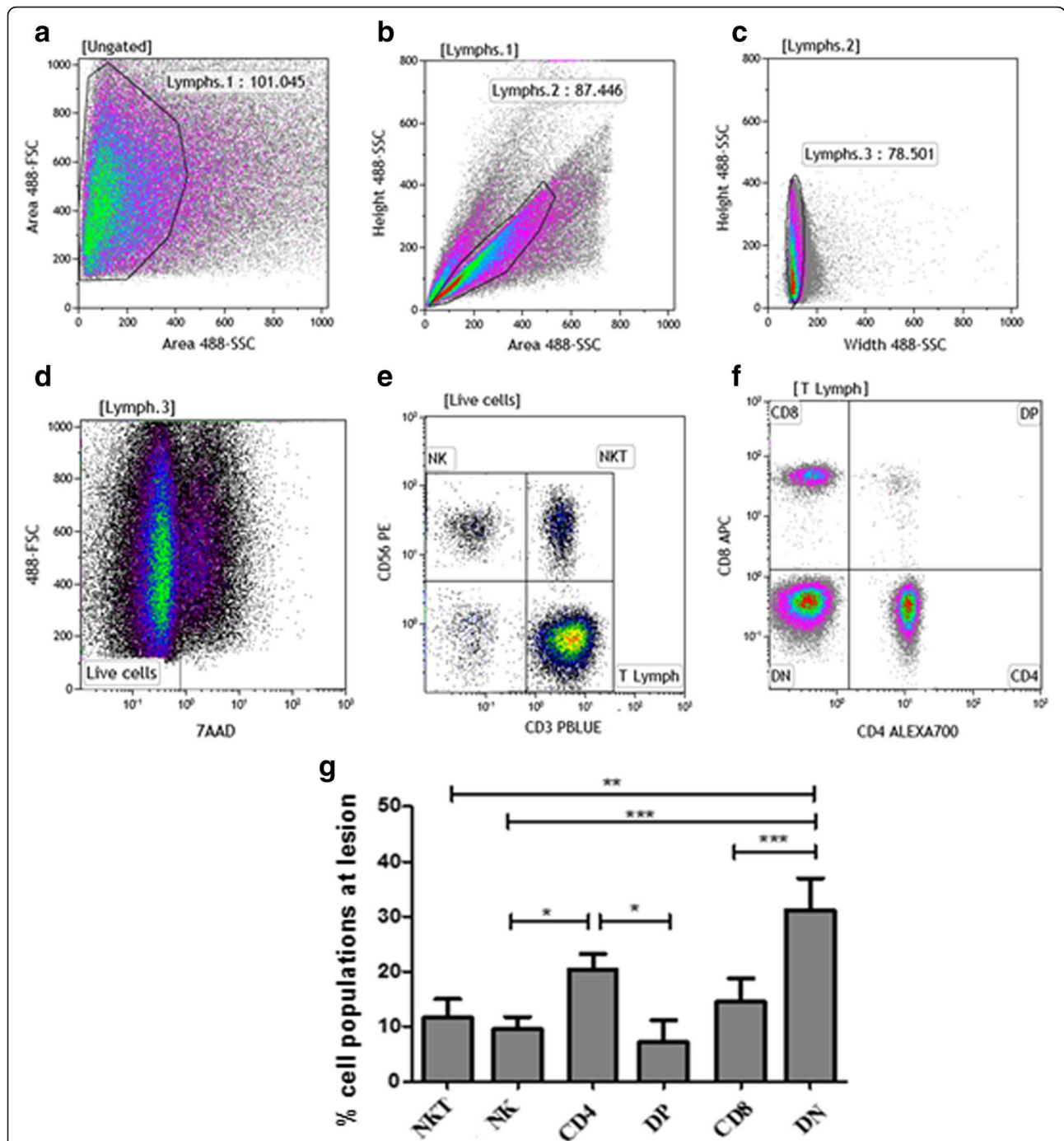


Fig. 1 Frequencies of NK and NKT cells; CD4⁺, CD8⁺, double positive (DP) and double negative (DN) CD3⁺ T-lymphocyte subpopulations. **a-f** Flow cytometry-representative protocol: Cells obtained from cutaneous leishmaniasis lesions were stained with anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD56, anti-CD107a and 7-AAD. Lymphocytes region was created on forward (FSC) vs side (SSC) scatter dot-plot (**a**). Cells gated on [Lymphs.1] were analyzed through *dot-plots* SSC-Height vs SSC-Area (**b**) and SSC-Height vs SSC-Width (**c**) to exclude doublets and debris. **d** Dead cells (7-AAD⁺) were excluded from the analysis and a gate encompassing 7-AAD^{neg} cells was performed. **e** Based on this gate, NK cells (CD56⁺CD3^{neg}), NKT (CD56⁺CD3⁺) and T lymphocytes (CD56^{neg}CD3⁺) were identified. **f** Based on T lymphocyte gate (T Lymph), CD4, CD8, double-negative (DN) and double-positive (DP) T lymphocytes were determined. **g** Bar graphs representing the mean ± SEM of percentages of NKT and NK cells; CD4⁺, DP, CD8⁺ and DN T lymphocytes obtained from cutaneous leishmaniasis lesions of 18 patients. Statistical analyses were performed using ANOVA test and Dunn's *post-hoc* test. Results were considered significant with $P < 0.05$ (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

kit manual, and the cytokines were detected within a range of 10–2,500 pg/ml. The assays were performed according to the manufacturer's instructions, and samples were acquired in an FACSCallibur flow cytometer (BD Biosciences). The data were analysed with FCAP Array Software version 1-01 (Soft Flow, Inc., St. Louis Park, MN, USA).

Statistical analysis

For statistical analyses between two groups at a time, we applied Mann-Whitney *U* test. For statistical analyses among 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 subsets in lesions of cutaneous leishmaniasis patients

We focused on determining the cytotoxic profile of cellular populations obtained directly from active cutaneous leishmaniasis lesions. A flow cytometry approach allowed us to evaluate the frequency of six populations: CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes; CD4^{neg}CD8^{neg} double-negative T lymphocytes (DN); CD4⁺CD8⁺ double-positive (DP) T lymphocytes; NK cells; and NKT cells (Fig. 1), as well as cells expressing cytotoxic-related CD107a biomarker. Our gating strategy was performed as follow: a Forward Scatter (FSC) vs Side Scatter (SSC) region was created using a density plot (Fig. 1a) to encompass the lymphocyte population. We also created height, area and width side-scatter dot plots, to remove doublets and debris from analysis (Fig. 1b, c). In addition, we included only live cells in analysis considering the gate comprising 7-AAD^{neg} (Fig. 1d) cells. Then, we defined the frequencies of T lymphocytes, NKT and NK cells based on CD56 vs CD3 dot plot (Fig. 1e). CD4⁺, CD8⁺, DN and DP cells were determined using a CD3⁺ T cell gate (Fig. 1f).

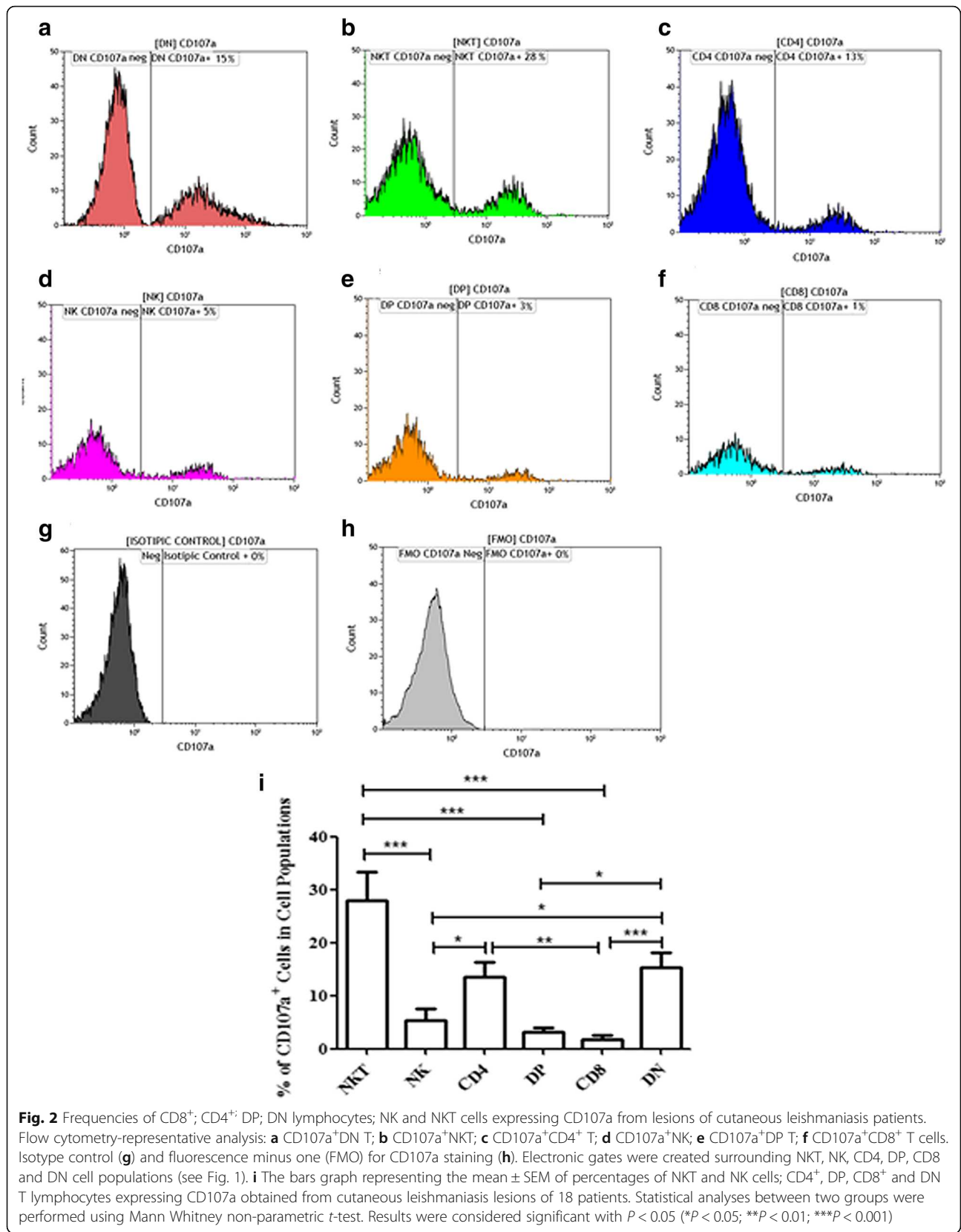
Regarding T lymphocyte populations, we observed that DN T lymphocytes showed the highest frequency (31.4 ± 4.6%), followed by CD4⁺ (21.4 ± 2.8%), CD8⁺ T lymphocytes (14 ± 3.3%) and DP T cells (7.0 ± 2.5%). NKT cells represented 11.5 ± 3.4% of total cell population and NK cells 9.4 ± 2.3%. The frequency of DN T cells was significantly higher than NK ($U = 25.00, P < 0.0001$), NKT ($U = 42.00, P = 0.0003$) and DP T cells ($U = 50.00, P = 0.0007$), while the frequency of CD4⁺ T lymphocytes was higher than NK ($U = 45.00, P = 0.0004$) and DP T cells ($U = 66.00, P = 0.0043$) (Fig. 1g).

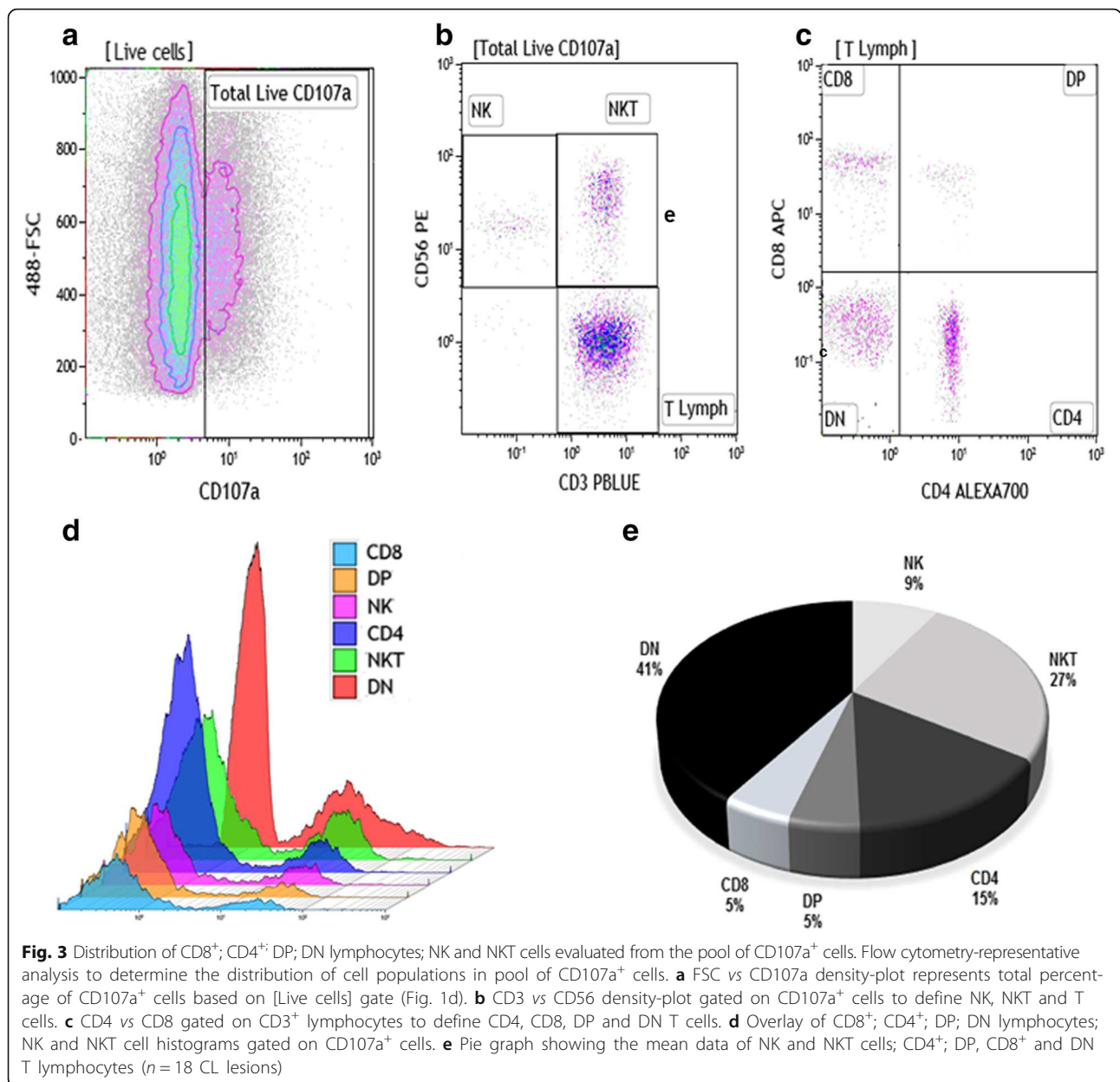
Frequencies of cell subsets expressing CD107a from lesions of cutaneous leishmaniasis patients

To assess the profile of CD107a⁺-degranulating-cell populations from the lesion site, we first evaluated their frequency within each cell-population studied. For this, we performed flow cytometric protocol to determine the frequencies of CD107a⁺ cells from gated total DN; NKT; CD4⁺; NK; DP; CD8⁺ cells (Fig. 2a-f, respectively). Figure 2i shows that CD107a⁺NKT cells (mean ± standard error: 27.9 ± 5.3%) displayed the highest frequency of positive cytotoxic cells within the pool of their population. In turn, CD107a⁺DN T (15.4 ± 2.8%) and CD107a⁺CD4⁺ T lymphocytes (13.5 ± 2.8%) showed similar frequencies to each other, but lower than that seen by CD107a⁺NKT cells ($U = 114.0, P = 0.1329$; $U = 100.0, P = 0.05$, respectively). CD107a⁺NK (5.2 ± 2.2%) showed lower frequencies in relation to NKT, CD4 and DN T cells ($U = 40.0, P = 0.0001$; $U = 751.00, P = 0.0060$; $U = 61.00, P = 0.0014$, respectively), as well as CD107a⁺DP T cells (3.04 ± 0.8%) ($U = 17.50 P < 0.0001$; $U = 49.00, P = 0.0006$; $U = 42.5, P = 0.0003$, respectively). Interestingly, CD107a⁺CD8⁺ T lymphocytes were found at the lowest frequency (1.8 ± 0.7%) and showed lower statistic difference when compared to NKT, DN and CD4⁺ T lymphocytes ($U = 16.00, P < 0.0001$; $U = 27.00, P < 0.0001$; $U = 38.00, P < 0.0001$, respectively) (Fig. 2i). It is important to note that based on this analysis we are not evaluating the total number of cytotoxic cells in lesion environment, but the percentages of CD107a⁺-degranulating cells considering the pool of each cell population as 100%.

Contribution of cell subsets from the overall pool of CD107a⁺ cells

To determine the contribution of specific cell populations to the overall pool of CD107a⁺-degranulating cells in lesion environment, we also performed another flow cytometry approach, gating all CD107a⁺ cells (Fig. 3a), and then determine the percentages of each cell population studied from 100%-gated CD107a⁺ cells (Fig. 3b c). Thus, we observed that DN T cells were the major contributing cell population to the CD107a⁺-cell pool (40 ± 4%). NKT cells represented the second most prevalent population (25.0 ± 4.1%), followed by CD4⁺ T lymphocytes (14 ± 3.1%) and NK cells (8 ± 4%). DP and CD8⁺ T lymphocytes showed the lowest percentages inside the CD107a⁺-cell pool (4.0 ± 1.6 and 4.0 ± 2.3%, respectively) (Fig. 3d). In this context, comparing the distributions among the six different cell populations, based on the pool of CD107a⁺-degranulating cells, we observed that DN T cells were the major contributors to cytotoxic/degranulating cells at the lesion site, while the DP and CD8⁺ T lymphocytes were the lowest contributors.





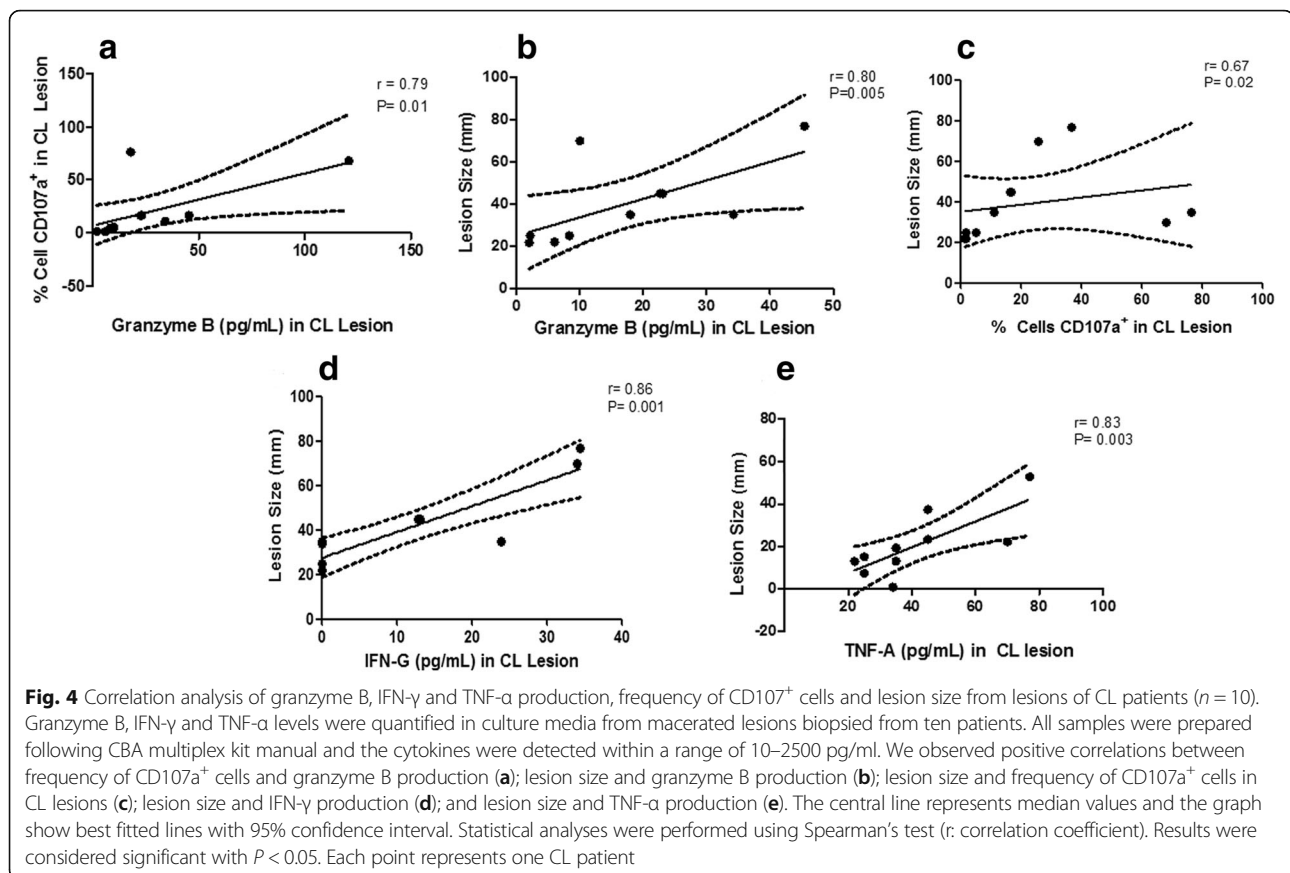
Correlation analysis of frequencies of CD107a⁺ cells with production of granzyme B, IFN-γ, TNF and clinical features

To ascertain if there was a relationship between cytotoxicity/degranulation and clinical features, correlation analyses were carried out with the total frequency of cells expressing CD107a, granzyme B production and lesion size. Furthermore, we evaluated a possible interconnection between pro-inflammatory cytokines (IFN-γ and TNF-α - evaluated in culture media after the macerated-lesion process) with 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) (Fig. 4a). We also demonstrated that lesion size was positively correlated with; granzyme B

production (*r* = 0.80; *P* = 0.005) (Fig. 4b); the frequency of CD107a⁺ cells (*r* = 0.67; *P* = 0.02) (Fig. 4c); IFN-γ levels (*r* = 0.86; *P* = 0.001) and TNF-α levels (*r* = 0.83; *P* = 0.003) (Fig. 4d, e, respectively). The other T cell subpopulations did not show any correlation with lesion size.

Discussion

Lymphocytes are predominant mononuclear cell populations in leishmaniasis lesions and have been a focus of studies regarding the immunopathogenesis of CL. The literature-described role of CD8⁺ T lymphocytes in protective and pathological responses is still controversial. Previous observations from our group have shown an increase in the number of CD8⁺ T lymphocytes in the



inflammatory infiltrate, suggesting cell recruitment to the CL lesion environment and a commitment to this cell population to lesion resolution [6–12]. In contrast, other authors have associated CD8⁺ T lymphocytes with tissue damage in CL and ML [12–17]. In murine models, CD8⁺ T cells are important for pathogen control but also are implicated in dermal pathology [25]. Apart from CD8⁺ T lymphocytes, other cell populations, such as NK and NKT cells, DN, DP and CD4⁺ T lymphocytes exhibit cytotoxic functions and could influence disease progression or healing.

Previous in situ immunopathological studies using confocal or fluorescent microscopy techniques in leishmaniasis have improved our expertise with the description of the cellular composition of the skin inflammatory infiltrate [18, 23, 24, 26, 27]. Flow cytometry (FCM) has been extensively applied as a key method to address these issues, and the majority of the reports are based on peripheral-blood-sample analysis [6, 11, 28–30]. However, it is known that lymphocytes are recruited from blood to lymph nodes, primed with antigens and then migrate to lesion sites; consequently, frequencies of antigen-specific T cells are higher in leishmaniasis lesions than in blood [7, 17, 31, 32]. For that reason, we assessed, using FCM, the cellular immune response in the CL-lesion environment, focusing on six

distinct cytotoxic cell populations. Since tissue samples from CL lesions have a limited cellularity of lymphocytes compared to blood samples, interfering in the multigate-strategy FCM analysis, we standardised an enhanced protocol to obtain high-concentration-lymphocyte samples. Regarding another critical issue found in the literature, in which FCM protocols determine CD8⁺ T lymphocytes based only on CD8 expression, without NK and NKT exclusion, we added CD3 and CD56 to the analysis, allowing for exclusion of NK and NKT cells when analysing CD8⁺ or CD4⁺ T cells. Our data showed that the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are similar in the lesion-inflammatory infiltrate, though this similarity depends on the clinical profiles of the patients. Even with this resemblance, we observed that CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes displayed different frequencies of CD107a⁺ cells, indicative of cytotoxic activity.

To investigate the participation of cytotoxic cell populations at the lesion site, we used two different FCM analysis approaches within the same sample. In one, we analysed the frequencies of each cell population expressing CD107a (degranulating cells indicative of cytotoxic activity). In the other, we evaluated the distribution of each cell population based on all (100%) CD107a⁺ cells. Interpreting data

obtained from these two analyses led us to suggest that the NKT-cell pool had the largest portion of their cells dedicated to cytotoxicity, while DN T lymphocytes represent the most prevalent cell population looking to all CD107a⁺, degranulating cells. DP T cells with regulatory functions were observed in normal tissue and multiple sclerosis skin lesion [33, 34]. However, the recruitment of these cells to the skin is not fully elucidated, and in the periphery, these cells seem to exist as a mature population. It has been suggested that these cells originate from a CD8⁺ T cell precursor and then further express CD4 [35, 36]. Herein we noticed that this cell population is sparse in the CL lesion and their presence suggests their participation in the local immune response, and thus their recruitment to an inflammatory microenvironment. Furthermore, we showed that these cells are present in CL lesion with few participating as cytotoxic cells.

We also observed an overall low frequency of NK cells as compared to frequencies of CD4⁺ and DN T lymphocytes. This feature was already demonstrated in ML lesions where higher frequencies of NK cells in relapse cases in comparison to cured ones, suggested that high frequencies of NK cells could be a suitable protection/preventive prognostic marker [37]. Some studies have investigated the behaviour of NK and CD8⁺ T lymphocytes in CL, assuming that these cells are the main cytotoxic populations. The role of NK cells in CL has been associated with both pathology and protection. Some authors propose a protective function through lysis of extracellular promastigotes and infected macrophages [37, 38]. Nevertheless, there is evidence that cytotoxic NK cells contribute to exacerbation of tissue damage [39]. According to our investigations, only 5% of NK cells express CD107a, demonstrating a weak commitment of NK cell population to cytotoxicity and we observed a low frequency of cytotoxic NK cell in lesions (8% of all CD107a⁺-cytotoxic cells). These findings suggested that these cells have little influence on the cytotoxicity that occurs in the lesion environment, based on the distribution of total cytotoxic cells.

Regarding NKT cells, some reports showed that at least in CL murine models, these cells seem to block parasite expansion and also drive the immune response based on the cytokines produced [40, 41]. In humans, NKT cells play a role in several situations, for instance: showing either protective or pathogenic role against malaria; preventing autoimmunity; protecting against neoplasia, and having a direct pathogenic role against many opportunistic infections common in end-stage AIDS [42, 43]. In visceral leishmaniasis, NKT cells seem to have a dual behaviour, depending on their subset: CD4⁺NKT cells show a pathogenic activity and tend to accumulate at the infection site, while CD8⁺NKT cells may be protective when in contact with the

target cells [44]. Our group has recently portrayed strong evidence about the involvement of CD8⁺ T and CD4⁺ T lymphocytes, NK and NKT cells (and their subsets) in the cytotoxic response analysing peripheral blood from CL patients before, during and after antimonial therapy. We reported an involvement of different NKT subsets in CL immunopathogenesis, showing CD8⁺NKT cells as the main subset involved in cytotoxicity and suggesting a protective role of DP NKT subset in CL [45]. There is no published report concerning the distribution of NKT cells in CL lesions. Results observed in our current study revealed that NKT cells were distributed as the fourth cell population found in CL lesions and they are the most committed to cytotoxicity, representing the second most cytotoxic-cell population in the CL lesion environment, pointing to them as an important component of the localised immune response.

Another important cell population observed in CL lesions is the CD4^{neg}CD8^{neg} (double-negative - DN) T lymphocytes. DN T cells represent a minority subpopulation of mature post-thymic T lymphocytes that express CD3/TCR α/β or γ/δ receptor but lack CD4/CD8. These cells could play an inflammatory and regulatory role in immune response [46]. Other authors found that DN α/β T lymphocytes could be simultaneously both helper and cytotoxic activities [46–48]. Despite DN T cells representing a minority subpopulation in peripheral blood, this T cells subpopulation was also identified in the skin. Groh and cols. showed that CD3/TCR α/β complexes were functionally competent as evidenced by their capacity to transduce activation signals resulting in cell proliferation, cytokine secretion, and cytotoxic activity [49]. Here, we observed that, in addition to representing the greatest frequency of cells in the lesion (data not shown), DN T cells showed an important expression of the cytotoxic-related-CD107a⁺ phenotype.

In an experimental model, DN T cells seem to be key players in protective primary and secondary anti-*L. major* immunity [50]. In humans, some authors described the immunoregulatory potential of DN T cells in CL and reinforced their role in both protection and pathology. These cells exhibit a highly activated profile in active CL, being the second most prevalent producers of inflammatory cytokines, such as IFN- γ and TNF- α [46]. Furthermore, DN T cells could be subdivided into T cells expressing α/β TCR, which may be involved in an inflammatory response and T cells expressing $\gamma\delta$ TCR, which produces a biased regulatory environment [4, 46, 51]. We should consider that α/β DN T cells are associated with negative regulatory nature as well as with several autoimmune disorders. These DN subpopulations are restricted to CD1 presenting antigens, despite some cells express a restricted TCR and often recognise lipid antigens [46]. Given DN T cells are the

predominant cytotoxic cells observed in CL lesions, we may hypothesise that, if the cytotoxicity mediated mechanisms lead to tissue injury, this might be due to a nonspecific lysis orchestrated by DN T cells.

Even with the high amount of DN cytotoxic cells in the lesion site, a great number of them are non-cytotoxic DN cells. For this reason, it is possible that DN T cells play a dual role, one as cytokine producers - inflammatory or regulatory - and another as a cytotoxic population. Our analyses showed that cytotoxic DN cells account for over 40% of all cytotoxic cells, ten times greater than CD8⁺ T lymphocytes. Thus, we show, for the first time, that DN T lymphocytes are present in CL lesion as the most frequent lymphocyte population and the largest subset of cytotoxic cells, emphasising a participation in the CL lesion milieu, likely related to a cytotoxic activity.

Interestingly, CD8⁺ T lymphocytes exhibited the lowest frequency of cytotoxic cells in CL lesions and did not seem to have a major participation in local cytotoxicity. Faria et al. [27] suggested that the frequency of CD8⁺ T lymphocytes expressing granzyme B was directly associated with the intensity of the inflammatory reaction of ulcerated lesions of CL. Other authors [13] described a lymphocyte recruitment and persistence of memory CD8⁺ T cells to the injury caused by *L. braziliensis*. It is important to remark that using flow cytometry; some authors did not evaluate CD8⁺ T lymphocytes gated on CD3⁺ and CD56^{neg} populations, which could allow the inclusion of other lymphocyte populations in the analysis, such as NK, NKT and gamma/delta + CD8⁺ T cells. Besides, NK cell expression of CD8 is significantly lower than CD8 expression by T cells and should be concerned by authors to gate on CD8 T cells (high-CD8 gating strategy). These procedures could avoid a misinterpretation of the flow cytometric data regarding the frequency of CD8⁺ T lymphocyte in CL lesions.

The role of CD4⁺ T lymphocytes in CL is well established as driving the immune response based on antigen presentation and cytokine profiles; nevertheless, few authors have concentrated efforts on studying cytotoxic functions of this lymphocyte subset. Recently, our group observed in peripheral blood, that the cytotoxic CD107a⁺CD4⁺ T cell might be involved in the healing process of CL patients [45]. Corroborating these findings, we observed in the current study a significantly high frequency of CD107a⁺CD4⁺ T-cell lymphocytes in the CL lesion milieu, surprisingly higher than classical-cytotoxic NK and CD8⁺ T cells. Others suggested CD4⁺ T cell-mediated cytotoxicity as a mechanism that assists viral control [52] and induction by *Trypanosoma cruzi* infection [53]. Thus, we may hypothesise that cytotoxic CD4⁺ T cells could take part in the immune response and contribute to parasite control in CL lesion through cytotoxic-related mechanisms.

It is important to note that a positive correlation among frequencies of CD107a⁺ cells, granzyme B production and lesion size provides evidence that cytotoxicity could be associated with tissue damage. In addition to cytotoxicity, tissue damage seems to be related to other pro-inflammatory factors, given larger lesion sizes are strictly associated with higher IFN- γ and TNF- α . Similar observations were seen by others, in which larger lesions were also correlated with a higher frequency of *Leishmania*-antigen-specific-inflammatory-cytokine (IFN- γ or TNF- α)-producing lymphocytes [54]

In summary, although several reports emphasise the key role of cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes in CL tissue damage, we are unable to reinforce this hypothesis. This is reflected by the finding that CD8⁺ T cells represent the population with the least commitment to cytotoxicity (the lowest percentages of cytotoxic-related CD107a⁺ cells) in the lesions. Furthermore, CD107a⁺ cell pool. Nevertheless, based on our results, we are not able to affirm that CD8⁺ T lymphocytes do not have an immunomodulatory role, but we propose that cytotoxicity-mediated tissue damage observed in CL lesions seems to be more influenced by CD4⁺ T lymphocytes, NKT cells and mostly DN T lymphocytes.

Conclusions

We focused our investigation on cytotoxicity-mediated mechanisms, which would occur in cutaneous lesions of CL patients and we showed, for the first time, the distribution and commitment of six distinct cytotoxic populations at the lesion site. From our findings, we suggest that cytotoxicity could have an important participation in the tissue damage observed in the lesion. However, we did not find evidence that CD8⁺ T cells are the main population responsible for this damage. Moreover, we may postulate that the major sources of cytotoxic activity are DN T lymphocytes, NKT cells and CD4⁺ T lymphocytes, which comprise 80% of all cytotoxic cells, although cytotoxic NK, DP and CD8⁺ T cell are detected in these lesions. These findings encourage us to look at cytotoxicity as a phenomenon that should be better explored, not only by classical-cytotoxic NK and CD8⁺ T cells but also by cytotoxic DN and NKT cells. Due to controversial statements regarding the actual role of these cell populations in the cytotoxicity and the complexity of the interaction between the human host and *Leishmania*, the study of the immunopathological mechanisms in humans naturally infected by *Leishmania* is of utmost importance, if we hope to develop effective vaccines and alternative immunotherapeutic treatments in the near future.

Abbreviations

ATL: American tegumentary leishmaniasis; CBA: Cytometric bead array; CL: Cutaneous leishmaniasis; DN: Double negative; DP: Double positive; FCM: Flow cytometry; LAMP: Lysosomal-associated membrane protein

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) and Dr. Kenneth Gollob for valuable contribution in reviewing this manuscript. 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.

Funding

Not applicable.

Availability of data and materials

Since our research is under Brazilian government policy we did not share data.

Authors' contributions

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

Competing interests

The authors declare that they have no competing interest.

Consent for publication

Not applicable.

Ethics approval and consent to participate

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

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Author details

¹Laboratory of Immunoparasitology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ²Flow Cytometry Sorting Core Facility, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ³Laboratory of Surveillance for Leishmaniasis, Evandro Chagas National Institute of Infectology, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁴Laboratory of AIDS and Molecular Immunology, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil. ⁵Laboratory of Interdisciplinary Medical Research, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

Received: 24 December 2016 Accepted: 21 April 2017

Published online: 03 May 2017

References

- WHO | Leishmaniasis. WHO. [cited 2015 Mar 25]. Available from: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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 Diag Lab Immunol*. 2002;9:251–6.
- 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.
- 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*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102:625–30.
- 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.
- 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.
- 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.
- Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 1995;17:21–8.
- Santos Cda 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;33:1533–40.
- Bousoffara 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.
- 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.
- 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.
- Betts MR, Koup RA. Detection of T-cell degranulation: CD107a and b. *Methods Cell Biol*. 2004;75:497–512.
- Aktas E, Kucuksezer UC, Bilgic S, Erten G, Deniz G. Relationship between CD107a expression and cytotoxic activity. *Cell Immunol*. 2009;254:149–54.
- Zaritskaya L, Shurin MR, Sayers TJ, Malyguine AM. New flow cytometric assays for monitoring cell-mediated cytotoxicity. *Expert Rev Vaccines*. 2010;9:601–16.
- Palma GI, Saravia NG. In situ characterization of the human host response to *Leishmania panamensis*. *Am J Dermatopathol*. 1997;19:585–90.
- Palmeiro MR, Morgado FN, Valette-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.
- 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.
- Cupolillo E, Grimaldi Jr G, Momen H. A general classification of New World *Leishmania* using numerical zymotaxonomy. *Am J Trop Med Hyg*. 1994;50:296–311.
- Novais FO, Scott P. CD8(+) T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol*. 2015;37:251–9.

27. 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.
28. 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.
29. Clarêncio J, de Oliveira CI, Bomfim G, Pompeu MM, Teixeira MJ, Barbosa TC, et al. Characterization of the T-cell receptor Vbeta repertoire in the human immune response against *Leishmania* parasites. *Infect Immun*. 2006;74:4757–65.
30. Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MI, Lyra MR, Schubach AO, de Mendonça SCF, et al. T-cell receptor Vβ repertoire of CD8+ T-lymphocyte subpopulations in cutaneous leishmaniasis patients from the state of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2015;110:596–605.
31. Morgado FN, Nascimento MTC, Saraiva EM, de Oliveira-Ribeiro C, Madeira Mde 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*. 2015;10:e0133063.
32. 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.
33. Eljaafari A, Yurker 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.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Aranha FCS, Ribeiro Jr U, 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.
38. 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. *Parasitol*. 2011;138:1898–909.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. Wu L, Van Kaer L. Natural killer T cells and autoimmune disease. *Curr Mol Med*. 2009;9:4–14.
44. 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.
45. Cunha CF, Ferraz R, Pimentel MIF, Lyra MR, Schubach AO, Da-Cruz AM, Bertho AL. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. *Par Immunol*. 2016;38:244–54.
46. Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, Keesen TSL, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol*. 2008;8:1338–43.
48. Chapman JC, Chapman FM, Michael SD. The production of alpha/beta and gamma/delta double negative (DN) T-cells and their role in the maintenance of pregnancy. *Reprod Biol Endocrinol*. 2015;13:73.
47. Matsumoto M, Yasukawa M, Inatsuki A, Kobayashi Y. Human double-negative (CD4-CD8-) T cells bearing alpha beta T cell receptor possess both helper and cytotoxic activities. *Clin Exp Immunol*. 1991;85(3):525–30.
49. Groh V, Fabbi M, Hochstenbach F, Maziarz RT, Strominger JL. Double-negative (CD4-CD8-) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989;86(13):5059–63.
50. 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*. 2014;10:e1004396.
51. Antonelli LRV, Dutra WO, Oliveira RR, Torres KCL, Guimarães LH, Bacellar O, et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) αβ and γδ T cells for human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun*. 2006;74:6317–23.
52. Marshall NB, Swain SL. Cytotoxic CD4 T cells in antiviral immunity. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:954602.
53. 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.
54. Antonelli LRV, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett*. 2005;101:226–30.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



9.5. ANEXO 5

Artigo publicado: Apoptosis and frequency of total and effector CD8⁺ T lymphocytes from cutaneous leishmaniasis patients during antimonial therapy. (2015)

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

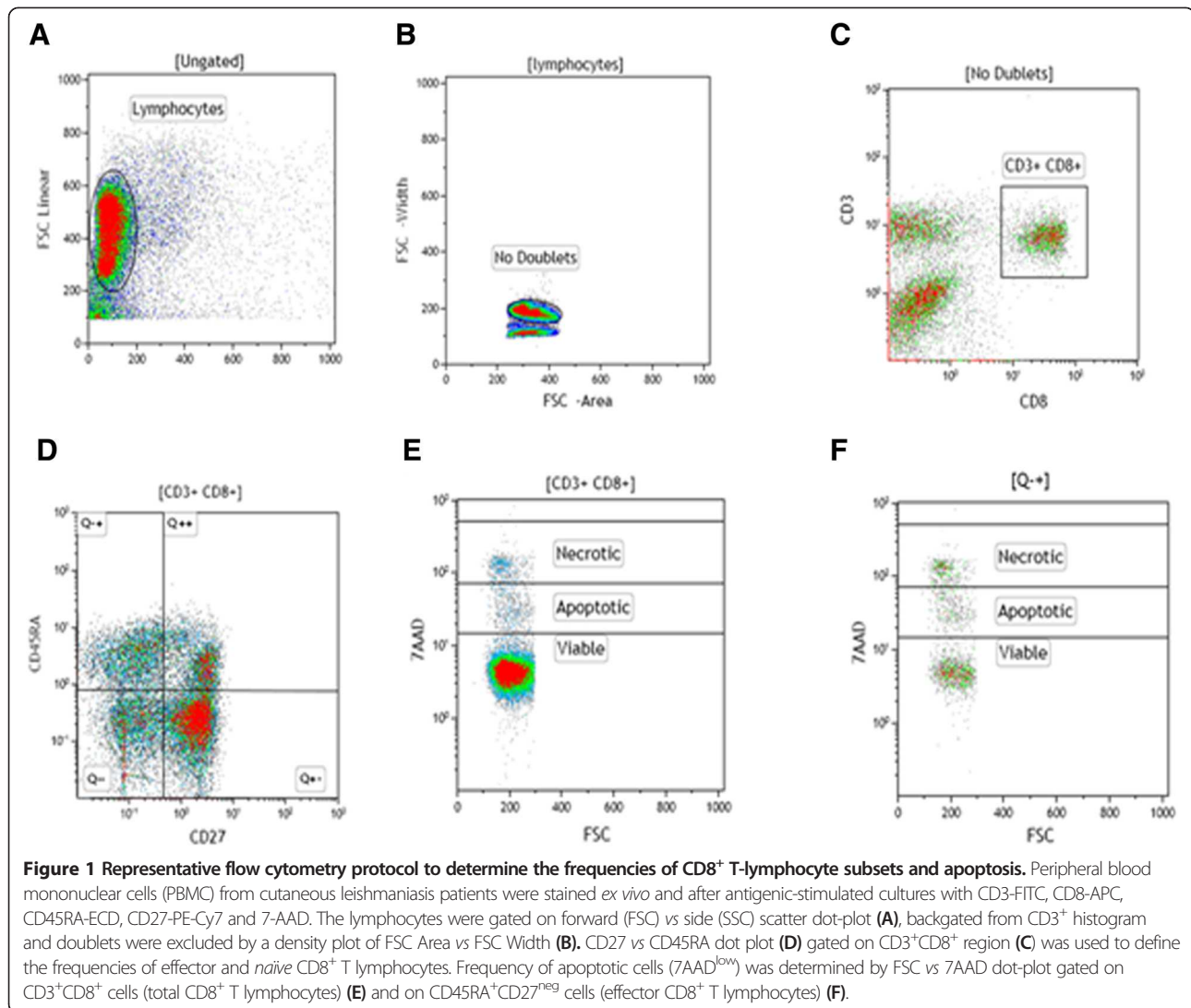
in elsewhere. The samples were kept on 7-AAD solution, protected from light, until the flow cytometry acquisition.

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

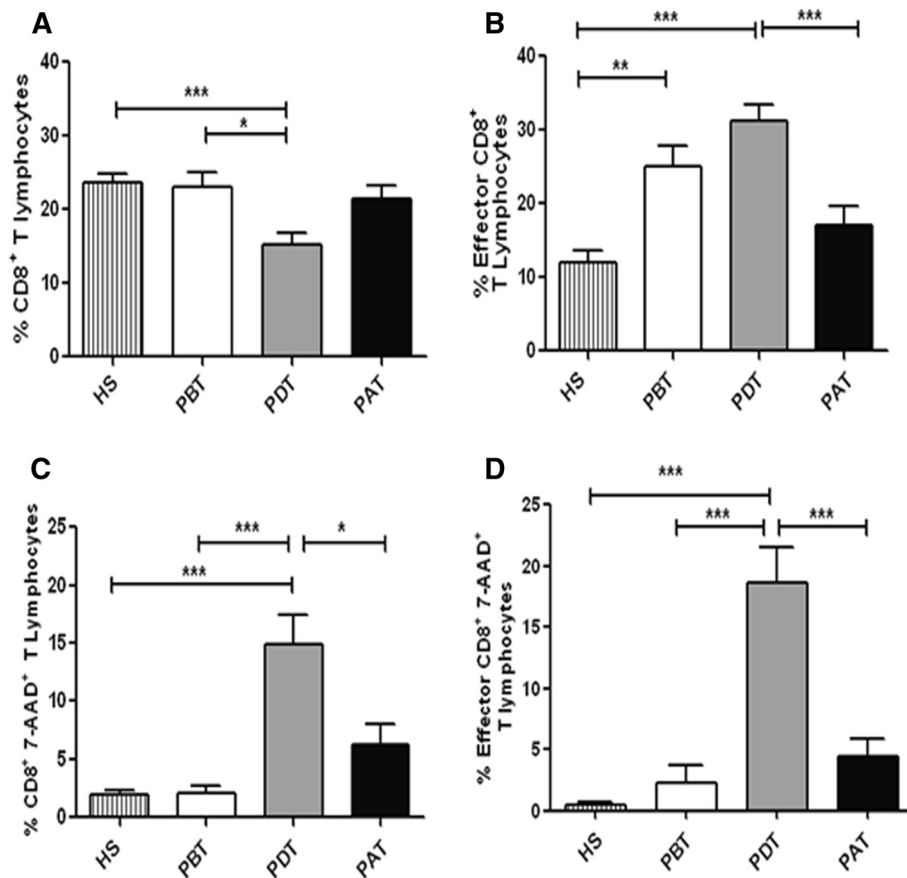


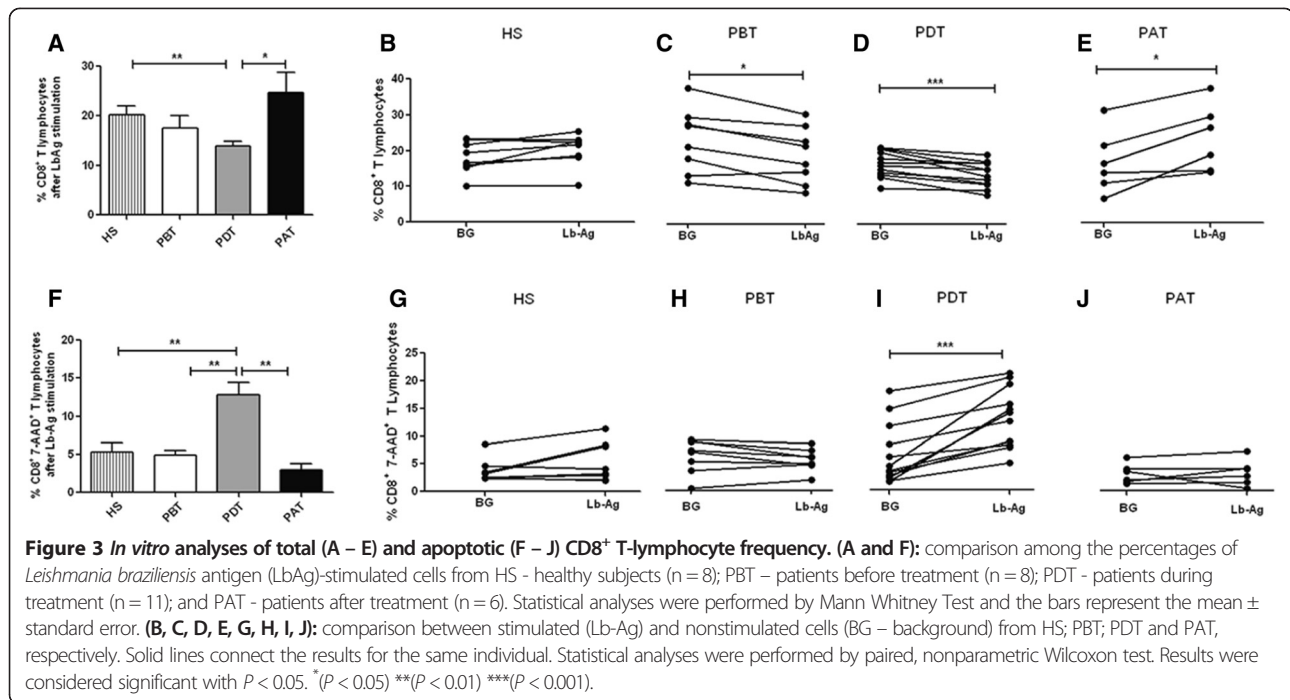
Figure 2 *Ex vivo* analysis of total CD8⁺ T-lymphocyte frequency and apoptosis in human cutaneous leishmaniasis. (A) Total CD8⁺ T lymphocytes; (B) Effector CD8⁺ T lymphocytes; (C) Apoptotic-total CD8⁺ T lymphocytes; (D) Apoptotic-effector CD8⁺ T lymphocytes. HS - healthy subjects (n = 18); PBT – patients 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).

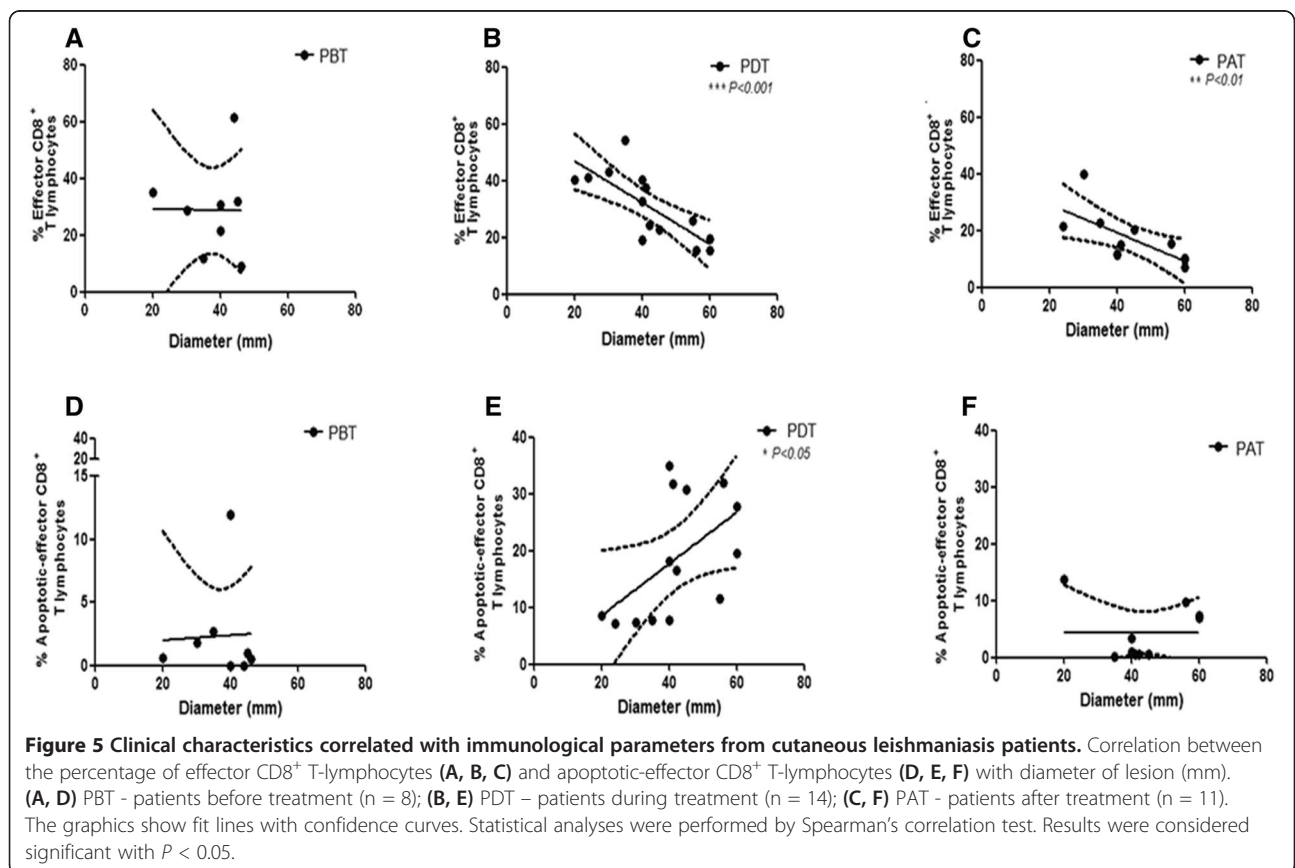
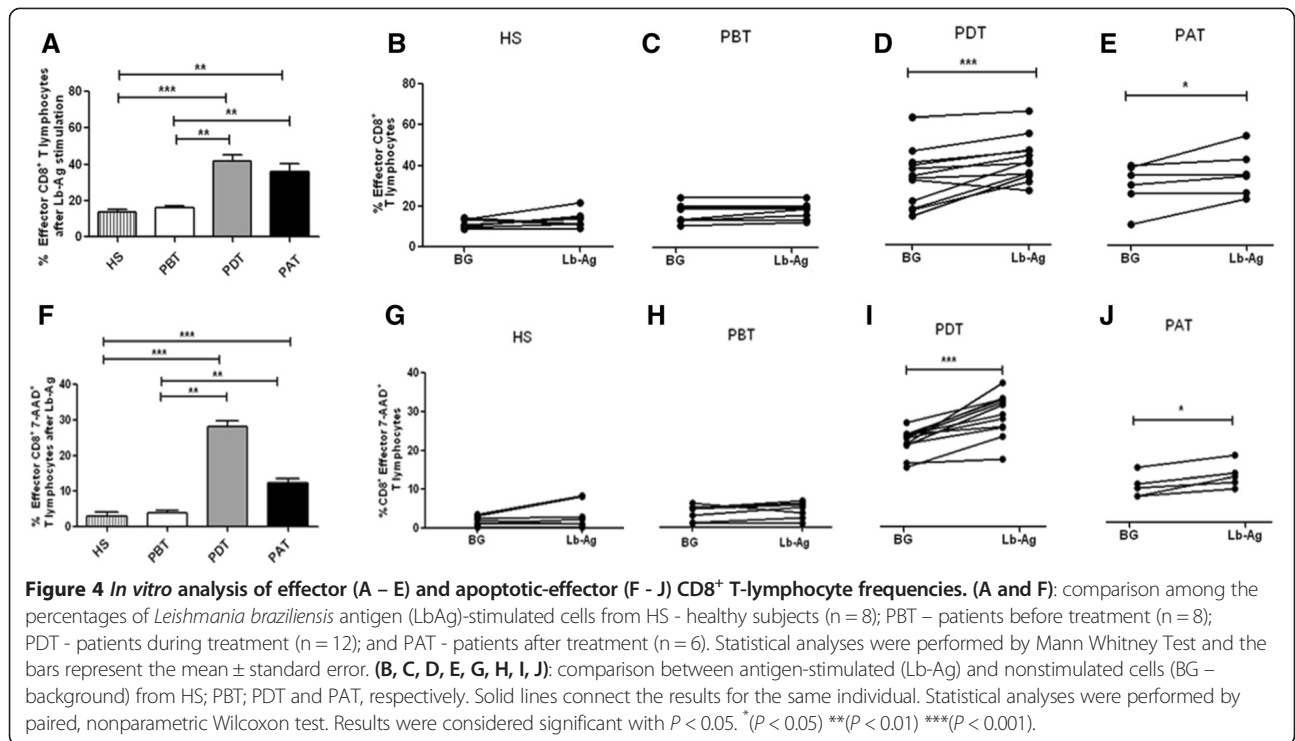
Regarding frequency of LbAg-reactive-effector CD8⁺ T cells during *in vitro* assays, it was observed higher frequencies of these cells in experiments with cells from PDT (41.8 ± 3.1) and from PAT (35.8 ± 4.6) when compared to experiments with cells from PBT (15.9 ± 1.3; $P < 0.01$) and also to HS (13.4 ± 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' informations

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, Pírmex 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, Kerkhof-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, Nadji 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



