



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE - ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



THIAGO MARCONI DE S. CARDOSO

**O PAPEL DOS LINFÓCITOS T CD8⁺ NA INFECÇÃO
SUBCLÍNICA CAUSADA POR
*Leishmania braziliensis***

Salvador, BA

2013

THIAGO MARCONI DE S. CARDOSO

**O PAPEL DOS LINFÓCITOS T CD8⁺ NA INFECÇÃO
SUBCLÍNICA CAUSADA POR
*Leishmania braziliensis***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia, da Universidade Federal da Bahia como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Dra Maria Olívia Bacellar.

Salvador, BA

2013

A meus pais, Janete de Souza Cardoso e Eduardo Lemos Cardoso, pela dedicação e amor incondicional e pelo apoio aos meus projetos. Aos meus irmãos Lais de Souza Cardoso e Nilo Lemos Cardoso Neto e minha cunhada Hermania Cardoso e cunhado Pedro Junior pela amizade e carinho dedicados. Ao meu filho Davi Cardoso que veio para me fazer um ser humano melhor e a Eduarda Cardoso, minha sobrinha a qual esperamos tanto para nascer. Dedico esta tese também aos meus entes queridos que estão vivos em nossa memória: a minha prima Elma Cristiane, meu tio Jorge Rodrigues, meus avôs Juvêncio Alves de Souza e Nilo Lemos Cardoso aos quais tenho muito apreço e saudades!

A Cristianne Rocha eu dedico não só esta conquista como também meus sentimentos mais puros, nobres e verdadeiros.

Amo Vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e os indivíduos subclínicos que se dispuseram a contribuir com este trabalho. A todos, meu mais sincero agradecimento;

Ao Serviço de Imunologia da UFBA, pela assistência técnica, material e humana para realização deste trabalho;

Ao professor Dr. Edgar Marcelino de Carvalho, Chefe do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgard Santos da UFBA e aos professores que trabalham no Serviço de Imunologia pela dedicação e paciência no ensino da Imunologia: Dr. Albert Schriefer, Dra. Silvane Santos, Dra. Maria Ilma de Araújo, Dr. Paulo Machado, Dr. Lucas Carvalho, Dra. Sara Passos, Dr. Ricardo Riccio e Dra. Luciana Cardoso; Aos meus amigos do Serviço de Imunologia pela boa convivência, valiosa ajuda e incentivo para a realização deste trabalho.

Ao Professor Roberto Meyer, Professora Songeli Meneses Freire, Professora Silvia Lima Costa e aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Imunologia da UFBA.

A Dilcea Reis Santana Santos de Oliveira e Sônia Costa de Sant'Ánn, funcionárias do PPGIm, pela ajuda e especial atenção durante todo o curso;

Especialmente a Doutora Maria Olívia Bacellar pela dedicação, paciência e amizade que desenvolveu ao longo das orientações de mestrado e doutorado, o meu apreço e admiração.

Ao CNPq, pelo fomento ao estudo.

“A humildade é a base e o fundamento de todas as virtudes e sem ela não há nenhuma que o seja”

Miguel de Cervantes

RESUMO

Introdução: A leishmaniose cutânea (LC) causada por *Leishmania braziliensis* é caracterizada por uma forte resposta tipo Th1, que está envolvida no desenvolvimento das lesões. Em áreas endêmicas de transmissão de *L.braziliensis*, indivíduos que apresentam reação de hipersensibilidade tardia positiva para antígeno de leishmania (SLA) e sem história atual ou passada de doença são considerados como tendo uma infecção subclínica (SC). Esses indivíduos produzem menos IFN- γ e TNF- α em comparação com pacientes com LC e os mecanismos pelos quais os indivíduos SC controlam a infecção ainda não são compreendidos. **Objetivo:** O objetivo deste estudo é caracterizar o papel de células T CD8⁺ na infecção SC e em pacientes com LC. **Materiais e Métodos:** Os monócitos isolados a partir de células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de indivíduos LC e SC foram infectados com *L.braziliensis* e co-cultivadas com células T CD8⁺. A avaliação da infecção de monócitos, marcadores citotóxicos e a apoptose de células alvo foi realizada por citometria de fluxo (FACS). A frequência de células T e a produção intracelular de IFN- γ após estimulação com SLA foi avaliada por FACS. A avaliação da granzima B (GrB) nos sobrenadantes de co-cultura foi realizada por ELISA. **Resultados:** Apesar de não haver diferença na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ entre indivíduos SC e pacientes com LC, após estímulo com SLA observou-se que células T CD8⁺ são a principal fonte de IFN- γ em indivíduos SC. Os monócitos de indivíduos SC foram menos susceptíveis à infecção do que os monócitos de LC. As células T CD8⁺ de pacientes com LC apresentaram um maior efeito citotóxico sobre monócitos infectados em comparação com células T CD8⁺ de indivíduos SC. Além disso, a produção de GrB por células T CD8⁺ foi superior em LC do que em indivíduos SC. **Conclusão:** Esses resultados sugerem que enquanto em indivíduos SC as células T CD8⁺ apresentam funções inflamatórias associadas a bom prognóstico, nos pacientes com LC estas células parecem estar mais envolvidas na patologia.

Palavras-chave: Leishmaniose tegumentar americana; infecção subclínica *Leishmania braziliensis*; linfócitos T CD8⁺.

ABSTRACT

Introduction: Cutaneous leishmaniasis (CL) caused by *L.braziliensis* is characterized by a strong Th1 response that leads to the development of skin lesions. In endemic areas of *L.braziliensis* infection, individuals that exhibit positive delayed type hypersensitivity to leishmania antigen (SLA) and without history of leishmaniasis are considered as having sub-clinical infection (SC). These individuals produce less IFN- γ and TNF- α as compared to CL patients and the mechanisms, responsible for controlling the infection in these individuals, are yet not understood. **Objective:** The aim of this study is to characterize the role of CD8⁺ T cells in SC infection and in patients with CL. **Materials and Methods:** Monocytes isolated from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CL and SC individuals were infected with *L. braziliensis* and co-cultured with CD8⁺T cells. The evaluation of monocyte infection, cytotoxic markers and apoptosis of target cells was performed by flow cytometry (FACS). The frequency of CD4⁺ and CD8⁺T cells and intracellular production of IFN- γ after stimulation with SLA was evaluated by FACS. The evaluation of granzyme B (GrB) in supernatants of co-cultures was performed by ELISA. **Results:** Although there is no difference in the frequency of CD4⁺ and CD8⁺T cells, after stimulation with SLA we observed that CD8⁺T cells are the main source of IFN- γ in SC individuals. Monocytes from SC individuals were less susceptible to parasite infection than monocytes from CL. CD8⁺T cells from CL induced more apoptosis over infected monocytes as compared with CD8⁺T cells from SC. In addition, the production of GrB by CD8⁺T cells was higher in CL than in SC individuals. **Conclusion:** These results suggest that while in SC *L.braziliensis* infection CD8⁺T cells have a protective role in SC infection, whereas in CL patients, these cells are predominantly involved in the pathology.

Key-words: American tegumentar leishmaniasis; subclinical infection *Leishmania braziliensis*; CD8⁺T cells.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos com infecção subclínica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Frequência de linfócitos T no sangue periférico de pacientes com LC e indivíduos SC.

Figura 2: Expressão intracelular de IFN- γ em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após estímulo com SLA.

Figura 3: Avaliações da infecção de monócitos com promastigotas de *L. braziliensis*.

Figura 4: Avaliação da expressão de marcadores e indutores de apoptose em monócitos após co-cultura com linfócitos T CD8⁺ autólogos.

Figura 5: Expressão de FasL em linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com monócitos não infectados (MO) e monócitos infectados (MOi).

Figura 6: Expressão de C7.1a em linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com monócitos não infectados (MO) e monócitos infectados (MOi).

Figura 7: Avaliação dos efeitos citotóxicos de linfócitos T CD8⁺ sobre monócitos infectados com *L. braziliensis*: Índice de citotoxicidade.

Figura 8: Avaliação dos efeitos citotóxicos de linfócitos T CD8⁺ sobre monócitos infectados com *L. braziliensis*: Frequência de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima B.

Figura 9: Avaliação da produção de granzima B no sobrenadante de co-culturas de monócitos infectados e não infectados e linfócitos T CD8⁺.

Figura 10: Recuperação de promastigotas de monócitos infectados submetidos à co-culturas com linfócitos T CD8⁺.

LISTA DE ABREVIATURAS

AnxV	Anexina V
APC	Alofococianina
BSA	Albumina bovina sérica
I.C	Índice de citotoxicidade
CD244	C7.1a (molécula sinérgica de Fas marcadora de apoptose)
CD95	Molécula indutora de apoptose (FasL)
CD95L	Ligante de CD95 (Fas)
CMSP	Células mononucleares de sangue periférico
DDAO-SE	Succimidil ester
DTH	Hipersensibilidade tardia
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting (citometria de fluxo)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GrA	Granzima A
GrB	Granzima B
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-4	Interleucina 4
L.E	Lise específica
LC	Leishmaniose cutânea
LD	Leishmaniose disseminada

LM	Leishmaniose mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LTCP	Leishmaniose tegumentar de Corte de Pedra
LV	Leishmaniose visceral
Mab	Anticorpo monoclonal
MHC	Moléculas do complexo principal de histocompatibilidade
MO	Monócito
MOi	Monócito infectado
PBS	Solução tampão fosfato
PE	Ficoeritrina
PE-Cy	Ficoeritrina cianocromo
Pfn	Perforina
SC	Subclínico
SLA	Antígeno solúvel de <i>L.braziliensis</i>
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento e transformação-beta
Th1	Resposta imune mediada por células T auxiliaadoras tipo 1
Th2	Resposta imune mediada por células T auxiliaadoras tipo 2
TLA-1	Thymus leukemia antigen-1 (antígeno leucêmico tímico-1)
TNF- α	Fator de necrose tumoral
WHO	Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS	14
2.2	AGENTES ETIOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DAS LEISHMANIOSES	15
2.3	ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)	16
2.4	MECANISMOS IMUNOLÓGICOS E LESÃO TECIDUAL NA LEISHMANIOSE	18
2.5	AS CÉLULAS T CD8 ⁺ NA RESPOSTA IMUNE CONTRA LEISHMANIA	20
3	JUSTIFICATIVA	24
4	HIPÓTESE	25
5	OBJETIVOS	26
5.1	GERAL	26
5.2	ESPECÍFICOS	26
6	DESENHO DO ESTUDO	27
6.1	DESENHO DE ESTUDO: OBJETIVO 01	27
6.2	DESENHO DE ESTUDO: OBJETIVO 02	28
6.3	DESENHO DE ESTUDO: OBJETIVOS 03 E 04	29
7	MATERIAIS E MÉTODOS	30
7.1	ÁREA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA-BA	30
7.2	SELEÇÕES DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS	31
7.2.1	<i>Definição e critérios para diagnóstico das formas clínicas de LTA</i>	31
7.2.2	<i>Critérios de inclusão</i>	31
7.2.3	<i>Critérios de não inclusão</i>	32
7.3	CÁLCULO AMOSTRAL	32
7.4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	33
7.5	OBTENÇÕES DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE L. BRAZILIENSIS	33
7.6	PREPARO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE L. BRAZILIENSIS (SLA)	34
7.7	OBTENÇÕES DE CMSP	34
7.8	SEPARAÇÃO NEGATIVA DE LINFÓCITOS T CD8 ⁺ E MONÓCITOS POR “BEADS” MAGNÉTICAS	35
7.9	INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM PROMASTIGOTAS DE L. BRAZILIENSIS	38
7.10	CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES ESTIMULADAS COM SLA	39
7.11	MARCAÇÃO INTRACELULAR PARA IFN- γ	39
7.12	ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE MEDIADO POR LÍNFOCITOS T CD8 ⁺	40
7.13	RECUPERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE MONÓCITOS INFECTADOS COM L. BRAZILIENSIS APÓS CO-CULTURA COM LINFÓCITOS T CD8 ⁺ AUTÓLOGOS	42
7.14	DOSAGEM DE GRANZIMA B NO SOBRENADANTE DE CO-CULTURAS	43
7.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	43
8	RESULTADOS	45
8.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA	45
8.2	FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T NO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LC E INDIVÍDUOS SC	46
8.3	EXPRESSÃO INTRACELULAR DE IFN- γ EM LINFÓCITOS T CD4 ⁺ E T CD8 ⁺ APÓS ESTÍMULO COM SLA	48
8.4	AVALIAÇÕES DA INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM PROMASTIGOTAS DE L. BRAZILIENSIS	50
8.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES E INDUTORES DE APOPTOSE EM MONÓCITOS APÓS CO-CULTURA COM LINFÓCITOS T CD8 ⁺ AUTÓLOGOS	52
8.5.1	<i>Expressão de anexina V em monócitos (MO) e monócitos infectados (MOi) co-cultivados com linfócitos T CD8⁺ autólogos</i>	52

8.5.2	<i>Expressão de FasL em linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com monócitos não infectados (MO) ou infectados com L. braziliensis (MOi)</i>	55
8.5.3	<i>Expressão de C 7.1^a (CD244) em linfócitos T CD8⁺</i>	57
8.6	AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE LINFÓCITOS T CD8⁺ SOBRE MONÓCITOS INFECTADOS COM L. BRAZILIENSIS	59
8.7	AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GRANZIMA B NO SOBRENADANTE DE CO-CULTURAS DE MONÓCITOS INFECTADOS OU NÃO E LINFÓCITOS T CD8⁺	62
8.8	RECUPERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE MONÓCITOS INFECTADOS SUBMETIDOS A CO-CULTURAS COM LINFÓCITOS T CD8⁺	64
9	DISCUSSÃO	66
10	RESUMO DOS RESULTADOS	74
11	CONCLUSÃO	75
12	REFERÊNCIAS	76
13	ANEXO	86
13.1	ANEXO I.....	86
	TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR.....	86
13.2	ANEXO II.....	89
	<i>TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18), PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR</i>	89
13.3	ANEXO III – PRODUÇÃO ACADEMICA.....	91

1 INTRODUÇÃO

Os estudos realizados pelo grupo do Serviço de Imunologia do Hospital Universitário (HUPES) da UFBA, tem dado ênfase à infecção por *Leishmania braziliensis*, o principal agente causador de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) no Brasil. A LTA causada por *L.braziliensis* apresenta um amplo espectro de formas clínicas e diversas evidências mostram que a resposta imune esta envolvida na patogênese da leishmaniose cutânea (LC) e da leishmaniose mucosa (LM).

As formas clínicas LC e LM cursam com elevada produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e com baixa produção de citocinas regulatórias como IL-10. Apesar de uma resposta imune protetora do tipo Th1 conseguir controlar a infecção, a resposta Th1 exacerbada pode estar envolvida na destruição tissular contribuindo para o desenvolvimento de lesões.

Em contraste com estas formas clínicas um grupo de indivíduos, que apesar de terem contato com o parasito (apresentam reação de Montenegro positiva e produção *in vitro* de IFN- γ após estímulo de PBMC com SLA), não apresentam evidências clínicas de doença. Estes indivíduos são considerados como tendo a infecção subclínica (indivíduos SC) causada por *L.braziliensis*. Os mecanismos pelos quais os indivíduos SC podem controlar a infecção sem o desenvolvimento de lesões ainda são desconhecidos. Este trabalho tem como objetivo avaliar o papel de linfócitos T CD8⁺ no desfecho da infecção subclínica e no desenvolvimento da lesão cutânea causada por *L. braziliensis*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

A leishmaniose é uma doença parasitária causada por várias espécies do gênero *Leishmania* sendo endêmica na África, Ásia, América do Sul e América Central. Cerca de 214.000 novos casos de leishmaniose cutânea são reportados anualmente com estimativa da incidência entre 690.000 – 1.200.000 casos (Alvar, Velez et al. 2012), com aproximadamente 67.000 casos de LC reportados nas América do Sul, América Central e Caribe (Hotez, Bottazzi et al. 2008; Alvar, Velez et al. 2012). No Continente Americano, a estimativa de incidência anual é de 187.000 a 307.000 casos (Alvar, Velez et al. 2012).

No Brasil, tanto a leishmaniose visceral como a leishmaniose tegumentar são endêmicas e apresentam-se em franca expansão geográfica. A leishmaniose tegumentar (LTA) é descrita em vários municípios de todos os estados da federação, sendo reportados 26.000 de casos de leishmaniose cutânea entre anos de 2003-2007 com incidência de 73.000 casos e estimativa de 120.000 casos por ano (Alvar, Velez et al. 2012).

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) tem uma incidência no Estado da Bahia de 22/100.000 habitantes sendo distribuída em áreas de atividade agrícola, com desmatamento e invasão da área silvestre, principalmente na região do recôncavo baiano que apresenta incidência de 24-27/100.000 habitantes (GMB, 2009). A área geográfica de Corte de Pedra-BA é zona endêmica de LTA causada por *L. braziliensis* onde anualmente 500-1.300 novos casos são diagnosticados (Jirmanus, Glesby et al. 2012).

2.2 AGENTES ETIOLÓGICOS E TRANSMISSÃO DAS LEISHMANIOSES

Os protozoários causadores da leishmaniose pertencem ao gênero *Leishmania* (Grimaldi and Tesh 1993). Muitas espécies do gênero *Leishmania* podem causar doença cutânea no homem. A leishmaniose cutânea (LC) no Novo Mundo é causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (Desjeux 1996). Nas Américas são conhecidas atualmente 11 espécies de *Leishmania* dermatrópicas que causam doença humana e no Brasil as principais espécies causadoras de LTA são *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) guyanensis* (SVS/MS, 2009).

A leishmaniose humana é uma doença transmitida pela inoculação das formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro pela picada, durante o repasto sanguíneo, de fêmeas dos insetos do gênero *Lutzomyia spp.*

Uma vez inoculadas na pele as formas promastigotas metacíclicas infectantes (contidas no intestino anterior e aparelho bucinador do inseto) (Handman 1999) são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos), polimorfonucleares neutrófilos e células dendríticas no sítio da inoculação. Estes parasitas transformam-se em formas amastigotas intracelulares dentro dos fagolisossomas de macrófagos, sofrendo multiplicação binária (Courret, Frehel et al. 2002; Naderer and McConville 2011). Após sucessivas multiplicações dentro das células infectadas, que leva a

lise dessas células, estes parasitas irão infectar novos macrófagos, disseminando dessa forma, a infecção pelo parasita (Lainson, Ryan et al. 1987);(Hepburn 2003).

2.3 ASPECTOS CLÍNICOS E IMUNOLÓGICOS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

A *L.braziliensis* é o agente causal da LC e da LM na América Central e América do Sul. Na região de Corte de Pedra-BA, zona de transmissão de *L.braziliensis*, cerca de 3,7% dos pacientes com LC irão, concomitantemente ou após a cura clínica da doença cutânea, desenvolver a forma mucosa da LTA conhecida como espúndia (Marsden, Tada et al. 1984; Jones, Johnson et al. 1987); (Lessa, Lessa et al. 2007). O espectro da doença humana causada por *L.braziliensis* compreende a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose disseminada (LD) (Marsden 1990; Marsden 1990; Marsden 1990).

A leishmaniose cutânea é caracterizada por lesões ulceradas na pele com bordas bem delimitadas, sendo compreendida como a forma clássica da LTA. Estes pacientes apresentam uma forte resposta Th1 com grande produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF) e com níveis baixos ou ausentes de IL-10, produzidas em culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMPS) estimuladas com o antígeno solúvel de *L.braziliensis* (SLA) (Bacellar, Lessa et al. 2002). Após o tratamento da leishmaniose cutânea causada por *L.braziliensis*, os níveis de TNF- α no soro destes pacientes e em

sobrenadantes de culturas, diminuem significativamente, o que também ocorre na leishmaniose mucosa causada por *L.braziliensis* (Da-Cruz, de Oliveira et al. 1996); (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998).

A leishmaniose mucosa causada por *L.braziliensis* é caracterizada por lesões múltiplas, localizadas acima da cintura pélvica, infiltradas, com ulcerações destrutivas nas mucosas do nariz, boca, palato mole e faringe (Marsden, Netto et al. 1986); (Jones, Johnson et al. 1987); (Marsden 1994). Estes indivíduos apresentam uma forte resposta Th1 com elevada produção de IFN- γ e TNF com lesões com infiltrado inflamatório composto de linfócitos e plasmócitos e com raros ou até mesmo ausência de parasitas (Bittencourt and Barral 1991).

Em contraste com estas formas clínicas de infecção causada por *L. braziliensis*, cerca de 10-15% dos indivíduos residentes em uma área de transmissão de *L. braziliensis*, a despeito da exposição a esse parasita, não apresentam evidências de doença clínica. Esses indivíduos apresentam a reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de *Leishmania* positiva (teste de Montenegro positivo) e/ou produção de IFN- γ após cultura de CMSP estimuladas com SLA e são considerados como tendo uma forma sub-clínica (SC) da doença (Follador, Araujo et al. 2002; Follador, Araujo et al. 2002; Schnorr, Muniz et al. 2012).

2.4 MECANISMOS IMUNOLÓGICOS E LESÃO TECIDUAL NA LEISHMANIOSE

Em modelos experimentais de leishmaniose e em humanos, a resposta imune do tipo Th1 tem importância no controle da infecção por *Leishmania*. É comprovada que a produção de IFN- γ é importante para o controle da infecção por leishmania, por estimular a produção de óxido nítrico e superóxido por fagócitos (Murray, Rubin et al. 1983; Liew and Cox 1991; Bogdan, Rollinghoff et al. 2000).

As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LC, após a estimulação com SLA produzem níveis elevados de IFN- γ e TNF- α (Bacellar, Lessa et al. 2002). Na ausência de ativação de células Th1, a produção de IFN- γ é baixa ou ausente o que faz os macrófagos perderem a capacidade de destruir leishmanias e formas disseminadas da leishmaniose são observadas como a leishmaniose visceral e leishmaniose cutânea difusa (Carvalho, Bacellar et al. 1988; Bomfim, Nascimento et al. 1996). Todavia nas formas cutânea e mucosa da leishmaniose tegumentar a despeito de existir uma resposta imune protetora, os pacientes evoluem para a doença.

Na realidade, evidências têm sido acumuladas de que a resposta imune participa da lesão tecidual da leishmaniose tegumentar: 1) Os pacientes com LC e LM produzem níveis altos de IFN- γ e TNF- α (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998), mas em vez de controlar a infecção, desenvolvem úlceras cutâneas e mucosas; 2) Células mononucleares do sangue periférico (CMSP) de pacientes com LM e LC, quando estimuladas com antígeno de *L. braziliensis* produzem, *in vitro*, muito pouco ou não produzem IL-10 e a adição exógena dessa citocina

não regula a produção de IFN- γ e TNF- α nesses pacientes (Bacellar, Lessa et al. 2002); 3) Embora IL-10 seja expressa em células da lesão de pacientes com LM e LC, as células da lesão mucosa expressam menos receptor de IL-10 do que células da lesão cutânea (Faria, Gollob et al. 2005); 4) Os níveis de TNF- α e IFN- γ no soro e em sobrenadantes de culturas de células estimuladas com o antígeno de *Leishmania* diminuem significativamente após o tratamento (Da-Cruz, de Oliveira et al. 1996; Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998).

A destruição celular e tecidual que leva ao aparecimento da lesão é a responsável pela mais importante manifestação clínica na leishmaniose tegumentar que é a úlcera leishmaniótica. Existe uma associação entre produção de IFN- γ e TNF- α e tamanho da lesão assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (Antonelli, Dutra et al. 2005). O uso da pentoxifilina, um inibidor de TNF- α , associado ao antimônio, cura pacientes com LC e LM que são refratários ao tratamento prévio com antimonial (Lessa, Machado et al. 2001; Báfica, Oliveira et al. 2003) e acelera a cura de pacientes virgens de tratamento (Lessa, Lessa et al. 2007).

Em relação à resposta imune, os indivíduos SC apresentam uma menor produção de IFN- γ e TNF- α comparados com pacientes com LC após estimulação *in vitro* com SLA (Follador, Araujo et al. 2002; Novoa, Bacellar et al. 2011). O equilíbrio na produção de IFN- γ e IL-10 observado nos indivíduos SC pode exercer uma modulação da resposta imune, o que está relacionado com o prognóstico favorável destes indivíduos (Gomes-Silva, de Cassia Bittar et al. 2007). Em relação à resposta imune inata, recentemente foi demonstrado que macrófagos de indivíduos SC são menos susceptíveis à infecção por

promastigotas de *L.braziliensis*. Os macrófagos de indivíduos SC produzem menos CCL2, CXCL8, CXCL9 e TNF- α , quando comparados com macrófagos de pacientes com LC e LM (Giudice, Vendrame et al. 2012).

A despeito de trabalhos realizados com diferentes espécies de *Leishmania ssp* causando formas subclínicas em humanos, os mecanismos através dos quais os indivíduos SC controlam a infecção e não desenvolvem a lesão ainda não são compreendidos.

2.5 AS CÉLULAS T CD8⁺ NA RESPOSTA IMUNE CONTRA *Leishmania*

Os antígenos provenientes da digestão proteossômica das formas intracelulares de *Leishmania spp.* são apresentados aos receptores das células T (TCR) dos linfócitos T CD8⁺ via moléculas do MHC de classe I e seus antígenos solúveis e de digestão lisossomal são apresentados via moléculas do MHC de classe II ao TCR de linfócitos T CD4⁺ bem como antígenos de superfície via apresentação cruzada (Laskay, van Zandbergen et al. 2003).

Os linfócitos T CD8⁺ são importantes mediadores da imunidade adaptativa contra microrganismos intracelulares. O recrutamento de células T CD8⁺ e os mecanismos efetores utilizados por estas células são específicos e estes linfócitos T CD8⁺ podem proporcionar imunidade por mecanismos distintos: 1) Citólise de células infectadas (principalmente através de grânulos citotóxicos contendo granzimas, granulolisinas e perforina (Pfn) (Pipkin and Lieberman 2007), 2) via trimerização de CD95L-CD95 (Fas-FasL) que medeia mecanismo apoptótico induzido pela ativação de caspase 8 (Trapani and Smyth 2002) e 3) pela produção de citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α)

ativadoras de macrófagos sendo que linfócitos T CD8⁺ também participam na produção e na regulação da produção de IFN- γ por células T CD4⁺ (Muller, Pedrazzini et al. 1991; Herath, Kropf et al. 2003). Devido ao fato da leishmania ser um parasita intracelular, é plausível que linfócitos T CD8⁺ possam participar com sua resposta citotóxica ao parasita, através da lise de macrófagos infectados via granzimas e perforinas bem como induzindo a morte celular destes macrófagos infectados via Fas/FasL.

As células T CD8⁺ exercem papel central nas leishmanioses experimentais causadas por *L. major* (Stefani, Muller et al. 1994; Belkaid, Von Stebut et al. 2002), *L. mexicana* (Lopez, LeBowitz et al. 1993), *L. infantum* (Tsagozis, Karagouni et al. 2005) e *L. donovani* (Stager, Alexander et al. 2003);(Tsagozis, Karagouni et al. 2003). Embora a maior parte dos estudos em modelos animais de leishmaniose a imunidade protetora esteja relacionada com células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , a participação das células T citotóxicas na resposta contra *Leishmania* tem sido reportada (Hill, Awwad et al. 1989); (Muller, Fruth et al. 1992); (Smith, Rodrigues et al. 1991); (Scott, Artis et al. 2004).

Na leishmaniose causada por *L. major* as células T CD8⁺ têm sido associadas com proteção e cura em animais. Em modelos experimentais de infecção com *L. major*, onde se utilizou uma baixa concentração de parasitas para infecção, observou-se que as células T CD8⁺ eram importantes no controle da infecção primária, mudando uma resposta inicial do tipo Th2 para uma resposta do tipo Th1 (Belkaid, Piccirillo et al. 2002; Uzonna, Joyce et al. 2004). Mais recentemente, em um modelo de vacinação experimental contra *Leishmania* (*Viannia*), utilizando um ligante de Toll-like receptors 1 e 2 como

adjuvante e um antígeno de leishmania, os animais foram protegidos. Essa proteção foi dependente de células T CD8⁺ de memória e da produção de IFN- γ (Jayakumar, Castilho et al. 2011).

Em humanos, evidências tem sido acumuladas mostrando que linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ participam no controle da infecção por leishmania, mas também têm papel importante na patologia da doença. Os pacientes infectados com *L.braziliensis* apresentam um maior número de células T CD4⁺ durante a infecção ativa comparados com pacientes curados e durante o processo de cura há um equilíbrio na relação CD4/CD8 devido ao aumento de células T CD8⁺ (Da-Cruz, Conceicao-Silva et al. 1994). Além disso, uma grande proporção de células T CD8⁺ pode ser encontrada nos infiltrados inflamatórios das lesões, enquanto que uma diminuição no número dessas células é observada no sangue periférico (Da-Cruz, Bertho et al. 2005). Isto também se verifica no processo de cura de pacientes infectados com *Leishmania major* (Gaafar, Veress et al. 1999).

Um estudo realizado em lesões de LC causada por *L. braziliensis*, foi demonstrado que o infiltrado inflamatório mantém a sua atividade durante vários meses, modificando a sua dinâmica ao longo do período compreendido entre a infecção e a cura clínica, com uma diminuição progressiva das células T CD8⁺, fato provavelmente relacionado com uma redução do número de parasitas (Morgado, Schubach et al. 2008). A resposta imune, em indivíduos com histórico de leishmaniose cutânea auto-curável causada por *L. major*, é mediada, não só através da expansão de linfócitos T CD4⁺, antígeno específicas produtoras de IFN- γ , mas também através de células T CD8⁺ produtoras de IFN- γ (Nateghi Rostami, Keshavarz et al. 2010).

Adicionalmente o papel dessas células no desenvolvimento da doença tem sido demonstrado em vários estudos. Na LM causada por *L. braziliensis*, que é a forma grave da LTA, a atividade citotóxica das células T CD8⁺ está implicada na gravidade da doença (Barral-Netto, Barral et al. 1995; Brodskyn, Barral et al. 1997). Na LC localizada, causada por *Leishmania mexicana*, células T CD8⁺ apresentam um forte efeito citotóxico em macrófagos infectados por *Leishmania* (Ruiz and Becker 2007). Também tem sido identificada uma grande quantidade de células citotóxicas em lesões cutâneas causadas por *L. braziliensis* (Machado, Kanitakis et al. 2002; Faria, Gollob et al. 2005). Apesar das características citotóxicas das células T CD8⁺ observadas nas formas clínicas LC e LM, causadas por *L. braziliensis*, na leishmaniose cutânea difusa causada por *L. mexicana*, que é a forma anérgica da LTA, onde a disseminação da doença é causada pela ausência de resposta de células T, linfócitos T CD8⁺ são incapazes de induzir citotoxicidade contra macrófagos infectados (Ruiz and Becker 2007).

O papel dos linfócitos T CD8⁺ no desenvolvimento da úlcera cutânea ainda não é bem fundamentado, porém as células T CD8⁺ estão presentes em úlceras cutâneas na infecção tardia causada por *L. braziliensis* o que não ocorre na infecção recente (Faria, Souza et al. 2009), isto estaria relacionado com a manutenção do processo de destruição tecidual na LTA mesmo com uma baixa carga parasitária. Em adição, existe uma correlação positiva entre citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ e a liberação, por essas células, de granzima B, em pacientes com doença cutânea ativa causada por *L. major* (Bousoffara, Louzir et al. 2004).

Diversas evidências mostram a participação de linfócitos T CD8⁺ na leishmaniose tegumentar e é provável que estas células possam estar associadas à destruição tecidual que leva à formação da úlcera cutânea.

3 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose tegumentar americana constitui um importante problema de saúde pública, devido às altas taxas de prevalência mundial e de difícil controle epidemiológico. No Brasil tem-se observado um elevado crescimento do número de casos de LTA, tanto em magnitude como em expansão geográfica, com surtos epidêmicos em todas as regiões. Muito se avançou na compreensão da imunopatogênese da leishmaniose tegumentar humana, tendo como base aspectos relacionados à documentação que a forte resposta do tipo Th1 não modulada estaria associada à destruição tecidual observada nesta doença. Em áreas endêmicas de transmissão de *L. braziliensis*, cerca de 10-15% dos indivíduos a despeito da exposição a esse parasito, não apresentam evidências de doença clínica. Esses indivíduos apresentam a reação de hipersensibilidade tardia ao antígeno de leishmania positiva (teste de Montenegro) e são considerados como tendo uma forma sub-clínica da doença. A produção de IFN- γ e de TNF- α *in vitro* por células mononucleares desses indivíduos é menor do que a produção em pacientes que apresentam a lesão cutânea. Pouco se sabe sobre os mecanismos imunológicos que estariam associados ao não desenvolvimento da doença nesses indivíduos. Os dados da literatura mostram que os linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos tanto no

desenvolvimento quanto na cura das lesões na LC e LM, porém não há estudos referentes ao papel dessas células em pacientes com infecção subclínica causada por *L. braziliensis*. O conhecimento de que as células T CD8⁺ podem estar envolvidas tanto na cura quanto no desenvolvimento da lesão, nos deram suporte para estudar o comportamento dessas células nos indivíduos que apresentam a infecção subclínica por *L. braziliensis* e no desenvolvimento da lesão em pacientes com a forma cutânea da doença.

4 HIPÓTESE

Na forma subclínica causada por *L. braziliensis*, os linfócitos T CD8⁺ participam no controle do parasito, enquanto que na leishmaniose cutânea essas células estão envolvidas na destruição tecidual e desenvolvimento da lesão.

5 OBJETIVOS

5.1 GERAL

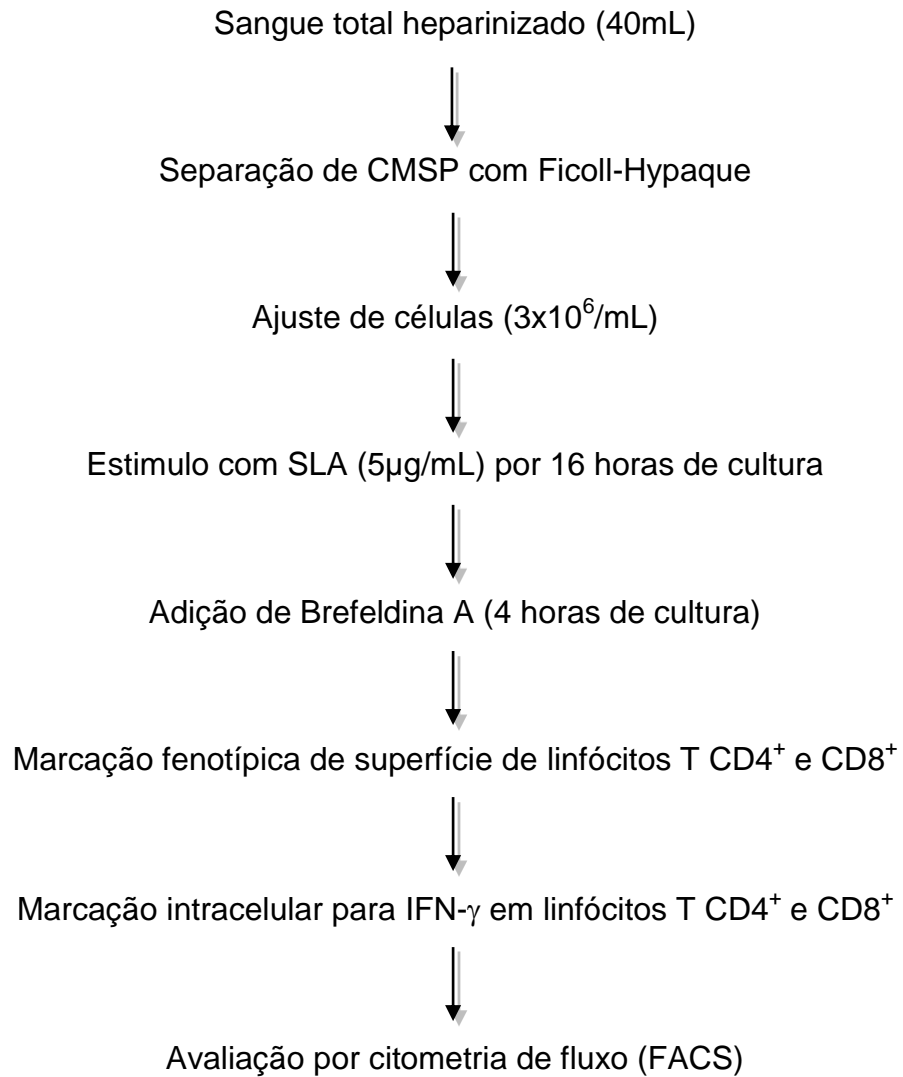
Avaliar o papel de linfócitos T CD8⁺ durante a infecção subclínica e no desfecho da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*.

5.2 ESPECÍFICOS

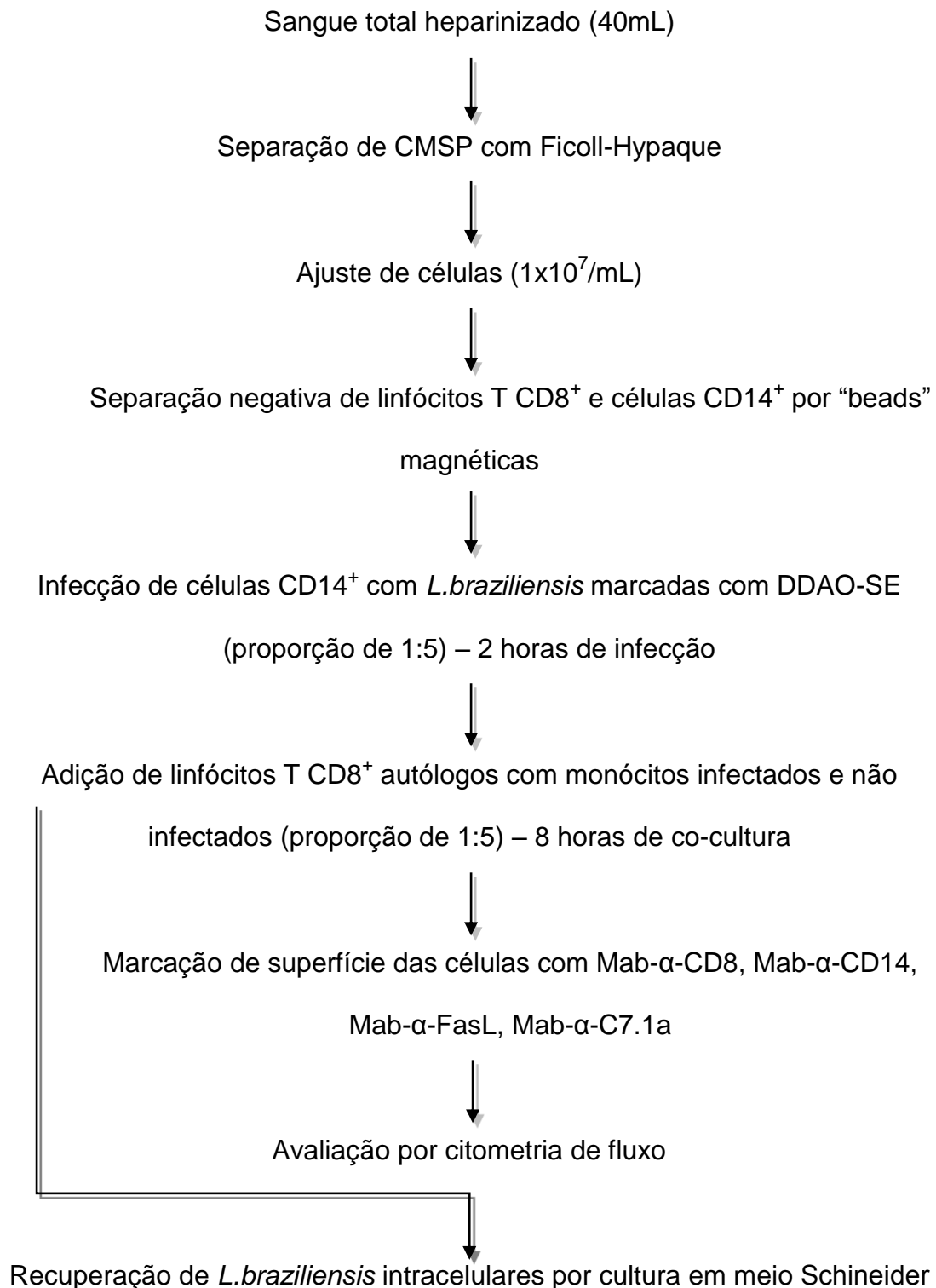
- (1) Avaliar a frequência de células T CD8⁺ e a produção de IFN- γ por essas células em pacientes com leishmaniose cutânea (LC) e em indivíduos com a infecção subclínica (SC) após estímulo de CMSP com SLA;
- (2) Avaliar a susceptibilidade à apoptose de linfócitos T CD8⁺ através da expressão de FasL e C7.1a na superfície desse linfócitos nos dois grupos avaliados;
- (3) Avaliar os efeitos citotóxicos dos linfócitos T CD8⁺ sobre monócitos autólogos infectados com *L.braziliensis* nos dois grupos e a capacidade desses linfócitos em eliminar os parasitas intracelulares;
- (4) Mensurar a produção de granzima B intracelular e no sobrenadante de co-culturas de linfócitos T CD8⁺ e monócitos autólogos infectados ou não com *L.braziliensis*.

6 DESENHO DO ESTUDO

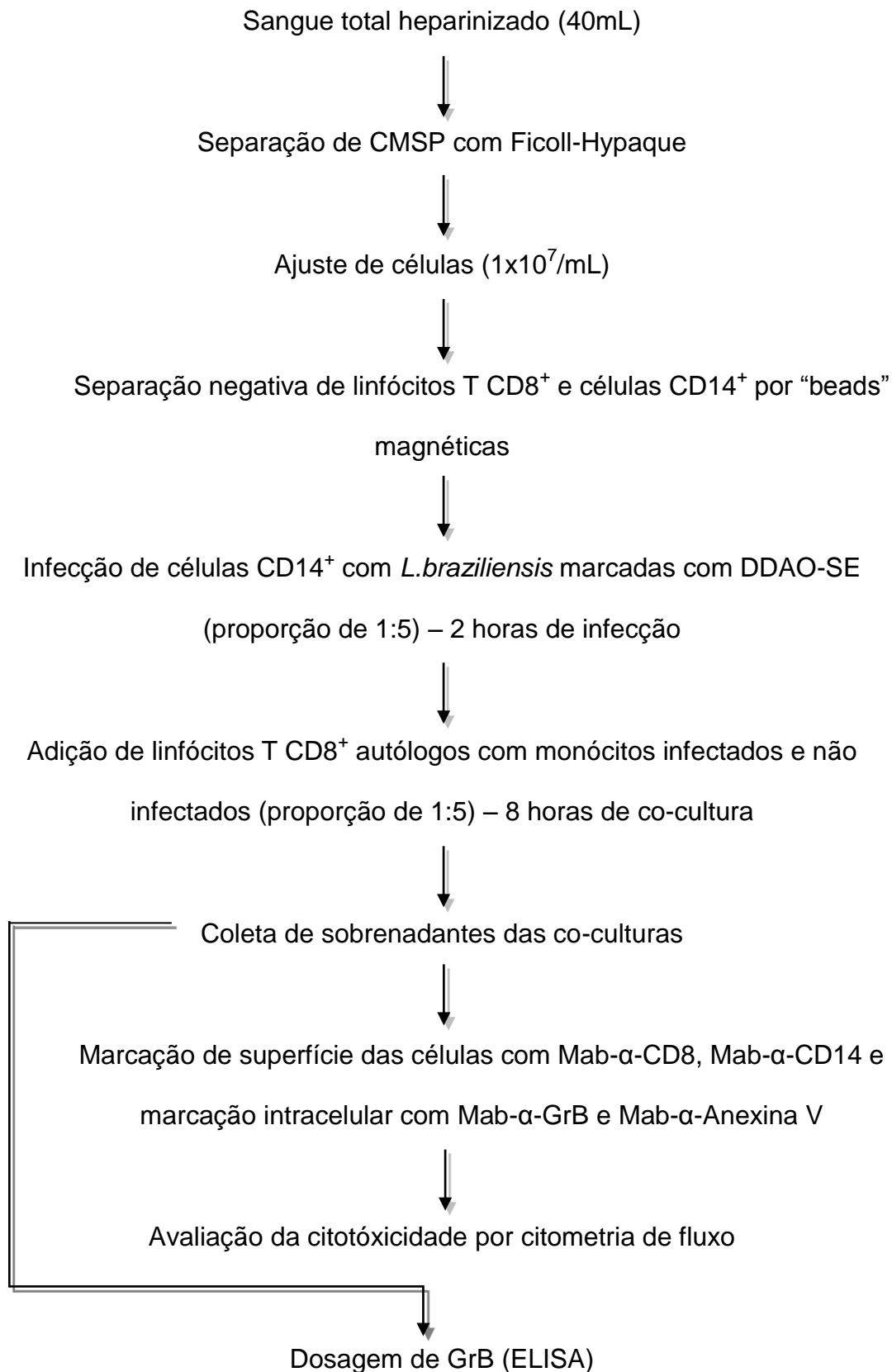
6.1 DESENHO DE ESTUDO: Objetivo 01



6.2 DESENHO DE ESTUDO: Objetivo 02



6.3 DESENHO DE ESTUDO: Objetivos 03 e 04



7 MATERIAIS E MÉTODOS

7.1 ARÉA ENDÊMICA DE CORTE DE PEDRA-BA

O Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Prof. Edgard Santos está localizado em Salvador e, desde 1980, um posto de saúde foi estabelecido na vila de Corte de Pedra. Desde então, médicos do Serviço de Imunologia e médicos da Universidade Federal da Bahia (UFBA) incluindo clínicos, imunologistas, infectologistas, dermatologistas e otorrinolaringologistas trabalham quinzenalmente no posto de saúde.

Nosso grupo vem estudando a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em Corte de Pedra, Bahia, uma área de transmissão de *L.braziliensis* (Grimaldi, Tesh et al. 1989) onde são encontradas três formas clínicas distintas de LTA: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucosa (LM) e a leishmaniose disseminada (LD) (Carvalho, Barral et al. 1994).

O posto de saúde está localizado na zona endêmica de Leishmaniose Tegumentar Americana, causada por *L.braziliensis* localizada a 280 km, a sudoeste de Salvador, BA. A área é caracterizada por vegetação característica da Mata Atlântica, abrangendo 10.000 Km² de área geográfica com cerca de vinte vilarejos circunvizinhos de população com atividade econômica predominantemente rural.

7.2 SELEÇÕES DOS PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA E INDIVÍDUOS SUBCLÍNICOS

7.2.1 Definição e critérios para diagnóstico das formas clínicas de LTA

Os pacientes com LC foram diagnosticados e selecionados seguindo os seguintes critérios clínicos e laboratoriais: lesão cutânea ulcerativa típica, geralmente única e com bordas elevadas, detecção do parasito por PCR ou por cultivo do parasita nos fragmentos das lesões obtidas por biópsia, exame histopatológico e pelo teste cutâneo de hipersensibilidade tardia (DTH) ao antígeno solúvel de *L.braziliensis* (reação de Montenegro positiva).

Os indivíduos SC foram selecionados seguindo os critérios de reação de DTH positiva e/ou produção de IFN- γ em culturas de CMSP estimuladas com SLA sem histórico de doença cutânea ou mucosa.

7.2.2 Critérios de inclusão

Pacientes com LC com duração da doença não superior a 60 dias e virgens de tratamento para leishmaniose, com no máximo 03 lesões cutâneas foram selecionados. Os indivíduos SC voluntários foram recrutados para a avaliação clínica e coleta da amostra de sangue periférico.

Todos os pacientes diagnosticados com leishmaniose tegumentar, independente da participação no estudo, foram submetidos ao tratamento com

antimonial pentavalente; tratamento padrão recomendado pela Organização Mundial de Saúde e pelo Ministério da Saúde. Os pacientes receberam N-metil-Antimonial Meglumine em uma dose de 20mg/kg de peso, administrado por via endovenosa, diariamente por 20 dias para LC.

7.2.3 Critérios de não inclusão

Indivíduos com idade inferior a 15 anos e superior a 60 anos, gestantes não participaram do estudo considerando a necessidade da retirada de 40mL de sangue venoso periférico total heparinizado para realização dos estudos da resposta imune.

7.3 CÁLCULO AMOSTRAL

O tamanho amostral foi calculado obtendo-se um N de 15 indivíduos para cada um dos dois grupos de estudo. Foi utilizado o Teste de Hipóteses com erro α de 5%, com poder amostral de 95% e desvio padrão de $\pm 2,0\%$. Foi utilizado o programa estatístico GraphPadPrism 5, onde os dados da infecção de macrófagos de pacientes com leishmaniose cutânea ($27 \pm 15\%$) e de indivíduos SC ($18 \pm 7\%$) foram utilizados como parâmetros para infecção de monócitos (Giudice, Vendrame et al. 2012).

7.4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética Médica da Maternidade Climério de Oliveira, Universidade Federal da Bahia sob Aprovação/Resolução Nº 150/2009. Antes de entrar no estudo, todos os pacientes foram informados sobre a natureza da pesquisa e sobre a participação no projeto, mediante assinatura, pelos participantes ou de seus representantes legais, dos termos de consentimento livre e esclarecido para maiores e menores de 18 anos (TCLEs [Anexo I e II]).

7.5 OBTENÇÕES DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L.braziliensis*

As formas promastigotas de *L.braziliensis* (MHOM/BR/2003/LTCP15344) foram obtidas a partir do cultivo em meio LIT/NNN, do material proveniente das biopsias em estufa à temperatura de 24-26°C, durante 4 a 6 dias. Estas formas promastigotas foram repicadas em meio Schineider sendo mantidas por no máximo cinco repiques por cada experimento, devido à variabilidade fenotípica apresentadas por parasitas do gênero *Leishmania* após sucessivos cultivos.

Para realização da infecção, estas células promastigotas foram cultivadas em meio Schineider até atingirem a fase estacionária do crescimento, sendo este período compreendido entre 4 e 5 dias de cultivo em estufa a 24-26°C. Ao atingir a fase estacionária de crescimento, estas formas promastigotas foram submetidas à lavagem por duas vezes em solução salina a 0,9% estéril a 200 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. As células

promastigotas foram ajustadas para 1×10^7 parasitos totais (em 10mL) e re-suspensas em meio RPMI 1640 incompleto com gentamicina em uma concentração de 1×10^3 parasitas/mL.

7.6 PREPARO DO ANTÍGENO SOLÚVEL DE *L.braziliensis* (SLA)

O antígeno solúvel de *L. braziliensis* (MHOM/BR/2001) foi obtido por lise através de sonicação e choques térmicos como descrito previamente (Reed, Badaro et al. 1986).

7.7 OBTENÇÕES DE CMSP

As células obtidas mediante separação por gradiente de densidade Ficoll-Hypaque (GE Healthacare, Uppsala-Sweden) foram colhidas e submetidas a duas lavagens sucessivas com solução salina estéril por centrifugação a $200 \times g$ por 10 minutos cada lavagem. Estas células foram quantificadas em câmara de Neubauer e ajustadas a concentração de 1×10^7 células/mL de RPMI completo.

7.8 SEPARAÇÃO NEGATIVA DE LINFÓCITOS T CD8⁺ E MONÓCITOS POR “BEADS” MAGNÉTICAS

A partir de 1×10^7 CMSP/mL, foi realizada a seleção negativa de linfócitos T CD8⁺, utilizando partículas magnéticas, submetidas a um campo eletromagnético de acordo com as instruções do fabricante (Dynabeads[®] Untouched[™] Human CD8 T Cells, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway).

As “beads” magnéticas (500µL da suspensão estoque) foram preparadas por meio de duas lavagens com tampão de separação (PBS 1X, 0,5% de BSA e 1µM de azida) submetidas ao campo eletromagnético durante 5 minutos, sendo posteriormente resuspensas em 500µL de tampão de separação. Após ajuste para 1×10^7 CMSP/mL, as células foram lavadas por duas vezes em PBS 1X por 10 minutos a 200 x g e suspensas em 500µL de tampão de separação (PBS 1X, 0,5% de BSA e 1µM de azida sódica). Estas células foram incubadas com anticorpos monoclonais específicos para o reconhecimento de moléculas CDs na superfície das células utilizando 150µL do mix de anticorpos do kit (não contêm anticorpos Mab-α-CD8) mais 150µL soro fetal bovino inativado. As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C.

A suspensão de beads magnéticas (500µL) foi acrescentada as preparações e posteriormente foi adicionado volume suficiente para 5mL de tampão de separação, sob homogeneização por inversão, as preparações foram mantidas a 4°C durante 15 minutos para o contato das células marcadas com o mix de anticorpos adsorvidos às beads magnéticas.

Para a separação propriamente dita, foi utilizado um suporte magnético onde foram colocados os tubos com as beads e células a serem separadas

negativamente. Estes tubos foram submetidos por 5 minutos a um campo eletromagnético e a fração de células não ligadas às beads (sobrenadante) foi coletada e, posteriormente, transferidas para um novo tubo de polipropileno. O processo de submissão ao campo eletromagnético foi realizado por duas vezes com intuito de elevar a pureza da separação bem como retirar as beads não ligadas na primeira passagem.

As células T CD8⁺, obtidas por seleção negativa, foram quantificadas e ajustadas a uma concentração de 5×10^6 células/mL em RPMI completo e mantidas a 4°C até a realização das co-culturas.

Para a separação de monócitos 5×10^6 CMSP/mL foram submetidas à separação negativa com beads magnéticas, de acordo com protocolos do fabricante (Dynabeads[®] Untouched[™] Human Monocytes, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). As beads magnéticas (500µL da suspensão estoque) foram preparadas do mesmo modo como para a separação de células T CD8⁺.

Após ajuste para 1×10^7 CMSP/mL, as células foram lavadas por duas vezes em PBS 1X por 10 minutos a 200 x g e resuspensas em 500µL de tampão de separação (PBS 1X, 0.5% de BSA e 1µM de azida). Estas células foram submetidas à adsorção de anticorpos contra moléculas CDs na superfície das células utilizando 150µL do mix de anticorpos do kit (não contém anticorpos Mab-α-CD14) mais 150µL de solução de bloqueio de receptores para porção Fc expressos na superfície das células CD14⁺ (solução Fc Block contida no Kit).

As células foram incubadas por 20 minutos a 4°C e após esse período a suspensão de beads magnéticas (500µL) foi acrescentada as preparações de células em tubos de polipropileno volume suficiente para 5 mL de tampão de

separação, sendo a preparação submetida à homogeneização a 4°C durante 15 minutos.

Do mesmo modo que foi realizada a separação magnética dos linfócitos T CD8⁺, foi utilizado um suporte magnético para separação onde foram colocados os tubos com as beads e as células a serem separadas negativamente. Estes tubos foram submetidos a 5 minutos de campo eletromagnético e a fração de células não ligadas foi coletada e transferida para um tubo de polipropileno. Como realizado na separação de linfócitos, o processo foi repetido por mais duas vezes.

As células CD14⁺ foram quantificadas e ajustadas a uma concentração de 1x10⁶ células/mL em RPMI completo e mantidas a 4°C até a realização das co-culturas.

A pureza das separações de células T CD8⁺ e CD14⁺ foi determinada por citometria de fluxo utilizando anticorpos específicos marcados (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) FITC-MAb α -CD3 (clone SP34-2), PE-MAb α -CD4 (clone RPA-T4), PE-Cy5-MAb α -CD8 (clone RPA-T8) e APC-MAb α -CD14 (clone 61D3). A pureza para células T CD8⁺ foi de 82,6 \pm 0,9% e para células CD14⁺ foi de 78,6 \pm 13,9%.

7.9 INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM PROMASTIGOTAS DE *L.braziliensis*

As formas promastigotas de *L. braziliensis* foram ajustadas para 1×10^7 /mL após serem marcadas com DDAO-SE (succinimidyl ester) como descrito nos protocolos do fabricante para ligação com proteínas e células (CellTracer™ FarRed DDAO-SE Invitrogen™ MOLECULAR PROBES®).

Depois de marcadas, as promastigotas foram co-incubadas, em tubos de polipropileno, com 1×10^6 monócitos na proporção de 5:1 promastigotas por monócito em 1mL de RPMI com 10% de SFB por 2h a 37°C e 5% de CO₂. As promastigotas que não infectaram os monócitos foram retiradas da preparação com duas lavagens com RPMI/10% SFB a 200 x g sobre baixa aceleração e desaceleração por 10 minutos.

Os monócitos infectados foram submetidos à análise por citometria de fluxo para avaliação da infecção com as promastigotas DDAO-SE⁺. A infecção de monócitos foi também avaliada por microscopia ótica de lâminas preparadas por citocentrifugação coradas com PanOtico rápido. As células foram contadas sob 400X por dois avaliadores independentes.

7.10 CULTURAS DE CÉLULAS MONONUCLEARES ESTIMULADAS COM SLA

As CMSP foram lavadas por duas vezes em solução salina 0,9% a 200 x g e posteriormente suspensas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro AB humano (Sigma).

Estas células ajustadas à concentração de 3×10^6 células/mL, foram mantidas com estímulo de SLA (5µg/ml) e não estimuladas em cultura a 37°C, sob atmosfera de 5% de CO₂ por 12 horas, sendo posteriormente adicionado às essas culturas 10ng/mL de Brefeldina A (Sigma) e mantidas em cultura por mais 4 horas.

7.11 MARCAÇÃO INTRACELULAR PARA IFN- γ

As CMSP após cultura, estimuladas com SLA e não estimuladas, 1×10^5 células/mL foram submetidas à marcação de superfície com anticorpos monoclonais de conjugados com fluorocromos PE-MAb α -CD3 (clone SP34-2), FITC-MAb α -CD8 (clone RPA-T8), FITC-MAb α -CD4 (clone RPA-T4) e APC-MAb α -CD14 (clone 61D3) (Sigma).

Após a marcação de superfície, estas células foram marcadas intracelularmente com anticorpos monoclonais de murinos PE-MAb α -IFN- γ (clone 4S. B3) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) utilizando para permeabilização das membranas celulares a solução BD Cytotfix/Cytoperm de acordo com os protocolos do fabricante (BD Biosciences, San Jose, CA, USA).

Um total de 50.000 eventos foram adquiridos e depois de selecionados como linfócitos e monócitos utilizando o citômetro de fluxo FACS Canto (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA). Os eventos adquiridos foram analisados utilizando o software FlowJo ThreeStar.

7.12 ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE MEDIADO POR LÍNFOCITOS T CD8⁺

O ensaio de citotoxicidade foi realizado de acordo com protocolo descrito previamente (Derby, Reddy et al. 2001). Linfócitos T CD8⁺ previamente separados negativamente por “beads” magnéticas foram co-cultivados com monócitos infectados (MOi) e monócitos não infectados (MO) em uma proporção de 5:1 células efetoras para cada célula alvo a 37°C, 5% de CO₂ por um período de 8h em tubos de polipropileno.

Após co-cultura, foi realizada a marcação de superfície das células com anticorpos monoclonais murinos específicos para ligantes humanos ligados a fluorocromos PE-Cy5-MAb α -CD8 (clone RPA-T8) e APC-MAb α -CD14 (clone 61D3) (BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, Calif., USA) por 15 minutos a 4°C. Posteriormente as preparações foram submetidas à marcação com Anexina V-FITC utilizando tampão comercial para permeabilização Annexin V Binding buffer 1X (BD) por 20 minutos a 4°C e a marcação com Alexa-Fluor 647-MAb α -GB (clone GB11) (BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, CA., USA) nas mesmas condições de incubação.

Os eventos foram adquiridos no citômetro de fluxo, sendo selecionados os monócitos por tamanho e granulosidade, e a partir dos dados de expressão

de Anexina V (AnxV) em monócitos infectados (MOi) e monócitos (MO) co-cultivados com linfócitos T CD8⁺ foi possível mensurar o índice de citotoxicidade (I.C) das células efetoras mediante a expressão matemática:

$$I.C = (\% \text{ de MOiAnxV}^+ \text{ com CD8}^+) - (\% \text{ de MOAnxV}^+ \text{ com CD8}^+)$$

(Ruiz and Becker 2007)

Em adição à avaliação da citotoxicidade exercida pelas células T CD8⁺ sobre MOi e MO, foi avaliada a expressão de FasL e de C 7.1a, que é uma molécula expressa, em sinergismo com a expressão de FasL, conhecida como receptor 2B4 (CD244) e também utilizada como marcador de indução do estado apoptótico em células alvo (monócitos e macrófagos infectados por *Leishmania*) (Vaidya and Mathew 2006). A marcação destas moléculas foi realizada utilizando anticorpos murinos marcados PE-MAb α -C7.1a (eBioDM244) (eBioscience, San Diego, CA,USA) , PE-MAb α -FasL (clone L5178Y) BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, CA., USA).

A expressão intracelular de GrB em células T CD8⁺ foi realizada utilizando anticorpos murinos marcados Alexa-Fluor 647-MAb α -GB (clone GB11) (BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, CA., USA).

7.13 RECUPERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE MONÓCITOS INFECTADOS COM *L. braziliensis* APÓS CO-CULTURA COM LINFÓCITOS T CD8⁺ AUTÓLOGOS

Foram utilizadas para as recuperações de *L. braziliensis* culturas de MOi como limiar basal de citotoxicidade (somente células alvo infectadas) MOi co-cultivados com linfócitos T CD8⁺ autólogos utilizados como teste de citotóxicidade efetiva (células alvo com células efectoras). A redução do número de promastigotas, recuperadas de monócitos infectados co-cultivados com linfócitos T CD8⁺, pode ser relacionado com o efeito citotóxico das células T CD8⁺ autólogas.

Após 8 horas de co-cultura, foi realizada a coleta de sobrenadante para realização de dosagens de IFN- γ por ELISA. As células foram coletadas e lavadas, por duas vezes, com solução salina 0,9% estéril, mediante centrifugação sob 200 x g por 10 minutos com baixa aceleração e desaceleração.

Realizadas as lavagens, as células foram suspensas em meio Schneider e incubadas a 22°-24°C durante 96 horas com objetivo de recuperar as amastigotas intracelulares viáveis por cultura. Após o cultivo, 10 μ L do meio líquido Schineider, com formas promastigotas recuperadas, foram diluídos em 0,99 mL de solução salina a 0,9% (diluição de 100X). As promastigotas viáveis recuperadas, a partir de monócitos infectados, foram quantificadas e os valores expressos em número de promastigotas x 10⁴/mL.

7.14 DOSAGEM DE GRANZIMA B NO SOBRENADANTE DE CO-CULTURAS

Os sobrenadantes das co-culturas de células de SC e LC e indivíduos saudáveis, foram coletados para determinação de Granzima B pela técnica de imunoenzimática ELISA (BD Pharmingen and R&D Systems, Minneapolis, MN).

7.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para a análise da frequência de células T CD4⁺ e T CD8⁺ foi utilizado um teste de Anova com pós-teste de Tukey's Multiple Comparison e a expressão intracelular de citocinas por estes tipos celulares após estímulo com SLA foi analisada com o teste de Kruskal-Wallis.

A avaliação da capacidade apoptótica de linfócitos T CD8⁺ mediada pela expressão de FasL e C7.1a foi analisada pelo teste de Mann Whitney assim como o percentual de células CD14⁺ infectadas nos dois grupos (LC e SC). A capacidade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ via granzima B foi analisada de duas maneiras distintas: pela expressão de granzima B por células CD8⁺ e pela determinação da concentração de granzima B por técnica de ELISA, sendo ambas analisadas pelo teste de Mann Whitney.

A avaliação dos efeitos citotóxicos e apoptóticos dos linfócitos T CD8⁺ sobre MOi e MO nos dois grupos de indivíduos, foi feita mediante a expressão de Anexina V, onde a análise foi realizada utilizando o teste de Kruskal-Wallis,

e pelas expressões matemáticas índice de citotoxicidade e lise específica que foram analisados com o teste de Mann Whitney.

A regeneração de *L .braziliensis* pós co-cultura foi analisada por meio do teste de Kruskal-Wallis.

Para todos os testes foi considerado significativo um valor de $p < 0,05$. Para todos os testes o intervalo de confiança foi de 95%. O programa utilizado para a análise estatística foi o Graph Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

8 RESULTADOS

8.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os dados epidemiológicos da população estudada, como o número de indivíduos, gênero, idade, tempo de doença, níveis de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de CMSP após estímulo com SLA e tamanho da reação de Montenegro, estão dispostos resumidamente na Tabela 1.

Tabela 1: Aspectos epidemiológicos dos pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos com infecção subclínica.

	N	Gênero Masculino/Feminino	Idade	Tempo de doença	IFN-γ (pg/mL)	DTH (mm)
LC	20	13 (66%) / 7 (34%)	32 \pm 12	40 \pm 20	3454 \pm 2105*	17x16
SC	20	11 (56%) / 09 (44%)	21 \pm 15	-	320 \pm 251*	13x7

Observações: Idade reportada em anos, tempo de doença reportado em dias. Determinação da concentração de IFN- γ realizada pela técnica de ELISA, em sobrenadantes de culturas de CMSP após 72 horas de estímulo com SLA. Para todas as variáveis os valores são apresentados em média \pm desvio padrão. $p < 0,05^*$, teste t pareado.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre os gêneros, idade e tamanho da reação de Montenegro. Como já estabelecido em trabalhos anteriores do grupo (Follador, Araujo et al. 2002; Novoa, Bacellar et al. 2011), nas culturas de CMSP de indivíduos SC, estimuladas com SLA,

houve uma menor produção de IFN- γ quando comparado com os pacientes com LC (320 ± 251 pg/mL versus 3454 ± 2105 pg/mL) $p < 0,05$.

8.2 FREQUÊNCIA DE LINFÓCITOS T NO SANGUE PERIFÉRICO EM PACIENTES COM LC E INDIVÍDUOS SC

A frequência de linfócitos T pode variar tanto em número quanto em razão (células T CD4⁺/CD8⁺) nas mais variadas patologias causadas por parasitas extracelulares e intracelulares. Ao avaliarmos a frequência de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ no sangue periférico, foram obtidos resultados similares nos grupos de pacientes com LC e indivíduos SC. A estratégia de análise da frequência de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é exibida na figura 1A.

A frequência de células T CD4⁺ no sangue periférico mostrou um percentual de $48 \pm 10\%$ nos pacientes com LC e $43 \pm 14\%$ nos indivíduos SC, não revelando diferenças estatísticas entre os grupos ($p > 0,05$), enquanto que a frequência de células de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico foi de respectivamente $18 \pm 5\%$ para os pacientes com LC e $20 \pm 6\%$ nos indivíduos SC ($p > 0,05$). Estes dados estão representados graficamente na figura 1B.

Figura 1:

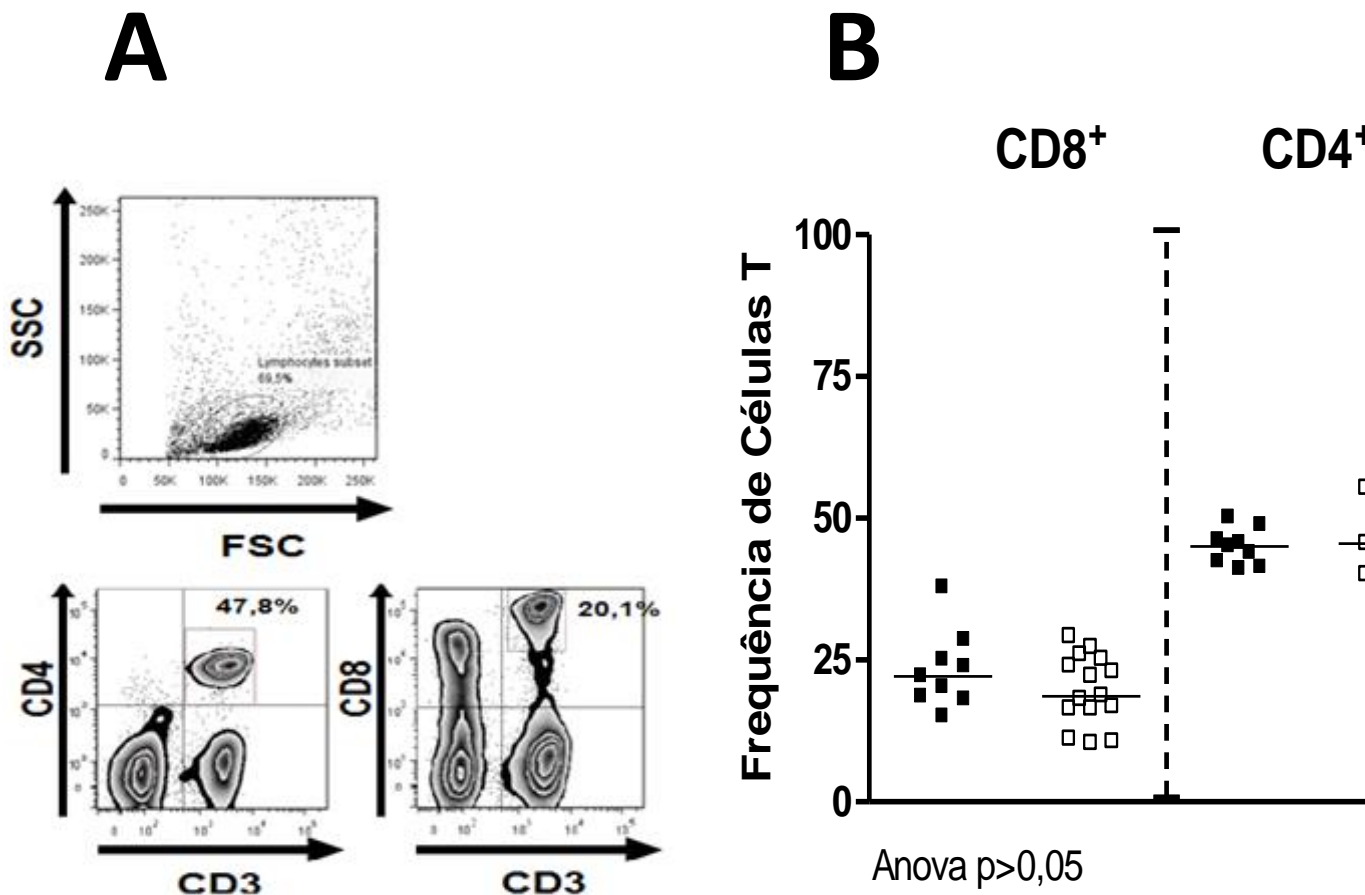


Fig.1: **A)** Estratégia de análise por citometria de fluxo da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico de indivíduos SC (n=12) e pacientes com LC (n=15). A seleção de linfócitos foi realizada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e as populações de células T selecionadas quanto a marcação com anticorpos monoclonais associados a fluorocromos. **B)** Representação gráfica da frequência em percentagem de células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos SC (■) e pacientes com LC (□). * p>0,05, teste de Anova.

8.3 EXPRESSÃO INTRACELULAR DE IFN- γ EM LINFÓCITOS T CD4⁺ E T CD8⁺ APÓS ESTÍMULO COM SLA

A ativação de monócitos e macrófagos por IFN- γ e os efeitos na ativação dessas células é bem documentado. A fonte celular de IFN- γ foi avaliada por citometria de fluxo e a expressão desta citocina em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, demonstrou diferentes perfis de expressão, observados entre pacientes com LC e indivíduos SC.

A expressão de IFN- γ em células T CD4⁺ foi maior em pacientes com LC ($6 \pm 2\%$) em comparação com indivíduos SC ($0,2 \pm 1\%$). Entretanto nos indivíduos SC o percentual de células T CD8⁺ expressando IFN- γ é maior que o percentual de células T CD4⁺ expressando esta citocina ($4 \pm 1\%$ versus $1,2 \pm 1\%$ respectivamente, $p < 0,05$). Nas culturas de células dos pacientes com LC foi observado um perfil inverso quanto à fonte produtora de IFN- γ , onde células T CD4⁺ apresentam-se como a fonte preponderante dessa citocina ($6 \pm 2\%$) comparadas às células T CD8⁺ desses pacientes ($1,5 \pm 0,5\%$) $p < 0,05$. A figura 2A mostra a estratégia para seleção de células T CD4⁺ e T CD8⁺ expressando IFN- γ e a figura 2B é a representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ IFN- γ ⁺ e células T CD8⁺ IFN- γ ⁺ de indivíduos SC e pacientes com LC.

Figura 2:

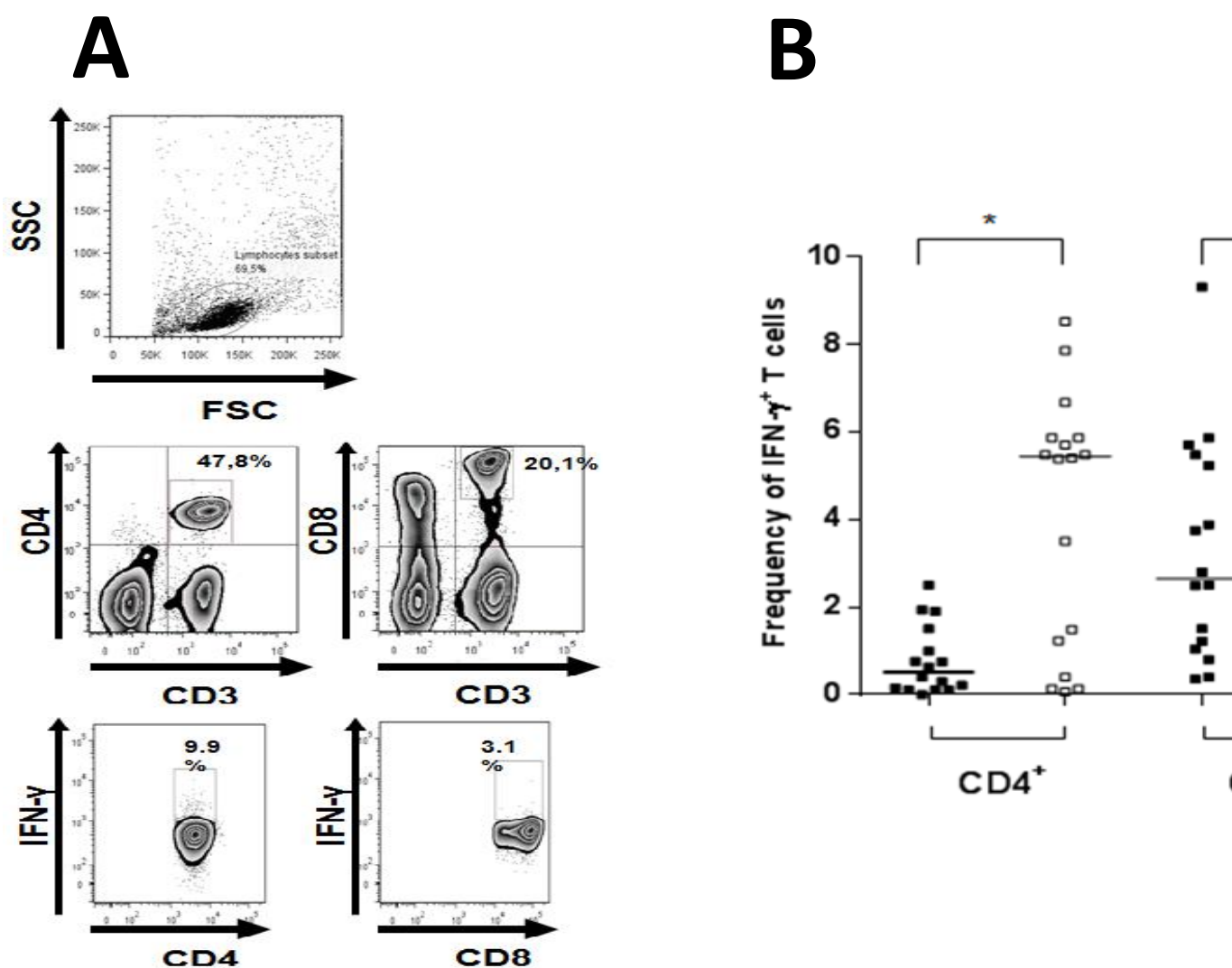


Fig.2: **A)** Estratégia de análise por citometria de fluxo da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando IFN- γ após 12 horas de estímulo com SLA provenientes de indivíduos SC (n=16) e pacientes com LC (n=18). Os histogramas mostram a quantidade de eventos CD8⁺IFN- γ ⁺ em um pacientes com LC (histograma superior) e eventos CD4⁺IFN- γ ⁺ em um indivíduo SC. **B)**

Representação gráfica da frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ expressando IFN- γ de indivíduos SC (■) e pacientes com LC (□). * p<0,05, teste de Kruskal-Wallis.

Estas observações sugerem que células T CD8⁺ são uma fonte importante de IFN- γ nos indivíduos SC.

8.4 AVALIAÇÕES DA INFECÇÃO DE MONÓCITOS COM PROMASTIGOTAS DE *L. braziliensis*

Uma maior capacidade de infecção de macrófagos por *L. braziliensis*, bem como uma maior carga parasitária podem influenciar diretamente no desenvolvimento da resposta imune contra esse parasita e conseqüentemente no desfecho da doença. Foi avaliada a infecção de monócitos de pacientes com LC e de indivíduos SC após a infecção com promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com DDAO-SE. Através da citometria de fluxo foi observado que os monócitos de indivíduos SC são menos susceptíveis à infecção do que os monócitos de pacientes com LC.

A frequência de monócitos infectados nos pacientes com LC foi de 47% \pm 10, um maior percentual de infecção quando comparada com a frequência de monócitos de indivíduos SC (34% \pm 9) (p<0,05). Estes resultados corroboram com resultados obtidos com macrófagos derivados de células mononucleares de indivíduos SC, que apresentaram, após exposição a *L. braziliensis*, uma menor frequência de infecção e um menor número de amastigotas intracelulares comparados com pacientes com LC e LM (Giudice, Vendrame et al. 2012).

A estratégia de análise para seleção de monócitos infectados e não infectados por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), expressão de DDAO-SE⁺, e os histogramas mostrando os eventos duplo-positivos CD14⁺/DDAO-SE⁺ para indivíduos SC e pacientes com LC são mostrados na figura 3A. A figura 3B apresenta a frequência de monócitos infectados nos dois grupos.

Figura 3:

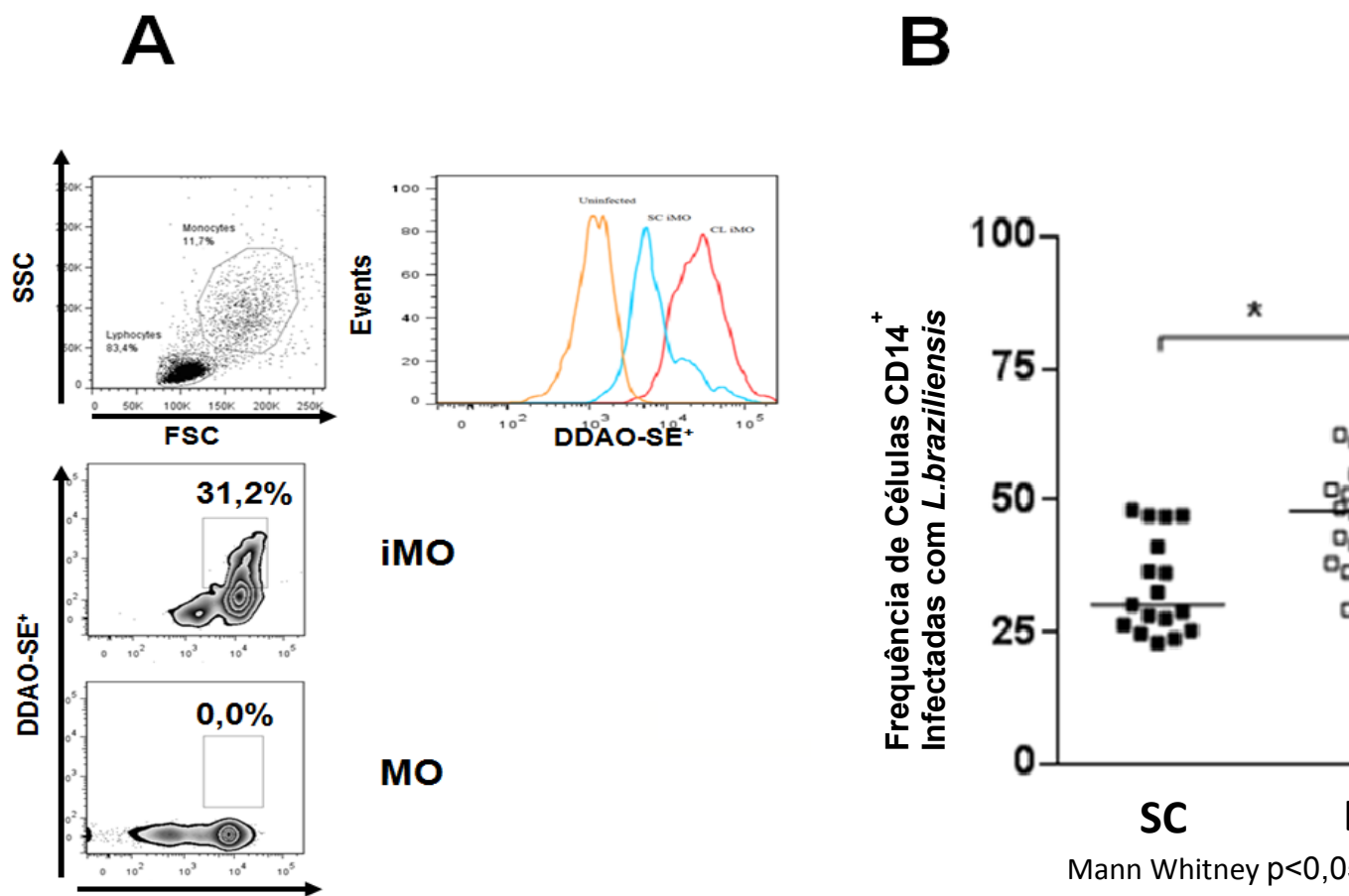


Fig.3: **A)** Estratégia de análise por citometria de fluxo da frequência de células CD14⁺ infectadas com promastigotas de *L.braziliensis* marcadas com DDAO-SE. Células CD14⁺ obtidas por separação negativa com beads magnéticas de indivíduos SC (n=17) e pacientes com LC (n=20) co-cultivados com células T CD8⁺ autologas. A seleção de monócitos foi realizada por tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) e a população de células CD14⁺ infectadas foi avaliada pela expressão intracelular de DDAO-SE. Os histogramas mostram a quantidade de eventos CD14⁺DDAO-SE⁺ em um paciente com LC e em um indivíduo SC bem como células não infectadas (isotipo). **B)** Representação gráfica da frequência de células

CD14⁺ infectadas (DDAO-SE⁺) de indivíduos SC (■) e pacientes com LC (□). *p<0,05, teste Mann Whitney.

A infecção de monócitos também foi avaliada pela técnica de Cytospin, por contagem do número de células infectadas em 100 células, com resultados similares, SC (27% ± 10) e LC (49% ± 17) p<0,05, aos obtidos na citometria de fluxo.

8.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES E INDUTORES DE APOPTOSE EM MONÓCITOS APÓS CO-CULTURA COM LINFÓCITOS T CD8⁺ AUTÓLOGOS

8.5.1 Expressão de anexina V em monócitos (MO) e monócitos infectados (MOi) co-cultivados com linfócitos T CD8⁺ autólogos

Como descrito anteriormente no escopo deste trabalho, a expressão de Anexina V pode ser utilizada para discriminar células apoptóticas de células viáveis. Para avaliar se a capacidade citotóxica de células T CD8⁺ sobre monócitos diferia entre os dois grupos, a expressão de Anexina V foi avaliada em MO e MOi com *L. braziliensis*, não submetidas e submetidas à co-cultura com linfócitos T CD8⁺ autólogos.

A frequência de MOi apoptóticos na presença de células T CD8⁺ nos indivíduos SC (17 ± 13% [MOi+CD8⁺] versus 7 ± 7% [MO+CD8⁺]) e nos pacientes com LC (27 ± 2% [MOi+CD8⁺] versus 14 ± 6% [MO+CD8⁺]) foi maior quando comparada com a frequência em culturas sem linfócitos T CD8⁺, p<0.05. Um resultado importante foi a observação que o percentual de MOi

apoptóticos, em co-culturas com linfócitos T CD8⁺ autólogos foi maior em pacientes com LC (27.0 ± 2%) quando comparados com indivíduos SC (17.0 ± 13%), $p < 0.05$. Esses dados indicam que células TCD8⁺ são capazes de induzir apoptose em ambos os grupos e sugere que células TCD8⁺ de pacientes com LC apresentam características citotóxicas mais predominantes comparado com os indivíduos SC. Este caráter citotóxico das células T CD8⁺ de pacientes com LC pode estar relacionado à fase fenotípica de atividade da doença. A figura 4A representa a estratégia de seleção de monócitos por tamanho e granulosidade bem como os monócitos infectados com *L.braziliensis* marcadas com DDAO-SE. A figura 4B mostra histogramas representativos da expressão de Anexina V em células CD14⁺ não infectadas e infectadas de pacientes com LC sendo os dados da análise da frequência de monócitos apoptóticos, representados graficamente na figura 4C.

Figura 4:

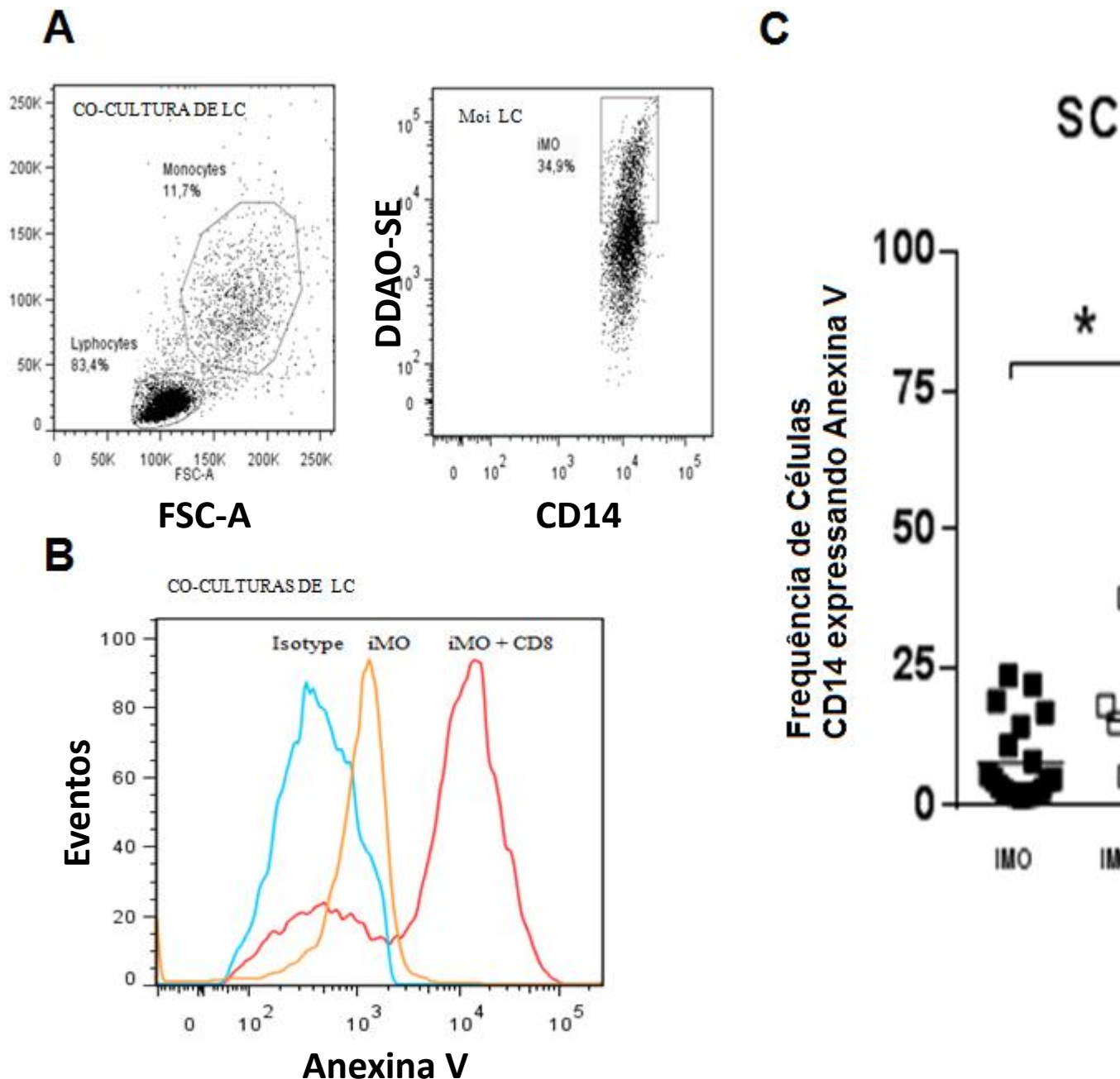


Fig.3: **A)** Estratégia de seleção de células CD14⁺ e CD8⁺ em 8 horas de co-cultura por citometria de fluxo e frequência de células CD14⁺ infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* marcadas com DDAO-SE. Células CD14⁺ e CD8⁺ foram obtidas por separação negativa com beads magnéticas de indivíduos SC (n=16) e pacientes com LC (n=18). **B)** Histogramas de células CD14⁺AnexinaV⁺ em monócitos infectados co-cultivados, não co-cultivados de um paciente com LC bem como células não infectadas (isotipo). **C)** Representação gráfica da frequência de células CD14⁺AnexinaV⁺ infectadas co-cultivadas ou não com linfócitos T CD8⁺ autólogos de indivíduos SC e pacientes com LC.*p<0,05, teste de Kruskal-Wallis.

8.5.2 Expressão de FasL em linfócitos T CD8⁺ co-cultivados com monócitos não infectados (MO) ou infectados com *L. braziliensis* (MOi).

As células T CD8⁺ ativadas são capazes de induzir citólise de células infectadas por duas vias distintas: expressão de FasL na superfície ou exocitose de grânulos, tais como granzimas A e B. Para avaliar os mecanismos envolvidos na citotoxicidade mediada por células T CD8⁺ foi avaliada a expressão de FasL e a produção de Granzima B por essas células.

A avaliação da expressão de FasL, determinada pela intensidade de fluorescência (MIF), em linfócitos T CD8⁺ está representada na figura 5.

A MIF da expressão de FasL em células TCD8⁺ co-cultivados com MO não demonstrou qualquer diferença significativa entre indivíduos SC (20 ± 5 MIF) e pacientes com LC (19 ± 6 MIF) $p > 0,05$. Os resultados da MIF da expressão de FasL em células T CD8⁺ após co-cultura com MOi não demonstraram diferenças estatística entre os grupos avaliados. A MIF da expressão de FasL nas células T CD8⁺ pós co-cultura com MOi foi de 26 ± 10 nos indivíduos SC e 26 ± 7 nos pacientes com LC ($p > 0,05$).

Estes resultados sugerem que a via Fas-FasL não está envolvida na citólise de monócitos infectados com *L. braziliensis*.

Figura 5:

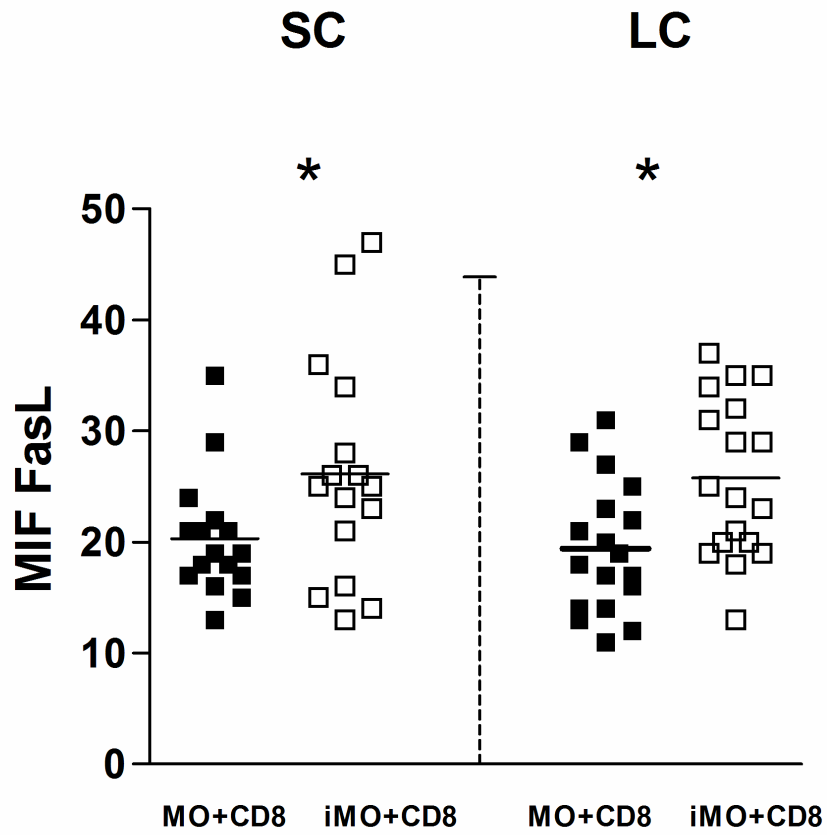


Fig.5: Representação gráfica da média de intensidade de fluorescência da expressão de FasL em células CD8⁺ após co-cultura de 8 horas com monócitos autólogos, não infectados e infectados com promastigotas de *L.braziliensis*, de indivíduos SC (■) (n=16) e pacientes com LC (□) (n=18). *p>0,05 teste de Mann Whitney.

8.5.3 Expressão de C 7.1^a (CD244) em linfócitos T CD8⁺

A expressão de FasL na superfície celular de linfócitos T CD8⁺ ocorre em sinergismo com a expressão de C7.1a (CD244), sendo que a expressão desta molécula na superfície celular (em células NK e linfócitos T CD8⁺) antecede a expressão de FasL. Utilizamos a análise da expressão de C7.1a como forma complementar para avaliar, precocemente, a capacidade de células T CD8⁺ em desempenhar possíveis efeitos apoptóticos em monócitos não infectados e infectados com *L. braziliensis*.

As células T CD8⁺ de indivíduos SC não sofreram alterações significativas na média da intensidade de fluorescência (MIF) de C7.1a, após co-cultura com MOi em relação às co-culturas com MO (21.6 ± 4.5 versus 17.0 ± 4.7 $p > 0,05$), e o mesmo foi observado nos pacientes com LC (27.6 ± 9.4 versus 21.1 ± 9.6 $p > 0,05$). Como C7.1a é um receptor de imunoglobulina e também desempenha papel importante na adesão celular, a diminuição da expressão dessa molécula poderia estar relacionada com um menor contato e consequentemente menor efeito citotóxico observado nas co-culturas de células provenientes de indivíduos SC. A comparação da MIF de C7.1a em células T CD8⁺, entre indivíduos SC e pacientes com LC não mostrou diferenças estatisticamente significantes em co-culturas com MO (17.0 ± 4.7 versus 21.1 ± 9.6 $p > 0,05$) e com iMO (21.6 ± 4.5 versus 27.6 ± 9.4 $p > 0,05$). Os resultados são apresentados graficamente na figura 6 que mostra a a MIF da expressão de C7.1a em co-culturas de células T CD8⁺ e monócitos infectados e não infectados.

Figura 6:

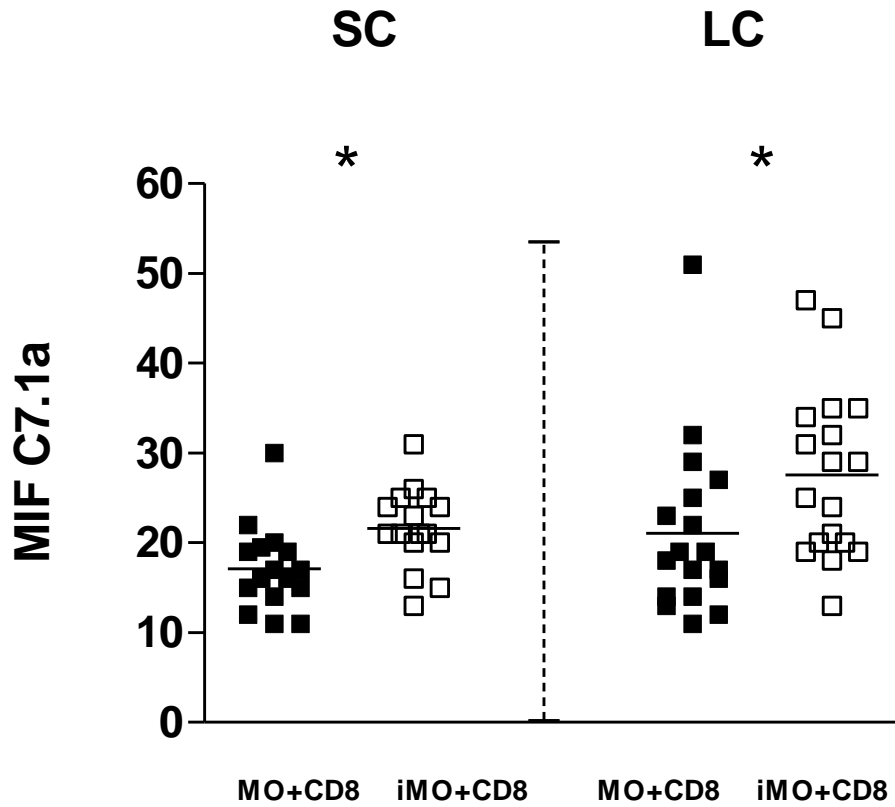


Fig.6: Representação gráfica da média da intensidade de fluorescência de C7.1a em células T CD8⁺ após co-cultura de 8 horas com monócitos autólogos não infectados e infectados com promastigotas de *L.braziliensis*, de indivíduos SC (■) (n=16) e pacientes com LC (□) (n=18). *p<0,05 teste de Mann Whitney.

8.6 AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS DE LINFÓCITOS T CD8⁺ SOBRE MONÓCITOS INFECTADOS COM *L. braziliensis*

Os efeitos citotóxicos causados pelas células T CD8⁺ na infecção por *L. braziliensis* podem contribuir para o controle da proliferação do parasita, disseminação do parasita (liberando amastigotas viáveis do interior de macrófagos infectados) e podem também contribuir para destruição tecidual. Para confirmar os efeitos citotóxicos das células T CD8⁺ antígeno específicas foi realizado o cálculo matemático do índice de citotoxicidade (previamente descrito em materiais e métodos) utilizando a expressão de Anexina V em células alvo infectadas com *L. braziliensis* e não infectadas co-cultivadas com linfócitos T CD8⁺. O cálculo representa a subtração da frequência de células alvo infectadas expressando Anexina V da frequência de células alvo não infectadas expressando Anexina V. O índice de citotoxicidade mostra a citólise específica de células infectadas (ligação Fas-FasL e degranulação inespecífica de grânulos de perforinas e granzimas) exercida pelos linfócitos T CD8⁺.

A avaliação dos efeitos citotóxicos de linfócitos T CD8⁺ sobre MOi demonstrou uma menor atividade citotóxica em indivíduos subclínicos comparados com pacientes com LC. O índice de citotoxicidade (I.C) apresentou valores de 5 ± 4 para preparações com células de indivíduos SC e 8 ± 5 para os pacientes com LC mostrando um maior efeito citotóxico, mediado por linfócitos T CD8⁺, sobre MOi de pacientes com LC comparados com indivíduos SC ($p < 0,05$). Os resultados relativos ao I.C são representados graficamente na figura 7.

Embora não fosse estatisticamente significativa, no grupo LC, houve uma diminuição na frequência de células T CD8⁺ expressando GrB em co-culturas com MOi em relação as co-culturas com MO. Adicionalmente, a frequência de células T CD8⁺ expressando GrB em co-culturas com monócitos não infectados foi maior no grupo LC (25 ± 6%) comparados com o grupo SC (11 ± 6%) (p<0,05), sugerindo que estes grânulos, contendo GrB, estão estocados em maior quantidade em células de pacientes com LC. Por outro a frequência de células T CD8⁺/GrB⁺ em co-culturas com monócitos infectados foi similar nos dois grupos avaliados (p>0,05). Os resultados relativos à expressão intracelular de GrB são representados graficamente na figura 8.

Figura 8:

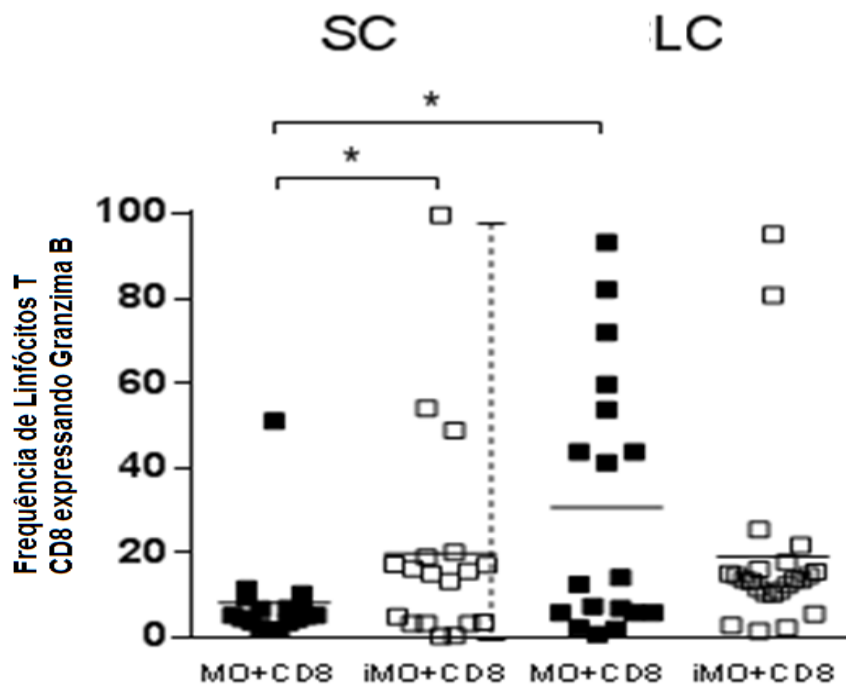


Fig.8: Representação gráfica da frequência de linfócitos T CD8⁺/GranzimaB⁺ após co-culturas com monócitos autólogos, não infectados e infectados com promastigotas de *L.braziliensis*, de indivíduos SC (■) (n=18) e pacientes com LC (□) (n=18). *p<0,05 teste de Mann Whitney.

8.7 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE GRANZIMA B NO SOBRENADANTE DE CO-CULTURAS DE MONÓCITOS INFECTADOS OU NÃO E LINFÓCITOS T CD8⁺

Para avaliar se após a infecção de monócitos haveria a liberação de Granzima B, contida nas células T CD8⁺, foi avaliada a produção dessa molécula no sobrenadante de co-culturas com monócitos não infectados e infectados com *L. braziliensis*. Os dados relevantes à concentração de granzima B em sobrenadantes das co-culturas são representados na figura 9.

Nas co-culturas de células T CD8⁺ com MOi do grupo de indivíduos SC, houve um aumento na produção de GrB (11 ± 6 pg/mL *versus* 25 ± 6 pg/mL, $p < 0,05$) em relação as co-culturas com monócitos não infectados. Um comportamento similar foi observado no grupo de pacientes com LC (26 ± 3 pg/mL *versus* 51 ± 5 pg/mL, $p < 0,05$). Essa observação sugere que a produção GrB é uma importante via envolvida na citólise de monócitos infectados com *L. braziliensis*. Foi observado também que a produção de GrB é maior em pacientes com LC (51.0 ± 4.9 pg/mL) quando comparado com os indivíduos SC (25.7 ± 2.7 pg/mL), $p < 0,05$. Estes resultados sugerem que esta molécula pode estar envolvida no desenvolvimento das lesões observadas em pacientes com LC.

Figura 9:

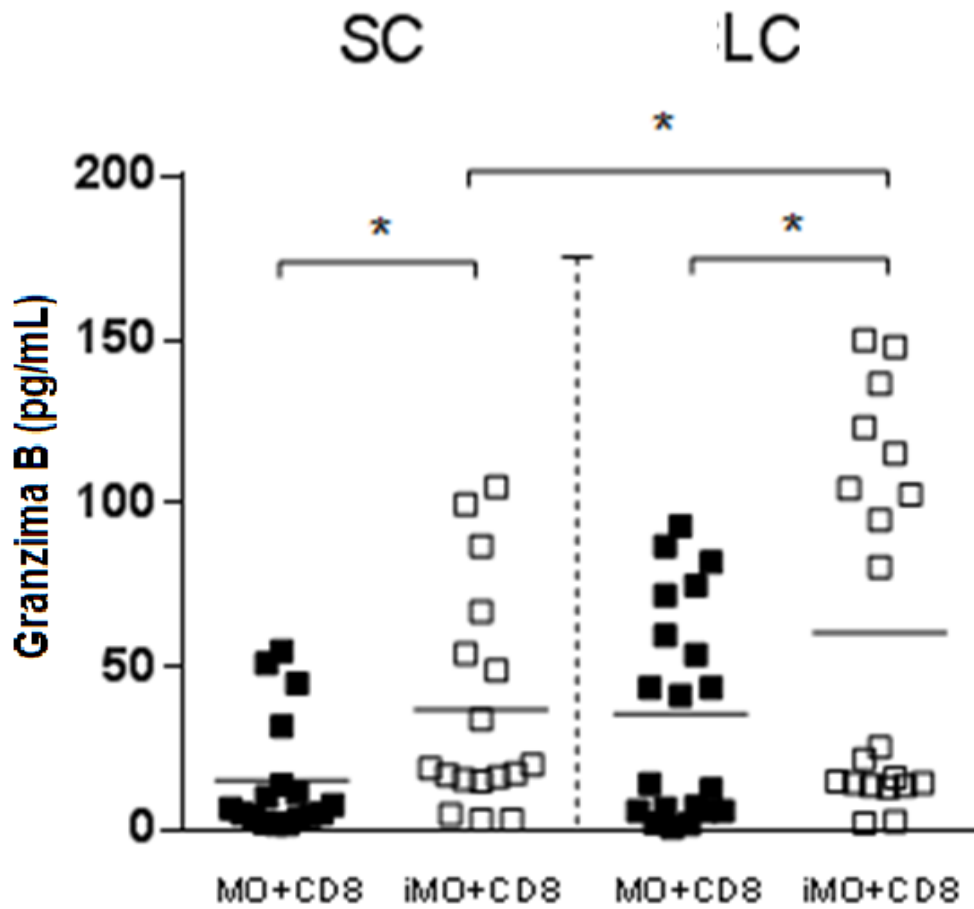


Figura 9: Produção de granzima B no sobrenadante de co-culturas de linfócitos T CD8⁺ com monócitos autólogos, não infectados e infectados com promastigotas de *L. braziliensis*, de indivíduos SC (■) (n=19) e pacientes com LC (□) (n=20). A determinação de granzima B nos sobrenadantes foi realizada por técnica de ELISA. *p<0,05 teste de Mann Whitney.

8.8 RECUPERAÇÃO DE PROMASTIGOTAS DE MONÓCITOS INFECTADOS SUBMETIDOS A CO-CULTURAS COM LINFÓCITOS T CD8⁺

Para demonstrar que linfócitos T CD8⁺ poderiam ter algum efeito leishmanicida ao exercer atividade citotóxica sobre monócitos infectados foi avaliada, mediante cultura do parasita, a capacidade de células T CD8⁺ autólogas em matar *L. braziliensis* fagocitadas pelos monócitos de indivíduos SC e de pacientes com LC.

Após as culturas de 1×10^4 MOi e MOi co-cultivados com células T CD8⁺ foram observados comportamentos diferentes quanto ao número de parasitas recuperados entre os dois grupos estudados.

A recuperação de *L. braziliensis* de monócitos infectados não submetidos a co-cultura com células T CD8⁺ não demonstrou qualquer diferença estatisticamente significativa entre os grupos dos indivíduos SC ($39 \pm 29 \times 10^4$ promastigotas/mL) e pacientes com LC ($94 \pm 77 \times 10^4$ promastigotas/mL) $p > 0,05$.

Nas co-culturas de monócitos infectados com a adição de células T CD8⁺, houve uma recuperação de promastigotas nas preparações dos indivíduos SC de $34 \pm 32 \times 10^4$ promastigotas/mL, comparadas com $85 \pm 63 \times 10^4$ promastigotas/mL nas preparações com células de pacientes com LC. Os resultados relativos à recuperação das promastigotas de *L. braziliensis* pós co-cultura estão apresentados na figura 10.

Figura 10:

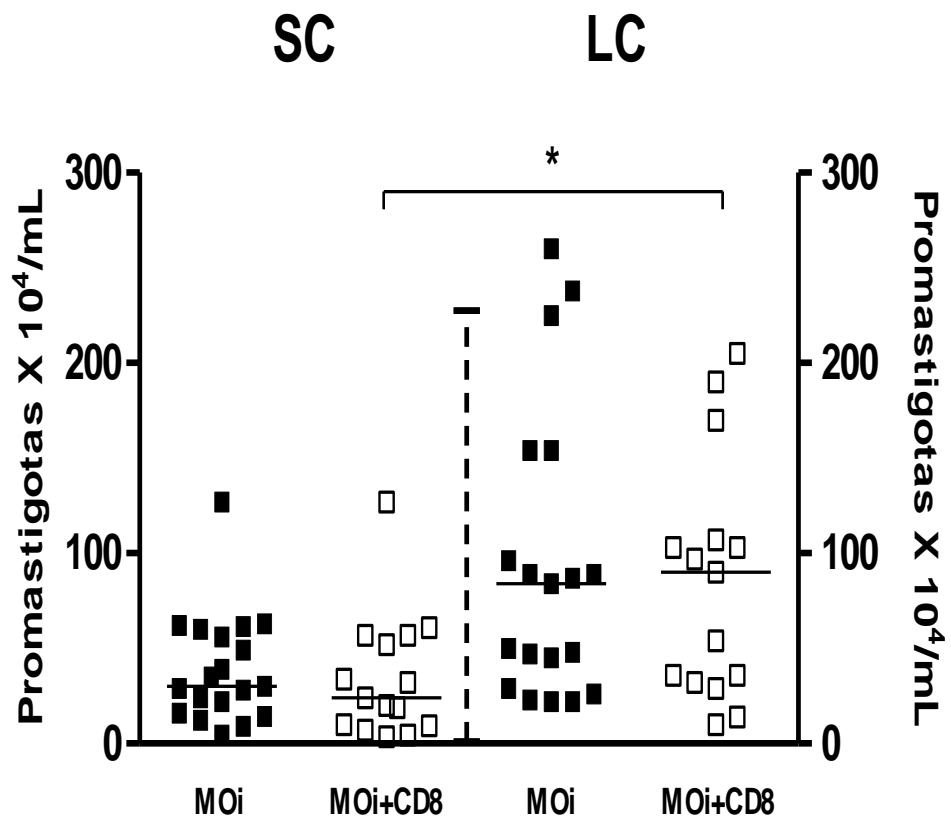


Fig.10: Recuperação de *L. braziliensis* de monócitos infectados co-cultivados com células T CD8⁺ e monócitos infectados em meio Schneider. O gráfico mostra os resultados representativos do grupo de indivíduos SC (■) (n=18) e pacientes com LC (□) (n=19). A contagem do número de leishmanias recuperadas foi realizada por microscopia ótica em câmara de Neubauer. *p<0,05, teste de Kruskal-Wallis.

9 DISCUSSÃO

Os indivíduos com infecção SC, causada por *L. braziliensis* são, geralmente, contatos domiciliares ou que vivem próximos de pacientes com LC e são reconhecidos por apresentar um teste cutâneo ao antígeno de *L. braziliensis* (Reação de Montenegro) positivo ou resposta *in vitro* das células T ao antígeno leishmania, mas não desenvolvem a doença. (Schnorr, Muniz et al. 2012). As CMSP desses indivíduos produzem pouco IFN- γ e TNF- α quando comparados com os pacientes com LC (Follador, Araujo et al. 2002). Até o momento não está claro porque esses indivíduos SC tem a capacidade de controlar a infecção.

O papel das células T CD8⁺ na patogênese da infecção *L. braziliensis* ainda não está bem esclarecido. Neste presente estudo, demonstrou-se que embora o número de células TCD8⁺ tenha sido semelhante entre os grupos SC e LC, as células T CD8⁺ de indivíduos com infecção SC são uma importante fonte de IFN- γ em comparação aos pacientes com LC, onde as células TCD4⁺ foram a principal fonte desta citocina. Esses achados também já foram observados na leishmaniose cutânea com cura espontânea, causada por *L. major*, cujo os pacientes presumivelmente eram protegidos de uma futura infecção, onde ambas as populações de células T, células CD4⁺ e células CD8⁺ foram responsáveis pela produção de IFN- γ antígeno específico (Nateghi Rostami, Keshavarz et al. 2010).

No presente estudo foi observado também que linfócitos T CD8⁺ de pacientes com LC produziram mais granzima B (GrB) e apresentaram maior atividade citotóxica sobre monócitos autólogos infectados comparados com os

linfócitos T CD8⁺ dos indivíduos SC. Em humanos, células T CD8⁺ são funcionalmente classificadas como inflamatórias (IFN- γ ⁺/Pfn⁻) e citotóxicas (IFN- γ ⁻/Pfn⁺) e estes diferentes fenótipos celulares podem estar envolvidos nas patologias causadas por microrganismos intracelulares (Sandberg, Fast et al. 2001). Esse duplo perfil de células T CD8⁺ é observado durante a infecção experimental com *Trypanosoma cruzi* onde o acúmulo de células T CD8⁺/IFN- γ ⁺ melhora a lesão no tecido cardíaco, e o enriquecimento com células TCD8⁺/Pfn⁺ agrava a destruição tecidual observada no coração dos animais (Silverio, Pereira et al. 2012). Como nos indivíduos SC, as células T CD8⁺ são a principal fonte de IFN- γ diferente do que é observado na LC e a produção de GrB é maior nesse grupo de pacientes, nossos resultados sugerem que os indivíduos SC apresentam um perfil mais protetor, enquanto as células T CD8⁺ dos pacientes com LC apresentam um perfil mais citotóxico, que estaria contribuindo para o desenvolvimento da lesão.

Múltiplos mecanismos podem estar envolvidos na resistência dos indivíduos SC à infecção por *L. braziliensis*. Demonstrou-se, recentemente, uma maior capacidade de macrófagos de indivíduos SC em matar *L. braziliensis* em comparação com os macrófagos de pacientes com LC e pacientes LM (Giudice, Vendrame et al. 2012). Na infecção causada por *L. panamensis* tem sido demonstrado que os macrófagos derivados de monócitos de indivíduos SC são menos permissivos à invasão ou fagocitose dos parasitas do que em pacientes com episódios recorrentes de LC (Bosque, Saravia et al. 2000).

Ao realizar a infecção e avaliarmos a penetração/fagocitose de *L. braziliensis* em monócitos, observou-se uma diminuição do número de

parasitas intracelulares em monócitos de indivíduos SC em comparação com monócitos de pacientes com LC. Previamente, um estudo do nosso grupo mostrou que após 96 horas, nos macrófagos infectados com *L. braziliensis* o número de parasitos intracelular foi menor em indivíduos SC quando comparado com macrófagos de pacientes com LC, sugerindo uma maior capacidade de macrófagos de SC para matar o parasito (Giudice, Vendrame et al. 2012). Como no presente estudo a avaliação foi realizada com os mesmos indivíduos SC do estudo de Giudice, 2012, podemos inferir que realmente monócitos/macrófagos desses indivíduos são menos susceptíveis à infecção com *L. braziliensis* ou parecem ter maior capacidade em matar o parasito que as células de pacientes com LC.

No presente estudo, avaliamos também a citotoxicidade mediada por células T CD8⁺ e seus efeitos sobre monócitos infectados com *L. braziliensis*. Previamente Brodskyn e Col. mostraram que a citotoxicidade mediada por células T CD8⁺, avaliada pela lise de células alvo, foi maior em pacientes com LM comparados com células de pacientes com LC (Brodskyn, Barral et al. 1997), o que sugere que a citotoxicidade pode estar envolvida na gravidade da leishmaniose tegumentar. A expressão de TLA-1, uma molécula associada com citotoxicidade, foi documentada em lesões de pacientes com LC, porém o papel desta molécula na proteção ou na patologia da leishmaniose não é claro (Costa, Gollob et al. 2003).

Mais recentemente, comparando o infiltrado inflamatório de pacientes com LC recente (LCR), quando ainda não há o aparecimento das lesões cutâneas, com as lesões clássicas da doença (LC), observou-se um aumento no número de células T CD8⁺ nas lesões de LC quando comparado com as

lesões de LCR. Além disso, células T CD8⁺ de pacientes com doença cutânea ativa expressaram mais granzima A do que células T CD8⁺ de pacientes com LCR, sugerindo a participação destes linfócitos no desenvolvimento das lesões na LC (Faria, Souza et al. 2009).

Nossos dados estendem essas observações não só comparando pacientes com LC com indivíduos com infecção SC, mas também avaliando diferentes mecanismos de citotoxicidade. Neste estudo mostramos que, após a exposição de monócitos infectados com *L. braziliensis* a células T CD8⁺ autólogas de pacientes com LC, havia mais células alvo apoptóticas comparadas às co-culturas de monócitos infectados e células T CD8⁺ de indivíduos com infecção SC, sugerindo que células T CD8⁺ de pacientes com LC ou são mais citotóxicas que células T CD8⁺ de indivíduos SC ou uma maior apresentação antigênica feita por monócitos infectados dos pacientes LC poderia proporcionar uma maior proliferação de linfócitos T CD8⁺ antígeno específicas e conseqüentemente maior efeito citotóxico sobre as células infectadas.

Adicionalmente, o mecanismo de atividade das células T CD8⁺ também foi determinado. Uma importante via envolvida na apoptose de células é a via Fas-FasL. Neste estudo não foi observada uma diferença na expressão de FasL em células T CD8⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos subclínicos após co-cultura com monócitos não infectados e infectados com *L. braziliensis*. Esses resultados estão em acordo com o estudo de Ruiz, 2010, onde foi demonstrado que em LC causada por *L. mexicana* não houve diferença na expressão de FasL em experimentos de co-cultura de monócitos infectados e células T CD8⁺ (Hernandez-Ruiz, Salaiza-Suazo et al. 2010).

Um estudo anterior já havia demonstrado que em lesões ativas de LC causada por *L. major* havia uma maior expressão de FasL quando comparado com a expressão dessa molécula em lesões curadas. Ao mesmo tempo, foi observado um aumento nos níveis de FasL solúvel em sobrenadantes de CMSP dos pacientes com LC estimuladas com o parasito (Eidsmo, Nylen et al. 2005). No presente estudo, embora não tenha sido observada uma diferença na expressão desse marcador entre os dois grupos, não podemos excluir que essa molécula, na forma de FasL solúvel, tenha sido secretada e por isso tenha uma menor expressão nas células T CD8⁺ de pacientes com LC.

Para confirmar a capacidade das T CD8⁺ antígeno específicas em exercer citotoxicidade sobre células alvo (monócitos infectados com *L. braziliensis*) foi realizado o cálculo do índice de citotoxicidade (IC). O IC foi maior no grupo LC quando comparado com o grupo SC, confirmando os resultados anteriores de uma maior expressão de anexina V em células alvo infectadas de pacientes com LC comparada com a expressão dessa molécula nas células infectadas dos indivíduos SC.

Os linfócitos T CD8⁺ podem exercer citólise de células infectadas também através de exocitose de grânulos citotóxicos contendo granzimas, granulolisinas e perforina (Pfn) (Pipkin and Lieberman 2007). No presente estudo foi avaliada a produção de granzima B intracelular e no sobrenadante dos experimentos de co-cultura. Foi observado que a infecção de monócitos aumentava a frequência de células T CD8⁺ expressando GrB⁺ no grupo dos SC e que no grupo LC nos monócitos não infectados a frequência de células T CD8⁺ expressando GrB⁺ era maior quando comparado ao grupo SC, sugerindo que estes grânulos, contendo GrB estão mais estocados em linfócitos T CD8⁺,

e conseqüentemente um maior aporte de GrB pode ser liberado dessas células no grupo LC.

Embora não fosse estatisticamente significativa, no grupo LC, a infecção dos monócitos diminuiu a frequência de células T CD8⁺/GrB⁺. Esses resultados estão de acordo com os achados recentes (Santos, Boaventura et al. 2013) que mostraram que em pacientes com LC, a infecção de monócitos com *L. braziliensis* co-cultivados com linfócitos T CD8⁺ diminuiu a expressão intracelular de granzima B por essas células (Santos, Boaventura et al. 2013). Esses resultados também estão de acordo com a observação de Ruiz, 2010, onde foi demonstrado que em LC causada por *L. mexicana* há uma menor expressão de granzima B após co-cultura com monócitos infectados (Hernandez-Ruiz, Salaiza-Suazo et al. 2010). Essas observações sugerem que a produção GrB é uma importante via envolvida na citólise de monócitos infectados com *L. braziliensis*.

Ao avaliarmos se após a infecção de monócitos haveria liberação de granzima B contida nos grânulos nas células T CD8⁺, foi observado que após a infecção havia um aumento na liberação dessa molécula nos dois grupos, indicando que a infecção com o parasita induz a liberação dessa molécula. Entretanto essa liberação foi maior no grupo LC quando comparado com o grupo SC. Esses resultados estão de acordo com o encontrado na expressão intracelular de granzima B, onde há uma maior expressão dessa molécula nas co-culturas com monócitos não infectados e uma diminuição nas co-culturas com monócitos infectados, sugerindo que essa molécula estocada nos grânulos, é liberada após a infecção, principalmente no grupo de pacientes

com LC, sugerindo o papel de granzima B nos mecanismos de destruição tecidual observado na leishmaniose tegumentar humana.

Os nossos resultados da avaliação da viabilidade do parasita após a cocultura de monócitos infectados com as células T CD8⁺ não mostrou diferenças no grupo SC e no grupo LC. Foi observado um aumento no grupo LC quando comparado ao grupo SC, mas isso pode ser devido a uma maior penetração do parasito inicialmente nos monócitos de pacientes com LC em relação à penetração inicial nos monócitos dos indivíduos SC. De qualquer forma, Brodyskin e col, 2013 recentemente mostraram, utilizando o mesmo sistema, que a citotoxicidade mediada por células T CD8⁺ não contribui para a morte do parasito na LC (Santos, Boaventura et al. 2013).

Outros estudos prévios têm mostrado a presença de células T citotóxicas em lesões de pacientes com LC (Machado, Kanitakis et al. 2002) (Da-Cruz, Oliveira-Neto et al. 2010). Um estudo avaliando lesões recentes e lesões mais tardias de pacientes com LC mostrou que a intensidade do infiltrado inflamatório e a formação da lesão foi associada com o aumento do número de células T CD8⁺ expressando granzima A, outra molécula citotóxica contida nos grânulos das células T CD8⁺ (Faria, Souza et al. 2009). Outro estudo mostrou que a expressão de granzima A foi maior em lesões de pacientes com leishmaniose mucosa, a forma clínica mais grave da LTA onde é observada uma maior destruição tecidual, quando comparado com as lesões de pacientes com LC (Faria, Gollob et al. 2005; Faria, Souza et al. 2009).

Embora seja claro que as células T CD8⁺ estão associadas com a patogênese da LC, a possibilidade de que no indivíduo SC, as células T CD8⁺ podem desempenhar um papel protetor ainda necessita ser mais avaliado.

Mais recentemente, em um modelo de vacinação experimental contra *Leishmania (Viannia)*, utilizando um ligante de Toll-like receptors 1 e 2 como adjuvante e um antígeno de leishmania, os animais foram protegidos. Essa proteção foi dependente de células TCD8⁺ de memória e da produção de IFN- γ (Jayakumar, Castilho et al. 2011).

Os resultados desse estudo sugerem que através de uma maior atividade citotóxica (um maior índice de citotoxicidade, uma maior expressão e maior produção de granzima B) nos pacientes com LC, as células T CD8⁺ tem um papel importante no desenvolvimento da lesão na leishmaniose tegumentar. E mais importante, esses resultados sugerem que em indivíduos igualmente expostos à infecção por *L. braziliensis* e que não desenvolvem a infecção, (indivíduos SC), essas células parecem ter um papel protetor, desde quando é a principal fonte produtora de IFN- γ , a principal citocina ativadora de macrófago para eliminar o parasito. Entretanto, já está bem documentado que uma produção exagerada de citocinas inflamatórias, como por exemplo, IFN- γ , está associada com o desenvolvimento da lesão na LC e na LM (Bacellar, Lessa et al. 2002; Faria, Gollob et al. 2005).

Embora os mecanismos imunológicos envolvidos na proteção contra o desenvolvimento da lesão nos indivíduos SC ainda não estão totalmente elucidados, os resultados desse estudo poderão contribuir para esclarecer como células T CD8⁺ podem também participar da proteção contra a infecção com *L. braziliensis*.

10 RESUMO DOS RESULTADOS

Os principais e mais relevantes resultados encontrados neste estudo sobre o papel das células T CD8⁺ na LC e infecção SC causada por *L. braziliensis*, estão nesta sessão sumarizados:

1) Embora não fosse observada diferença na frequência de células T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico nos dois grupos, a frequência de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ , em cultura de CMSP estimuladas com SLA, foi maior em indivíduos SC comparados com pacientes com LC, demonstrando que linfócitos T CD8⁺ são uma fonte importante da produção dessa citocina nos indivíduos SC.

2) Monócitos de pacientes com LC são mais permissivos à infecção comparados com os monócitos dos indivíduos SC.

3) Após co-cultura de monócitos infectados com linfócitos T CD8⁺, observou-se uma maior apoptose das células alvo e maior índice de citotoxicidade em pacientes com LC quando comparado com indivíduos SC.

4) Células T CD8⁺ de pacientes com LC expressam e produzem mais granzima B comparados com os indivíduos SC.

11 CONCLUSÃO

Enquanto nos pacientes com leishmaniose cutânea os linfócitos T CD8⁺ parecem estar mais envolvidos nos mecanismos de citotoxicidade e conseqüentemente na destruição tecidual, nos indivíduos subclínicos, essas células parecem, através da produção de IFN- γ , participar mais no controle da infecção por *L. braziliensis*.

12 REFERÊNCIAS

- Alvar, J., I. D. Velez, et al. (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." PLoS One **7**(5): e35671.
- Antonelli, L. R., W. O. Dutra, et al. (2005). "Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis." Immunol Lett **101**(2): 226-230.
- Bacellar, O., H. Lessa, et al. (2002). "Up -regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." Infect Immun **70**(12): 6734 -6740.
- Bacellar, O., H. Lessa, et al. (2002). "Up -regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." Infect Immun **70**(12): 6734 -6740.
- Bafica, A., F. Oliveira, et al. (2003). "American cutaneous leishmaniasis unresponsive to antimonial drugs: successful treatment using combination of N-methylglucamine antimoniate plus pentoxifylline." Int J Dermatol **42**(3): 203 -207.
- Barral-Netto, M., A. Barral, et al. (1995). "Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **17**(1): 21 -28.
- Barral-Netto, M., A. Barral, et al. (1995). "Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **17**(1): 21 -28.
- Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, et al. (2002). "CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity." Nature **420**(6915): 502 -507.
- Belkaid, Y., E. Von Stebut, et al. (2002). "CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*." J Immunol **168**(8): 3992 -4000.
- Bittencourt, A. L. and A. Barral (1991). "Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(1): 51 -56.
- Bogdan, C. (2008). "Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example." Cell Microbiol **10**(6): 1221 -1234.

- Bogdan, C., M. Rollinghoff, et al. (2000). "Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity." Curr Opin Immunol **12**(1): 64 -76.
- Bomfim, G., C. Nascimento, et al. (1996). "Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis." Exp Parasitol **84**(2): 188 -194.
- Bosque, F., N. G. Saravia, et al. (2000). "Distinct innate and acquired immune responses to Leishmania in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to L. (Viannia) panamensis infection." Scand J Immunol **51**(5): 533 -541.
- Bottrel, R. L., W. O. Dutra, et al. (2001). "Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **69**(5): 3232 -3239.
- Boussofara, T., H. Louzir, et al. (2004). "Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of Leishmania-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis." J Infect Dis **189**(7): 1265 -1273.
- Brodskyn, C. I., A. Barral, et al. (1997). "Parasite -driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis." J Immunol **159**(9): 4467 -4473.
- Brodskyn, C. I., A. Barral, et al. (1997). "Parasite -driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis." J Immunol **159**(9): 4467 -4473.
- Carvalho, E. M., O. A. Bacellar, et al. (1988). "Visceral leishmaniasis: a disease associated with inability of lymphocytes to activate macrophages to kill leishmania." Braz J Med Biol Res **21**(1): 85 -92.
- Carvalho, E. M., A. Barral, et al. (1994). "Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis." Acta Trop **56**(4): 315-325.
- Carvalho, L. P., S. Passos, et al. (2007). "Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis." Parasite Immunol **29**(5): 251 -258.

- Carvalho, L. P., S. Passos, et al. (2012). "Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis." Front Immunol **3**: 301.
- Chavez-Galan, L., M. C. Arenas-Del Angel, et al. (2009). "Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes." Cell Mol Immunol **6**(1): 15 -25.
- Costa, R. P., K. J. Gollob, et al. (2003). "Adhesion molecule expression patterns indicate activation and recruitment of CD4+ T cells from the lymph node to the peripheral blood of early cutaneous leishmaniasis patients." Immunol Lett **90**(2 -3): 155 -159.
- Courret, N., C. Frehel, et al. (2002). "Biogenesis of Leishmania -harbouring parasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites." J Cell Sci **115**(Pt 11): 2303 -2316.
- Da-Cruz, A. M., A. L. Bertho, et al. (2005). "Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions." Br J Dermatol **153**(3): 537 -543.
- Da-Cruz, A. M., F. Conceicao-Silva, et al. (1994). "Leishmania -reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **62**(6): 2614 -2618.
- Da-Cruz, A. M., F. Conceicao-Silva, et al. (1994) . "Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **62**(6): 2614 -2618.
- Da-Cruz, A. M., M. P. de Oliveira, et al. (1996). "Tumor necrosis factor -alpha in human american tegumentary leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **91**(2): 225 -229.
- Da-Cruz, A. M., M. P. de Oliveira, et al. (1996). "Tumor necrosis factor -alpha in human american tegumentary leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **91**(2): 225 -229.
- Da-Cruz, A. M., M. P. Oliveira-Neto, et al. (2010). "T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions." J Invest Dermatol **130**(5): 1329 - 1336.

- Derby, E., V. Reddy, et al. (2001). "Flow cytometric assay for the simultaneous analysis of cell-mediated cytotoxicity and effector cell phenotype." Biotechniques **31**(3): 660, 664 -665.
- Derby, E., V. Reddy, et al. (2001). "Three -color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity." Immunol Lett **78**(1): 35 -39.
- Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." Clin Dermatol **14**(5): 417 -423.
- Eidsmo, L., S. Nylen, et al. (2005). "The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during Leishmania major-induced cutaneous Leishmaniasis." Am J Pathol **166**(4): 1099 -1108.
- Faria, D. R., K. J. Gollob, et al. (2005). "Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis." Infect Immun **73**(12): 7853 -7859.
- Faria, D. R., P. E. Souza, et al. (2009). "Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **31**(8): 432 -439.
- Follador, I., C. Araujo, et al. (2002). "Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of Leishmania braziliensis infection." Clin Infect Dis **34**(11): E54 -58.
- Follador, I., C. Araujo, et al. (2002). "Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of Leishmania braziliensis infection." Clin Infect Dis **34**(11): E54 -58.
- Follador, I., C. Araujo, et al. (2002). "Immune responses to an inactive vaccine against American cutaneous leishmaniasis together with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor." Vaccine **20**(9 -10): 1365-1368.
- Gaafar, A., B. Veress, et al. (1999). "Characterization of the local and systemic immune responses in patients with cutaneous leishmaniasis due to Leishmania major." Clin Immunol **91**(3): 314 -320.

- Giudice, A., C. Vendrame, et al. (2012). "Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with *Leishmania braziliensis* infection." BMC Infect Dis **12**: 75.
- Gollob, K. J., L. R. Antonelli, et al. (2008). "Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology." Int Immunopharmacol **8**(10): 1338 -1343.
- Gomes-Silva, A., R. de Cassia Bittar, et al. (2007). "Can interferon γ and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?" Clin Exp Immunol **149**(3): 440 -444.
- Grimaldi, G., Jr. and R. B. Tesh (1993). "Leishmaniasis of the New World: current concepts and implications for future research." Clin Microbiol Rev **6**(3): 230 -250.
- Grimaldi, G., Jr., R. B. Tesh, et al. (1989). "A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World." Am J Trop Med Hyg **41**(6): 687 -725.
- Handman, E. (1999). "Cell biology of *Leishmania*." Adv Parasitol **44**: 1-39.
- Heinzel, F. P., M. D. Sadick, et al. (1989). "Reciprocal expression of interferon γ or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets." J Exp Med **169**(1): 59 -72.
- Hepburn, N. C. (2003). "Cutaneous leishmaniasis: an overview." J Postgrad Med **49**(1): 50 -54.
- Herath, S., P. Kropf, et al. (2003). "Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN- γ production by CD4(+) T cells." Parasite Immunol **25**(11 -12): 559 -567.
- Hernandez-Ruiz, J., N. Salaiza-Suazo, et al. (2010). "CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists." PLoS Negl Trop Dis **4**(11): e871.

- Hill, J. O., M. Awwad, et al. (1989). "Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against Leishmania." J Exp Med **169**(5): 1819 - 1827.
- Hotez, P. J., M. E. Bottazzi, et al. (2008). "The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination." PLoS Negl Trop Dis **2**(9): e300.
- Jayakumar, A., T. M. Castilho, et al. (2011). "TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA -MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against Leishmania (Viannia)." PLoS Negl Trop Dis **5**(6): e1204.
- Jirmanus, L., M. J. Glesby, et al. (2012). "Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of Leishmania (Viannia) braziliensis transmission over a 20 -year period." Am J Trop Med Hyg **86**(3): 426 -433.
- Jones, T. C., W. D. Johnson, Jr., et al. (1987). "Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to Leishmania braziliensis braziliensis." J Infect Dis **156**(1): 73 -83.
- Khamesipour, A., M. Nateghi Rostami, et al. (2012). "Phenotyping of circulating CD8(+) T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis." Microbes Infect **14**(9): 702-711.
- Lainson, R., L. Ryan, et al. (1987). "Infective stages of Leishmania in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission." Mem Inst Oswaldo Cruz **82**(3): 421 -424.
- Laskay, T., G. van Zandbergen, et al. (2003). "Neutrophil granulocytes--Trojan horses for Leishmania major and other intracellular microbes?" Trends Microbiol **11**(5): 210 -214.
- Lessa, H. A., P. Machado, et al. (2001). "Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony." Am J Trop Med Hyg **65**(2): 87 -89.

- Lessa, H. A., P. Machado, et al. (2001). "Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony." Am J Trop Med Hyg **65**(2): 87 -89.
- Lessa, M. M., H. A. Lessa, et al. (2007). "Mucosal leishmaniasis: epidemiological and clinical aspects." Braz J Otorhinolaryngol **73**(6): 843-847.
- Liew, F. Y. and F. E. Cox (1991). "Nonspecific defence mechanism: the role of nitric oxide." Immunol Today **12**(3): A17 -21.
- Lopez, J. A., J. H. LeBowitz, et al. (1993). "Leishmania mexicana promastigotes induce cytotoxic T lymphocytes in vivo that do not recognize infected macrophages." Eur J Immunol **23**(1): 217 -223.
- Machado, P., J. Kanitakis, et al. (2002). "Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis." Eur J Dermatol **12**(5): 449 -451.
- Malherbe, L., C. Filippi, et al. (2000). "Selective activation and expansion of high-affinity CD4+ T cells in resistant mice upon infection with Leishmania major." Immunity **13**(6): 771 -782.
- Marsden, P. D. (1990). "Cutaneous leishmaniasis." Bmj **300**(6741): 1716 -1717.
- Marsden, P. D. (1990). "Leishmaniasis." Bmj **300**(6725): 666 -667.
- Marsden, P. D. (1990). "Mucocutaneous leishmaniasis." Bmj **301**(6753): 656-657.
- Marsden, P. D. (1994). "Mucosal leishmaniasis due to Leishmania (Viannia) braziliensis L(V)b in Tres Bracos, Bahia -Brazil." Rev Soc Bras Med Trop **27**(2): 93 -101.
- Marsden, P. D., E. M. Netto, et al. (1986). "Apparent cure of a difficult treatment problem in a patient with mucosal leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **35**(2): 449.
- Marsden, P. D., M. S. Tada, et al. (1984). "Spontaneous healing of Leishmania braziliensis braziliensis skin ulcers." Trans R Soc Trop Med Hyg **78**(4): 561 -562.
- Mendes, D. S., M. L. Dantas, et al. (2013). "Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4+, CD20+, CD68+, CD31+ and vW+ cells in

- non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **108**(1): 18 -22.
- Morgado, F. N., A. Schubach, et al. (2008). "Is the in situ inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis?" Br J Dermatol **158**(1): 50 -58.
- Muller, I., U. Fruth, et al. (1992). "Immunobiology of experimental leishmaniasis." Med Microbiol Immunol **181**(1): 1 -12.
- Muller, I., T. Pedrazzini, et al. (1991). "Establishment of resistance to *Leishmania major* infection in susceptible BALB/c mice requires parasite-specific CD8+ T cells." Int Immunol **3**(6): 587 -597.
- Murray, H. W., B. Y. Rubin, et al. (1983). "Killing of intracellular *Leishmania donovani* by lymphokine-stimulated human mononuclear phagocytes. Evidence that interferon-gamma is the activating lymphokine." J Clin Invest **72**(4): 1506 -1510.
- Naderer, T. and M. J. McConville (2011). "Intracellular growth and pathogenesis of *Leishmania* parasites." Essays Biochem **51**: 81-95.
- Nateghi Rostami, M., H. Keshavarz, et al. (2010). "CD8+ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **4**(10): e845.
- Novoa, R., O. Bacellar, et al. (2011). "IL -17 and Regulatory Cytokines (IL -10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection." Parasite Immunol **33**(2): 132-136.
- Pipkin, M. E. and J. Lieberman (2007). "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works." Curr Opin Immunol **19**(3): 301 -308.
- Reed, S. G., R. Badaro, et al. (1986). "Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **35**(1): 79 -85.
- Reed, S. G., R. Badaro, et al. (1986). "Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis." Am J Trop Med Hyg **35**(1): 79 -85.
- Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis." Braz J Med Biol Res **31**(1): 143 -148.

- Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis." Braz J Med Biol Res **31**(1): 143 - 148.
- Ruiz, J. H. and I. Becker (2007). "CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **29**(12): 671 -678.
- Sandberg, J. K., N. M. Fast, et al. (2001). "Functional heterogeneity of cytokines and cytolytic effector molecules in human CD8+ T lymphocytes." J Immunol **167**(1): 181 -187.
- Santos, C. D., V. Boaventura, et al. (2013). "CD8(+) Granzyme B(+) - Mediated Tissue Injury vs. CD4(+)IFN γ (+) -Mediated Parasite Killing in Human Cutaneous Leishmaniasis." J Invest Dermatol.
- Santos Cda, S., V. Boaventura, et al. (2013). "CD8(+) granzyme B(+) - mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+) -mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis." J Invest Dermatol **133**(6): 1533-1540.
- Schnorr, D., A. C. Muniz, et al. (2012). "IFN γ production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to L. braziliensis infection." PLoS Negl Trop Dis **6**(12): e1947.
- Scott, P., D. Artis, et al. (2004). "The development of effector and memory T cells in cutaneous leishmaniasis: the implications for vaccine development." Immunol Rev **201**: 318-338.
- Silverio, J. C., I. R. Pereira, et al. (2012). "CD8+ T γ -cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental Trypanosoma cruzi-elicited cardiomyopathy." PLoS Pathog **8**(4): e1002645.
- Smith, L. E., M. Rodrigues, et al. (1991). "The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages." J Exp Med **174**(3): 499-505.
- Stager, S., J. Alexander, et al. (2003). "Both interleukin γ (IL γ) and IL γ receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity." Infect Immun **71**(8): 4804-4807.

- Stefani, M. M., I. Muller, et al. (1994). "Leishmania major -specific CD8+ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages." Eur J Immunol **24**(3): 746 -752.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735 - 747.
- Tsagozis, P., E. Karagouni, et al. (2003). "CD8(+) T cells with parasite - specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis." Parasite Immunol **25**(11 -12): 569 -579.
- Tsagozis, P., E. Karagouni, et al. (2005). "Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis." Parasitol Int **54**(2): 139 -146.
- Uzonna, J. E., K. L. Joyce, et al. (2004). "Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells." J Exp Med **199**(11): 1559-1566.
- Vaidya, S. V. and P. A. Mathew (2006). "Of mice and men: different functions of the murine and human 2B4 (CD244) receptor on NK cells." Immunol Lett **105**(2): 180 -184.

13 ANEXO

13.1 ANEXO I

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Nome do Projeto: Papel dos Linfócitos T CD8⁺ na Infecção por *L. braziliensis*

Investigador Principal: Maria Olívia Amado Bacellar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia-Brazil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia. Tel: 71-3203-2740

NOME DO PACIENTE:

Número de Identificação no Projeto:

Convite e Objetivo:

Você é convidado (a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm leishmaniose cutânea e leishmaniose mucosa ou se mantêm infectadas com a leishmania sem apresentar doença. Além das informações aqui presentes você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico. Caso decida participar do estudo você será solicitado (a) assinar este formulário de consentimento.

Participação voluntária: A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento caso você tenha a doença cutânea ou mucosa. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você. Participando ou não do estudo você receberá o medicamento utilizado para o tratamento da leishmaniose (Glucantime®) se estiver doente.

Finalidade do estudo: Este estudo vai estudar como o seu corpo se defende quando atacado pela leishmania. Para isto estudaremos o seu sangue, o parasito que causa a doença quando este for isolado, e caso esteja doente também o material da ferida obtida pela retirada de um pequeno pedaço da sua pele.

Procedimentos: Caso você concorde em participar do estudo, além de ser examinado por um médico clínico, realizar biópsia da lesão caso apresente ferida na pele ou mucosa, teste intradérmico e tirar 5ml de sangue para sorologia, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Você doará 30 a 50ml de sangue (mais ou menos 2 colheres de sopa)

para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo. A retirada do pedaço da pele ou da ferida do nariz para o diagnóstico da sua doença, caso necessário, será feita com anestesia para você não sentir dor e parte deste material será utilizado para os estudos da defesa do seu corpo contra a leishmaniose. Caso o diagnóstico de leishmaniose não seja confirmado, todo o material obtido para pesquisa será destruído.

Duração do estudo: Após a assinatura do termo de consentimento e avaliação diagnóstica sua participação no estudo acabará em 2 ou 3 dias. Caso se constate que você tem a doença leishmaniose, todo mês você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de nova série de Glucantime® ou de outra medicação, que também lhe será fornecida gratuitamente. Isto não faz parte do estudo.

Confidencialidade: Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica. Você ou qualquer participante desse estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo.

Análises de riscos e benefícios: Caso esteja doente, o tratamento que você receberá (Glucantime®) é semelhante ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. Não existe nenhum procedimento adicional para os participantes do estudo, assim não existe também nenhum risco adicional para você.

Retorno de benefícios para o sujeito e para a sociedade: *As leishmanioses são doenças relacionadas à reação do seu organismo contra a leishmania e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle da leishmaniose.*

Custos: Você não terá custos com o tratamento com antimônio ou com outra droga para tratamento da leishmaniose caso haja necessidade de uso. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo.

Esclarecimentos: Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contatar um dos seguintes investigadores pelo telefone 71- 3237-7353: Dr. Edgar M. Carvalho, Dr. Paulo Machado e Dr. Luiz Henrique Guimarães. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário Professor Edgar Santos, cujo endereço encontra-se no início deste consentimento ou pelo telefone: 71-3203-2740

Consentimento: Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. A você será entregue uma cópia deste formulário para guardar.

- Sim, eu concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.
- Não, eu não concordo que a amostra de sangue e / ou pele possam ser guardadas para pesquisa no futuro.

Assinatura do Participante

Data

Hora

Assinatura da Testemunha

Data

Hora

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

Assinatura do pesquisador

Data

Hora

13.2 ANEXO II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18), PARA O ESTUDO DA RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

Projeto: Papel dos Linfócitos T CD8⁺ na Infecção por *L. braziliensis*

Investigador Principal: Maria Olívia Amado Ramos Bacellar, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160, Salvador-Bahia- Brazil.

Comitê de Ética: Maternidade Climério de Oliveira/UFBA-Rua Padre Feijó 240, Ambulatório Magalhães Neto, 3^o andar, Canela-Salvador-Bahia. Tel: 71-3203-2740

NOME DO PACIENTE: _____

Número de Identificação no Projeto: _____

Convite e objetivo: Você está sendo convidado a participar de um estudo científico. O propósito deste estudo é determinar as razões porque pessoas desenvolvem leishmaniose cutânea e mucosa. A principal doença que nós estudaremos é chamada leishmaniose, mas nós daremos atenção a outras infecções.

Nós perguntaremos a você sobre a sua saúde. Um médico fará exame físico em você, incluindo boca e nariz. Isto não causará dor em você. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de duas colheres de sopa ou uma xícara de café pequena) de seu braço usando uma seringa e agulhas descartáveis para realizar alguns exames que ajudarão a explicar a doença. Nós também iremos fazer um teste na pele, onde nós injetaremos uma pequena quantidade de líquido (duas gotas) no seu braço usando uma agulha fina. Se você tiver a ferida nós também vamos precisar remover um pequeno pedaço da pele ou do nariz para confirmar se você tem a doença. Isso será feito por um médico no posto de saúde, com anestesia local para evitar dor. Nós esperamos através deste estudo esclarecer mais sobre a doença, entendê-la e assim poderemos preveni-la no futuro.

Você pode não participar deste estudo. Se você quer nos ajudar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Assinatura ou impressão do paciente

Data

Hora

Assinatura ou impressão do responsável

Hora

Data

Testemunha

Hora

Data

COMPROMISSO DO PESQUISADOR

Discuti as questões acima apresentadas com os participantes do estudo ou com o seu representante legalmente autorizado. É minha opinião que o indivíduo entende os riscos, benefícios e direitos relacionados a este projeto.

Assinatura do pesquisador

Data

Hora

13.3 ANEXO III – PRODUÇÃO ACADEMICA

CD8⁺T cells in *L. braziliensis* infection may have cytotoxic and inflammatory properties

Short Title: Role of CD8⁺T cells in *L.braziliensis* infection

Thiago M. Cardoso¹, Álvaro Machado¹, Diego Costa², Adriano Queiroz¹, Phillip Scott³,
Edgar M. Carvalho^{1,2}, Olívia Bacellar^{1,2}.

1 Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil.

2 Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-CNPq)

3 Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

Corresponding author:

Olívia Bacellar

Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil, Tel.: 55 71 3237-7353/3339-6320

FAX: 55 71 3245-7110, e-mail: olivinhaufba@gmail.com

Artigo Submetido à Revista “ Infection and Immunity” IAI 00995-13

Protective and pathological functions of CD8⁺ T cells in *Leishmania braziliensis* infection

Thiago Marconi Cardoso (1,2), Álvaro Machado (1), Diego Luiz Costa (3), Adriano Queiroz (1,2), Paulo Machado (1,2), Edgar M. Carvalho (1,2), Olívia Bacellar (1, 2).

1. *Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA, Brazil*
2. *Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais - INCT-DT (CNPq/MCT), Salvador, BA, Brazil*
3. *Departamento de Farmacologia, Escola de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil*

Corresponding author:

Olívia Bacellar

Serviço de Imunologia

Hospital Universitário Prof. Edgard Santos

Universidade Federal da Bahia

Salvador, BA, Brazil

Tel.: 00 55 71 3237-7353/3339-6320

FAX: 00 55 71 3245-7110

e-mail: olivinhaufba@gmail.com

Abstract

Cutaneous leishmaniasis (CL) is caused by *L. braziliensis* and is characterized by a strong Th1 response that leads to the development of skin lesions. In areas endemic for *L. braziliensis* transmission, up to 15% of healthy subjects have test positive for delayed type hypersensitivity to soluble leishmania antigen (SLA) and are considered to have a sub-clinical infection (SC). SC subjects produce less IFN- γ and TNF- α than do CL patients but are able to control infection. The aim of this study was to characterize the role of CD8⁺T cells in SC and in CL. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were stimulated with SLA to determine CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ T cell counts by flow cytometry. Monocytes from PBMC were infected with *L. braziliensis* and co-cultured with CD8⁺T cells, and the frequencies of infected monocytes, cytotoxic markers and target cell apoptosis were subsequently examined with flow cytometry. Granzyme B levels were determined by ELISA. The frequency of CD8⁺IFN- γ ⁺ cells after SLA stimulation was greater ($p < 0.01$) in SC (26 \pm 10%) than in CL (10 \pm 5.0%). The frequency of infected monocytes in SC (34 \pm 9%) was lower than ($p < 0.05$) that in CL cells (47 \pm 10%). CL CD8⁺T cells exhibited more apoptosis of infected monocytes (27 \pm 2%) compared with SC CD8⁺T cells (17 \pm 13%, $p < 0.05$). Granzyme B production in CD8⁺T cells was higher in CL (51 \pm 5pg/mL) than in SC cells (26 \pm 3pg/mL). These data indicate that monocytes from SC individuals are less permissive to *L. braziliensis*. While SC CD8⁺T cells are predominantly inflammatory and may help control infection via IFN- γ production, CL CD8⁺T cells are more cytotoxic and may be involved in pathology.

Introduction

Leishmaniasis is caused by infection with parasites of the genus *Leishmania*. Leishmaniasis is a neglected tropical disease, 214,000 new cases of cutaneous leishmaniasis (CL) are reported annually worldwide, and the estimated incidence of leishmaniasis is 690,000-1,200,000 cases. Approximately 67,000 cases are reported in South America, Central America, and the Caribbean (Alvar, Velez et al. 2012). In mice, the majority of *Leishmania* specific CD4⁺T cells differentiate into T-helper (Th) 1 cell that secrete IFN- γ and contribute to the elimination of the parasite through the activation of macrophages. (Heinzel, Sadick et al. 1989; Malherbe, Filippi et al. 2000). Although protective immunity has predominantly been related to IFN- γ -producing CD4⁺T cells, infection with *Leishmania* also results in the activation and expansion of parasite specific CD8⁺T cells (Belkaid, Von Stebut et al. 2002),(Uzonna, Joyce et al. 2004).

Human CL caused by *Leishmania braziliensis* is characterized by a strong Th1 response with the production of high levels of IFN- γ and TNF- α (Bacellar, Lessa et al. 2002; Mendes, Dantas et al. 2013). This exaggerated Th1 response is associated with the development of lesions and the severity of the disease. (Bacellar, Lessa et al. 2002; Antonelli, Dutra et al. 2005; Faria, Gollob et al. 2005; Carvalho, Passos et al. 2007). In patients with CL caused by *L. braziliensis* there are greater of CD4⁺ than CD8⁺T cells, this ratio reaches equilibrium due to the increase in CD8⁺T cells that occurs during the healing process (Da-Cruz, Conceicao-Silva et al. 1994). The enrichment of *Leishmania*-reactive CD8⁺T cells in older lesions suggests that these cells may play a role in the healing process (Da-Cruz, Bertho et al. 2005). In contrast, other studies have associated CD8⁺T cell functions with pathology. For example, the cytotoxicity mediated by CD8⁺T cells is greater in mucosal leishmaniasis (ML), a more severe form of *L. braziliensis* infection, than in CL (Barral-Netto, Barral et al. 1995; Brodskyn, Barral et al. 1997). More recently, it has been shown that the frequency with which CD8⁺T cells express granzyme in the lesions of CL patients is greater than in patients in the early phase of CL (i.e., before the ulcer has developed) and that the frequency with which CD8⁺T cells express granzyme is directly associated with the intensity of the inflammatory reaction observed in CL

ulcers. (Faria, Souza et al. 2009; Santos Cda, Boaventura et al. 2013). This controversy regarding the role cytotoxicity in the pathogenesis of human leishmaniasis indicates that the functions of CD8⁺T cells in different clinical forms of leishmaniasis remain to be established.

Our studies have focused on diseases caused by *L. braziliensis*, the most important causal agent of American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) in South America. In areas of *L. braziliensis* transmission, CL represents more than 90% of the clinical forms of leishmaniasis (Jirmanus, Glesby et al. 2012). However, the ratio of infected individuals to those manifesting the disease is 3.7:1, indicating that the majority of subjects infected with *L. braziliensis* do not develop disease and are considered to have subclinical infections (SC) (Follador, Araujo et al. 2002). Individuals with SC infection are characterized by positive leishmania skin tests (LST), delayed-type hypersensitivity reactions to soluble leishmania antigen (SLA), or evidence of *in vitro* production of IFN- γ in cultures stimulated with SLA in the absence of active or past history of leishmaniasis (Schnorr, Muniz et al. 2012). These individuals produce less IFN- γ and less TNF- α than patients with CL (Follador, Araujo et al. 2002; Novoa, Bacellar et al. 2011). The mechanisms by which individuals with SC *L. braziliensis* infection achieve control over the infection are not currently understood. In this study, we evaluated whether CD8⁺T cells play a role in inducing protection or if they participate in lesion development in human *L. braziliensis* infection.

Materials and Methods

Patients

This study was performed in the village of Corte de Pedra, an endemic area of *L. braziliensis* transmission that is located in the state of Bahia, Brazil. Patients with CL (n=20) had typical ulcerative skin lesions, and diagnoses were made based on parasite detection from culture aspirates histopathology, or the presence of a typical CL lesion plus a positive LST. All patients with CL were evaluated before therapy. Household contacts of CL patients without active or past history of leishmaniasis with a positive LST and/or IFN- γ production in

lymphocyte culture stimulated with SLA were considered as having an SC infection (n=20). All participants provided informed consent, and the study followed the guidelines of the Ethical Committee of the Federal University of Bahia.

Parasite Culture and Antigen Preparation

The leishmania isolate (MHOM/BR/2003/LTCP15344) was obtained from a skin lesion of a CL patient and was characterized as *L. braziliensis*. This isolate was initially cultivated in biphasic medium (NNN) and, following isolation, the parasites were criopreserved in frozen nitrogen. After selection, the parasites were expanded in complete Schneider's medium, and SLA was prepared as previously described (Reed, Badaro et al. 1986).

Cell Separation and Frequency of CD4⁺ and CD8⁺T cells in CL patients and in SC individuals

The heparinized blood samples from CL patients and SC individuals were separated in Ficoll-Hypaque gradients (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were collected. For determination of the *ex vivo* frequency of CD4⁺ and CD8⁺T cells, PBMC were stained with PE-conjugated mouse anti-human CD3 and FITC-conjugated α -CD8 and α -CD4 (Sigma, St. Louis, MO, USA) and analyzed by FACS.

Intracellular Cytokine Staining

To determine the frequency of cells expressing cytokines, the PBMC were re-suspended in RPMI 1640 complete medium with 10% heat-inactivated human AB serum (Sigma, St Louis, MO) at a concentration of 5×10^5 cells/mL in polypropylene tubes and kept un-stimulated or were stimulated with SLA (5 μ g/ml) for 12 hours at 37°C, in 5% CO₂. After this period of culture, 10ng/mL of brefeldin A (Sigma, St. Louis, MO, USA) was added. Cells were then stained with FITC-conjugated mouse anti-human CD3 (clone SP34-2), APC-conjugated mAb α -CD8 (clone RPA-T8), PE-Cy5 mAb α -CD4 (clone RPA-T4), and APC-conjugated mAb α -CD14 (clone 61D3) (Sigma, St. Louis, MO, USA). These cells were also stained with the PE-

conjugated mouse antibodies anti-human IFN- γ (clone 4S.B3), anti-TNF- α (clone mAb11), anti-IL-10, and anti-CxCL-9 (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) using BD Cytotfix/Cytoperm solution according to the manufacturer's instructions (BD Biosciences, San Jose, CA, USA). A minimum of 50,000 gated events from each sample were collected in FACS Canto II (Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA) and analyzed using the FlowJo 7.6.5 program.

Cell Sorting

CD8⁺T cells were isolated from 1×10^7 PBMC/mL with a magnetic bead sorting system using the monoclonal anti-CD8 antibody according to the manufacturer's instructions (Dynabeads[®] Untouched[™] Human CD8 T Cells, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway). Monocytes (MO) were isolated from 5×10^6 PBMC/mL by magnetic beads (Dynabeads[®] Untouched[™] Human Monocytes, Invitrogen Dynal AS, Oslo, Norway) as previously described (Khamesipour, Nateghi Rostami et al. 2012). The process was performed twice, and these cells were washed with PBS and adjusted to a concentration of 1×10^6 MO/mL in complete RPMI.

The purity of the resulting cells was $83 \pm 0.9\%$ for CD8⁺T cells and $79 \pm 13.9\%$ for MO as analyzed by flow cytometry using specific FITC-mAb α -CD3 (clone SP34-2), PE- mAb α -CD4 (clone RPA-T4), PE-Cy5-mAb α -CD8 (clone RPA-T8) and APC-mAb α -CD14 (clone 61D3). Cell viability was $>90\%$ as determined by trypan blue exclusion.

Infection of Monocytes

Promastigotes in the stationary phase were adjusted to 1×10^7 /mL, labeled with DDAO-SE (CellTracer[™] FarRed, DDAO-SE Invitrogen[™] MOLECULAR PROBES[®]) according the manufactures' instructions, and then utilized for monocyte infection. Monocytes (1×10^6) were co-incubated with *L. braziliensis* promastigotes (5×10^6) in polypropylene tubes for 2 h at 37°C in 1mL RPMI 1640. Non-ingested promastigotes were washed away with complete RPMI. The

evaluation of infection was determined by cytometry and by microscopic evaluation of cytospin slides from 10 SC subjects and 10 CL patients.

Cytotoxicity Assay

The assay was performed as previously described (Derby, Reddy et al. 2001). Briefly, CD8⁺T cells plus uninfected monocytes (MO) or infected monocytes (iMOs) were mixed in co-culture in an effector:target cell ratio of 5:1 at 37°C in 5% CO₂ for 8 h in polypropylene tubes. After incubation, 5µL PE-mAb α-CD14 (clone 61D3; BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, Calif., USA) was added for 15 min at 4°C. Afterwards, 5µL of annexin V-FITC in annexin binding buffer 1X (BD) was added for 20 min. Samples were analyzed on a FACS Canto II flow cytometer (BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, Calif., USA). At least 50,000 gated events were collected and analyzed with FlowJo ThreeStar.

The PE-mAb α-FasL (clone L5178Y) and Alexa-Fluor 647-mAb α-GB (clone GB11; BD-Bioscience Pharmingen, San Jose, Calif., USA) were used to determine FasL and intracellular granzyme B expression in CD8⁺T cells.

Granzyme B measurement

Supernatants from co-cultures of cells from SC subjects and CL patients were collected after 8 hours, and granzyme B was determined by ELISA (BD Pharmingen and R&D Systems, Minneapolis, MN).

Statistical Analysis

The Mann-Whitney *U*-test was used to compare the frequencies of infected monocytes, cytotoxicity assays, granzyme B determination and the expression of apoptosis inducers after co-culture. The Kruskal-Wallis test with Dunn's post hoc test was used to analyze the results of apoptosis of iMOs after co-culture with CD8⁺T cells. The cut-off for statistical significance was

set at $p < 0.05$. Statistical analyses were performed using Grand Prism 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

Results:

CD8⁺T cells are the main source of IFN- γ in SC individuals

The frequencies of CD4⁺T cells and CD8⁺T cells were similar in the PBMCs from CL patients and SC subjects. CD4⁺T cells represented $48 \pm 10\%$ of lymphocytes in CL and $42 \pm 14\%$ in SC subjects, while the frequency of CD8⁺T cells was $20 \pm 6\%$ in CL and $18 \pm 5\%$ in SC subjects ($p > 0.05$). The FACS strategy used to evaluate cytokine expression in CD4⁺ and CD8⁺T cells is shown in figure 1A, and the frequencies of CD4⁺ and CD8⁺T cells expressing IFN- γ after stimulation with SLA are shown in figure 1B. The frequency of CD4⁺T cells expressing IFN- γ in unstimulated PBMCs was $2.6 \pm 1.3\%$ in SC and $2.4 \pm 1.9\%$ in CL samples, and the frequency of CD8⁺T cells expressing IFN- γ was $3.4 \pm 1.1\%$ in SC and $1.6 \pm 0.3\%$ in CL samples ($p < 0.05$, data not shown). After stimulation with SLA, CD8⁺T cells were the major source of IFN- γ in SC infection, whereas CD4⁺T cells were the main cellular producers of IFN- γ in CL patients (figure 1B). The frequency of CD4⁺T cells displaying IFN- γ in SC subjects ($7 \pm 2.5\%$) was lower than in CL patients ($19 \pm 4.9\%$), $p < 0.05$. In contrast the frequency of CD8⁺T cells producing IFN- γ in SC subjects ($26\% \pm 10.6\%$) was higher than that observed in CL patients ($10 \pm 5.0\%$) $p < 0.05$. These observations suggest that CD8⁺T cells from SC individuals have a predominant pro inflammatory profile compared to CD8⁺T cells from CL patients.

Monocytes from SC subjects are less susceptible to *L. braziliensis* infection

To assess the ability of CD8⁺T cells to mediate cytotoxicity in *L. braziliensis* infected monocytes, we performed co-culture experiments. We first infected monocytes with promastigotes and established that the optimal CD8:iMO ratio was 5:1 (data not shown). The FACS strategy for analysis of iMOs (double positive CD14⁺/DDAO-SE events) and the

frequencies of iMOs in SC individuals and CL patients are shown in figure 2. Notably, when monocytes were analyzed after 2 hours of exposure of *L. braziliensis*, we observed a lower frequency ($p<0.05$) of infected cells in SC group compared to the CL group. The frequency of iMOs in SC subjects ($34 \pm 9.2\%$) was lower ($p<0.05$) than the frequency of infected cells ($47 \pm 9.8\%$) in CL patients (figure 2B). We also determine the frequency of iMOs per 100 monocytes via counting by microscopy, and the percentage of infected monocytes in SC subjects ($27 \pm 10\%$) was lower than that in CL patients ($49 \pm 17\%$, $p<0.05$). These data indicate that monocytes from SC subjects are less permissive to leishmania infection than monocytes from CL patients. There were also lower numbers of amastigotes per 100 macrophages in samples from SC subjects ($p<0.05$) than in samples from CL patients (data not shown).

CD8⁺T cells induce more apoptosis in CL *L. braziliensis* infected monocytes

The FACS strategy and the frequencies of apoptotic cells, as measured by the expression of annexin V in iMOs and iMOs co-cultured with CD8⁺T cells are shown in figure 3A and 3B, respectively. The frequencies of apoptotic iMOs in samples from SC and CL patients in the absence or in the presence of CD8⁺T cells are shown in Figure 3B. The frequencies of apoptotic iMOs in the absence of CD8⁺T cells were $7 \pm 7\%$ in SC samples and $14 \pm 6\%$ in CL samples ($p>0.05$). In the presence of CD8⁺T cells, the percentages of apoptotic cells were $17 \pm 13\%$ in SC and $27 \pm 2,2\%$ in CL samples ($p<0.05$). These data indicate that CD8⁺T cells are able to induce apoptosis in both groups but suggest that cells from the SC individuals are less cytotoxic than the CD8⁺T cells from CL patients.

CD8⁺T cells are specifically cytotoxic to infected monocytes due to the production of granzyme B

Activated CD8⁺T cells are able to induce cytolysis of infected cells by two distinct molecular pathways: the granule exocytosis pathway or through the up-regulation of FasL, which can initiate programmed cell death. Efficient lysis by the granule exocytosis pathway requires delivery of perforin and granule enzymes, such as granzymes A and B (Chavez-Galan,

Arenas-Del Angel et al. 2009). To determine the pathway involved in the death of infected cells, we evaluated the expression of FasL and the production of granzyme B in CD8⁺T cells. The frequency of CD8⁺T cells expressing FasL was similar in co-cultures with MOs or iMOs across both groups. When MOs were co-cultured with CD8⁺T cells, the expression of FasL was 31 ± 23% in SC and 24 ± 25.7% in CL samples (p>0.05). For iMO co-cultured with CD8⁺T cells, the frequencies of CD8⁺T cells expressing FasL were 31 ± 23.7% in SC and 26 ± 19.5% in CL samples (p>0.05). These results suggest that the Fas-FasL pathway is not involved in the cytolysis of *L. braziliensis* infected monocytes. To evaluate whether the cytotoxicity was mediated by the release of granule enzymes, we evaluated the intracellular expression of granzyme B in CD8⁺T cells and the production of this molecule in the supernatants of the co-cultures. The frequency which CD8⁺T lymphocytes expressed granzyme B when co-cultured with MOs is shown in figure 4A. The frequency of cells expressing granzyme B in co-culture with MOs plus CD8⁺T was higher in CL (25 ± 5.7%) than in SC samples (11 ± 6.3%) (p<0.05), suggesting that this granule is stored in CL cells. However, in co-culture of iMOs and CD8⁺T cells, CD8⁺T cells expressing granzyme B was similar in the two groups (20 ± 10% in SC and 20 ± 17% in CL samples; p>0.05). To evaluate whether the decrease in the frequency of CD8⁺T cells expressing granzyme B after co-culture was due to the granzyme B production of CD8⁺T cells, we measured this molecule in the supernatants of co-cultures (figure 4B). The presence of iMOs in the cultures of CD8⁺T cells increased the production of granzyme B in the SC group (14 ± 6 pg/mL versus 25 ± 6 pg/mL, p<0.05) and in the CL group (26 ± 3 pg/mL versus 51 ± 5 pg/mL, p<0.05). These observations suggest that granzyme B production is an important pathway involved in the cytolysis of *L.braziliensis*-infected monocytes. Additionally, the production of granzyme B was lower in samples from SC individuals (25.7 ± 2.7 pg/mL) than in samples from CL patients (51.0 ± 4.9 pg/mL; p<0.05).

Discussion

The pathogenesis of human CL is not well understood. In *L. braziliensis* infection, patients develop a strong Th1 immune response and this exaggerated inflammatory response results in tissue damage (Carvalho, Passos et al. 2012). Both IFN- γ and TNF- α are highly produced in CL, but while IFN- γ may have a protective function (Santos Cda, Boaventura et al. 2013), there are many lines of evidence that support a role for TNF- α in the pathology of cutaneous and mucosal lesions (Da-Cruz, de Oliveira et al. 1996; Lessa, Machado et al. 2001; Faria, Gollob et al. 2005; Carvalho, Passos et al. 2007; Lessa, Lessa et al. 2007; Gollob, Antonelli et al. 2008). Little attention has been given to CD8⁺T cells in leishmaniasis. A few studies have evaluated the role of CD8⁺ T cells in the pathogenesis of CL (Santos Cda, Boaventura et al. 2013), but CD8⁺ T cell functions have not been determined in subjects with SC *L. braziliensis* infection. These individuals who are able to control leishmania without developing disease produce less IFN- γ and TNF- α compared with CL patients (Follador, Araujo et al. 2002; Novoa, Bacellar et al. 2011). Herein, we showed that, while CD8⁺T cells in SC infection are the major source of IFN- γ , the CD8⁺T cells from CL patients produced more granzyme B and had greater cytotoxic activity than the cells from SC samples. Moreover, we observed that monocytes from subjects with SC infection were less permissive to leishmania penetration than those from subjects with CL. These data argue for a key role of these cells in the control of leishmania infection in SC individuals and provide additional evidence supporting the role of CD8⁺T cells in the pathogenesis of CL ulcers.

CD4⁺T cells are the main source of IFN- γ in the initial phase of the disease caused by *L. braziliensis* (Bottrel, Dutra et al. 2001). Here, we showed that, rather than CD4⁺T cells, CD8⁺T cells are the main cellular producer of IFN- γ in subjects with SC infection. As IFN- γ is the major macrophage-activating cytokine, these data suggest that CD8⁺T cells may participate in the control of *L. braziliensis* in subjects with SC infection by producing IFN- γ . In an area of *L. major* transmission, the immune response of subjects with self-healing CL who are protected against further *Leishmania* infection is characterized not only by increases in antigen specific IFN-producing CD4⁺ Th1 cells but by IFN- γ -producing CD8⁺T cells (Nateghi Rostami,

Keshavarz et al. 2010). Recently, in BALB/c mice vaccinated with TLR ligands (DNA priming) plus TLR1 and TLR2 agonists as adjuvant, protection against *L.(V.) panamensis*, was found to be dependent on the memory of CD8⁺T cells and IFN- γ production (Jayakumar, Castilho et al. 2011). Indeed, in subjects immunized with a killed *L. amazonensis* vaccine, CD8⁺T cells compose the majority of responder cells after the *in vitro* stimulation PBMCs with *L. braziliensis* antigen. These data provide support for our findings of the possible participation of CD8⁺T cells in the prevention of the progression from infection to disease in SC subjects.

Macrophages play a central role in the pathogenesis of *Leishmania* infection (Bogdan 2008). We have previously shown that, while macrophages from both CL and ML patients exhibit predominantly pro-inflammatory profiles and secrete significantly more CXCL9, CXCL10 and TNF- α than macrophages from SC subjects, macrophages from SC subjects have a greater ability to kill *L. braziliensis* than macrophages from CL or ML patients (Giudice, Vendrame et al. 2012). In *L. panamensis* infection, others have shown that monocytes from SC individuals are less permissive to leishmania invasion or phagocytosis than monocytes from patients with relapsed episodes of CL (Bosque, Saravia et al. 2000). Herein, by evaluating the penetration/phagocytosis of *L. braziliensis* by monocytes, we used flow cytometry and microscopy to show that the number of amastigotes is decreased in samples from SC subjects compared to samples from CL patients. These data provide further support for the role of monocytes/macrophages in the control of *L. braziliensis* infection. Studies aimed to evaluating the mechanisms that allow the monocytes of SC subjects to be less permissive to *L. braziliensis* infection and the mechanism by which macrophages from these individuals kill *L. braziliensis* are ongoing.

While our data suggest that CD8⁺T cells may have a protective role in SC infection, evidence has been accumulated for the role of CD8⁺T cells in the pathology in CL. Previously, by comparing the tissue infiltration in patients with early cutaneous leishmaniasis (E-CL) with that of CL patients who had classical ulcers, we observed a five-fold increase in CD8⁺T cells in the CL ulcers compared to the E-CL lesions (Faria, Souza et al. 2009). Moreover, the CD8⁺T cells from patients with classical ulcers expressed significantly higher levels of granzyme A

than did the cells from the papular lesions of ECL (Faria, Souza et al. 2009). Regarding cytotoxic function, Brodskyn *et al.* showed that the cytotoxicity mediated by CD8⁺T cells, as measured by the lysing of infected macrophages, was greater in ML than in CL leishmaniasis, suggesting that cytotoxicity could be involved in the pathology of tegumentary leishmaniasis (Brodskyn, Barral et al. 1997). It has also been reported that CD8⁺T cells do not contribute to the killing of parasites in co-cultures with *L. braziliensis* infected macrophages from CL patients (Santos Cda, Boaventura et al. 2013). Herein we showed that, after exposure of iMOs to CD8⁺T cells, the frequency of apoptotic cells in CL was higher than in SC individuals. Moreover, we also determined the mechanism of the cytotoxicity mediated by CD8⁺T cells. While there was no evidence that the Fas/FasL pathway participated in this process, we showed the frequency of CD8⁺T cells expressing granzyme B, and the levels of granzyme B in the supernatants of MOs cultured with CD8⁺T were elevated in samples from CL patients compared to samples from SC individuals. The observations that granzyme B levels increase in the supernatants of MOs co-cultured with CD8⁺T cells and that the frequencies of CD8⁺T cells expressing granzyme B decrease after exposure to iMOs are further indications of the participation of this enzyme in the cytotoxic response mediated by CD8⁺T cells.

In this study, we showed that while CD8⁺T cells in subjects with SC are the major source of IFN- γ , these cells had less cytotoxic activity than CD8⁺T cells from CL patients. Therefore, it is likely that although CD8⁺T cell exhibit decreased cytotoxicity in *L. braziliensis*-infected cells in SC infection, these cells help control the infection by activating macrophages to kill leishmania. Moreover, as the cytotoxic activity in SC infection is mild, tissue damage does not occur, and ulcers do not develop. Alternatively, the greater cytotoxicity observed in CL patients may participate in the pathology through the killing of cells infected with leishmania or the expression of *L. braziliensis* antigen. A study of the participation of IFN- γ and perforin in the pathogenesis of heart disease during experimental *T. cruzi* infection provides support for this dual role of CD8⁺T cells in the pathogenesis of intracellular infection. In this study, CD8⁺IFN- γ ⁺ cells were shown to exert a protective function, whereas CD8⁺ perforin⁺ cells were shown to have a possible detrimental role in *T. cruzi*-elicited heart injury (Silverio, Pereira et al. 2012). In

conclusion, our data revealed the role of monocytes and CD8⁺T cells in the control of the leishmania in subjects with SC *L. braziliensis* infection and the role of CD8⁺T cells in the pathogenesis of CL. The monocytes of subjects with SC were less permissive to leishmania penetration because the production of IFN- γ by CD8⁺T cells from these individuals increased the abilities of monocytes and macrophages to kill leishmania. In contrast, the enhanced cytotoxic response observed in samples from CL patients did not contribute to the killing of the parasite and may induced tissue damage and facilitated the development of cutaneous ulcers.

Acknowledgments

This work was supported by the National Institute of Health grant AI30639-20.

Figure Legends:

Figure 1: Frequencies of CD4⁺IFN- γ ⁺ and CD8⁺IFN- γ ⁺ after stimulation with SLA. PBMCs were stimulated with SLA (5 μ g/ml) for 12 hours, stained with α -CD3, α -CD4, α -CD8 and intracellular α -IFN- γ and analyzed by FACS. Figure 1A shows the strategies for the analyses of the CD3⁺/CD4⁺T and CD3⁺/CD8⁺T cell subsets from lymphocytes that were gated from FSC and the SSC dot plots. Dot plots are representative of 18 CL patients and 16 SC subjects and display the frequencies of CD4⁺T and CD8⁺T cells expressing IFN- γ in samples from SC and CL individuals. **(B)** Expression of IFN- γ in CD4⁺ and CD8⁺T cells from CL patients and SC subject *p<0.05. Statistical comparisons were performed with the Mann-Whitney *U*-test.

Figure 2: Frequency of infected monocytes in samples from CL patients and SC subjects. Monocytes from SC subjects and CL patients were infected with DDAO-SE-stained *L. braziliensis* (5 promastigotes:1 monocyte) for 2 hours. **2A:** Gated monocytes from FSC and SSC dot plots (left dot plot) were analyzed to determine the frequencies of infected monocytes. CD14⁺ and DDAO-SE⁺ double-positive cells were selected in the iMO gate, and the histograms show the frequencies of infected monocytes from SC subjects and CL patients (left to right). Histograms are representative of 18 CL patients and 17 SC subjects **2B:** Frequencies of infected CD14⁺ cells in CL patients and in SC individuals *p<0.05. Statistical comparisons were performed with the Mann-Whitney *U*-test.

Figure 3: CD8⁺T cells from CL patients induce more apoptosis of infected monocytes compared to CD8⁺T cells from SC subjects.

Monocytes were infected with DDAO-SE-stained *L. braziliensis* promastigotes for 2 hours and co-cultured with CD8⁺T cells for 8 hours. Co-cultured cells were stained with α -CD14 and intracellular α -annexin V antibodies and analyzed by FACS. The strategy used for the evaluation of annexin V expressed in CD14⁺ cells was the same that is shown in figure 2A. **3A:**

Representative histogram of CD14⁺ cells expressing V shows the frequencies of infected monocytes and infected monocytes co-cultured with CD8⁺T cells. **3B:** Frequencies of CD14⁺ cells expressing annexin V in infected and infected monocytes co-cultured with autologous CD8⁺T cells (*p<0.05). Statistical analyses were performed with the Kruskal-Wallis-test with Dunn's post hoc test.

Figure 4: CD8⁺T cells from CL patients display increase of granzyme B production after co-culture with iMO compared to CD8⁺T cells from SC subjects.

CD8⁺T cells were co-cultured with MOs and iMO, supernatants were collected, and granzyme B production was measured by ELISA. Additionally, CD8⁺T cells were collected and stained with α -CD3, α -CD8 and intracellular α -granzyme B, and the frequencies of CD8⁺granzymeB⁺ T cells were determine by FACS. **4A:** Production of granzyme B by CD8⁺T cells after co-culture with uninfected and infected monocytes measured in the supernatants by ELISA. **4B:** Frequencies of CD8⁺Granzyme B⁺ cells co-cultured with uninfected and infected monocytes *p<0.05. Statistical analyses were performed with the Mann Whitney *U*-test in both analyses.

Figures:

Fig.1A

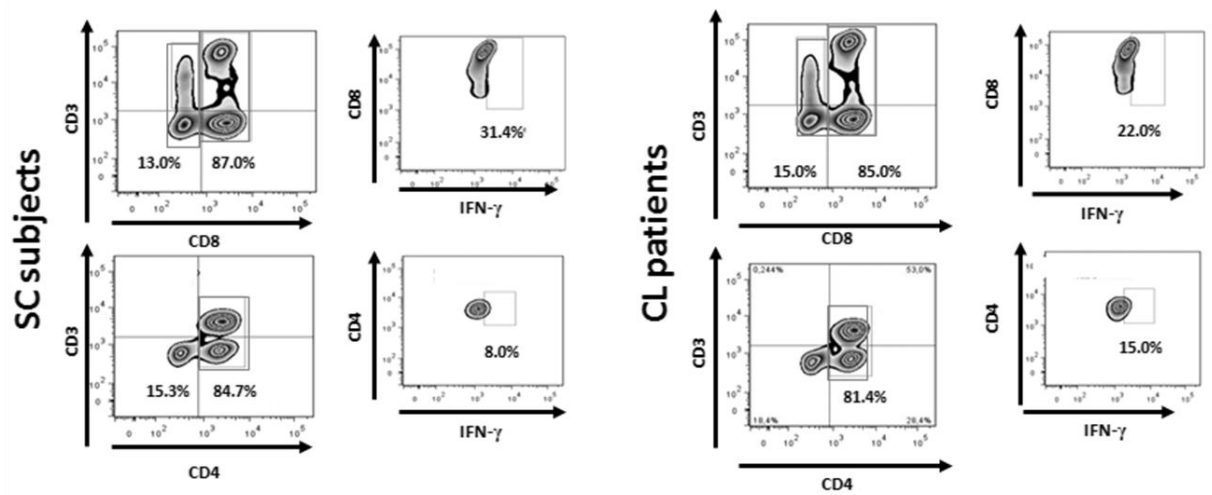


Fig.1B

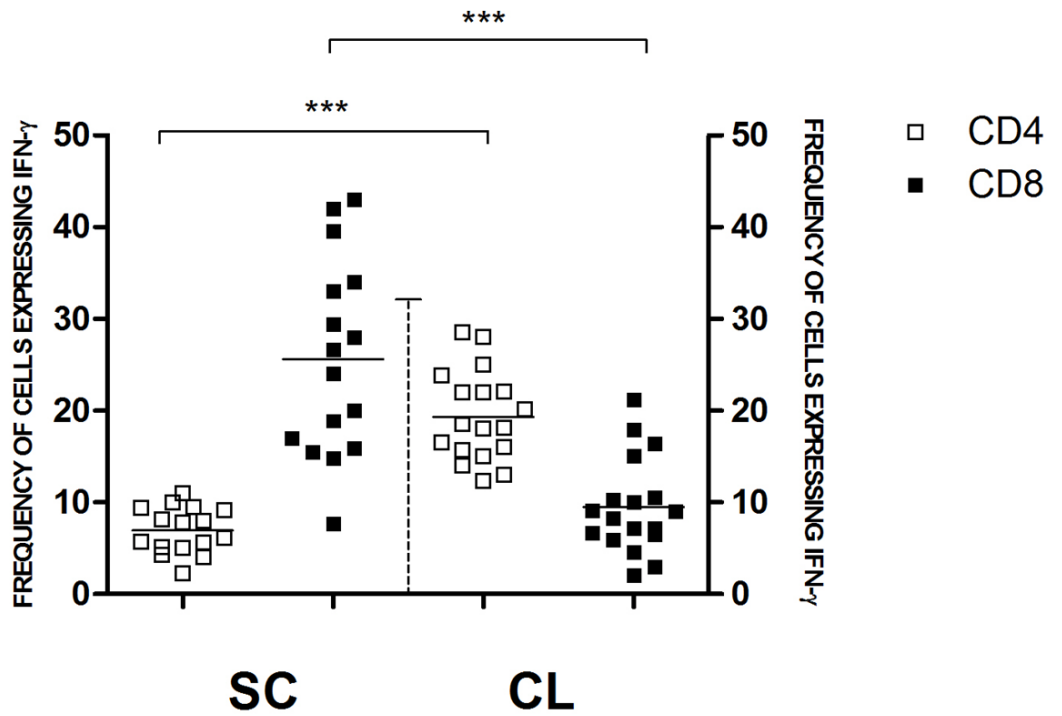


Fig.2

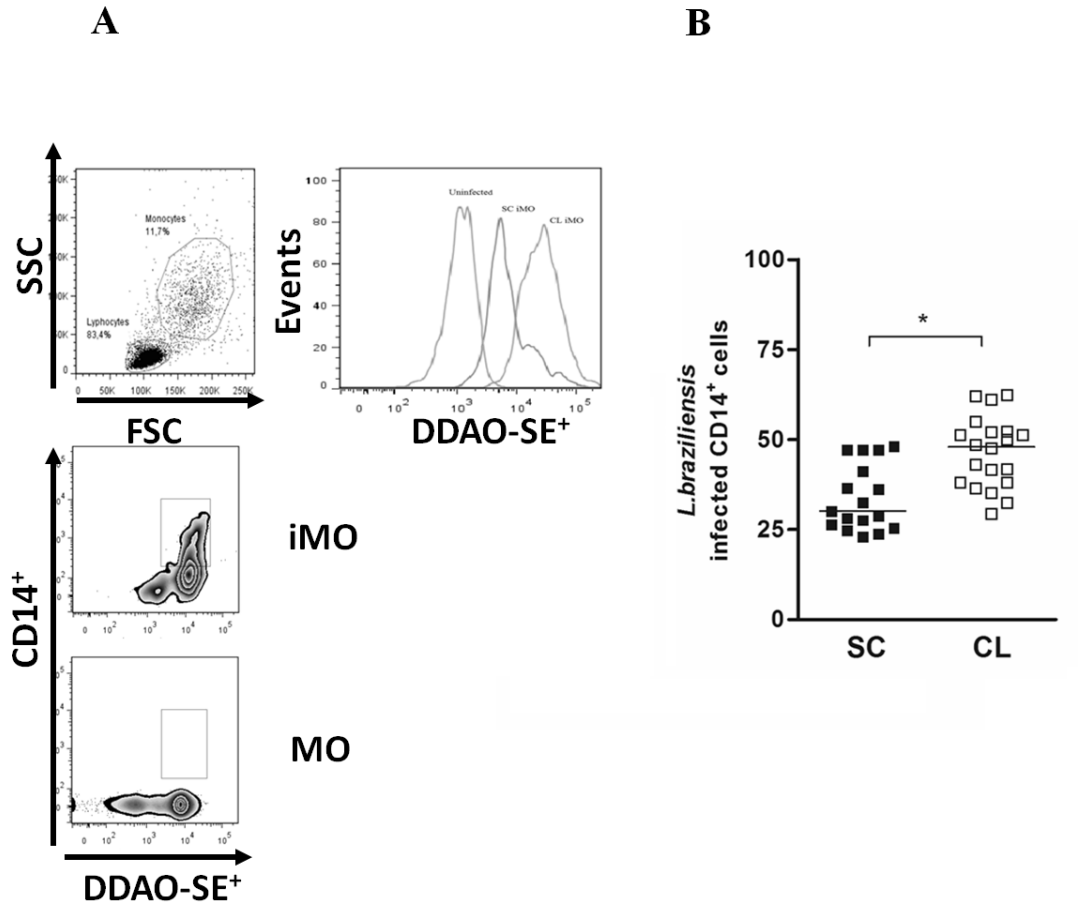


Fig.3

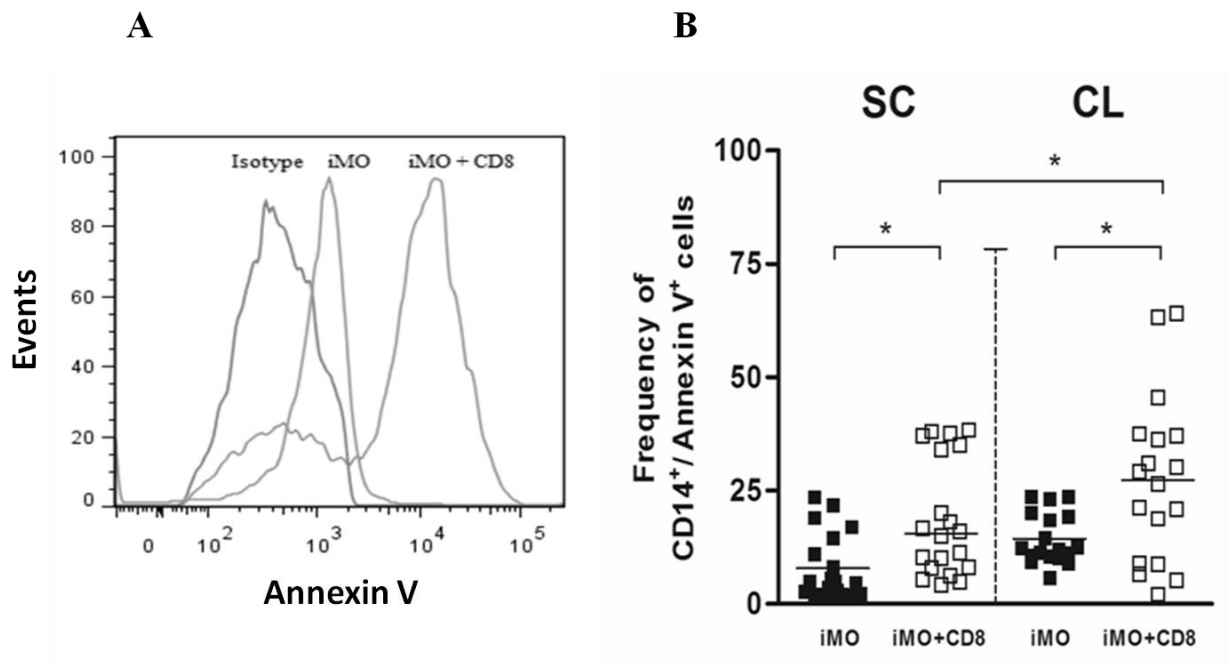
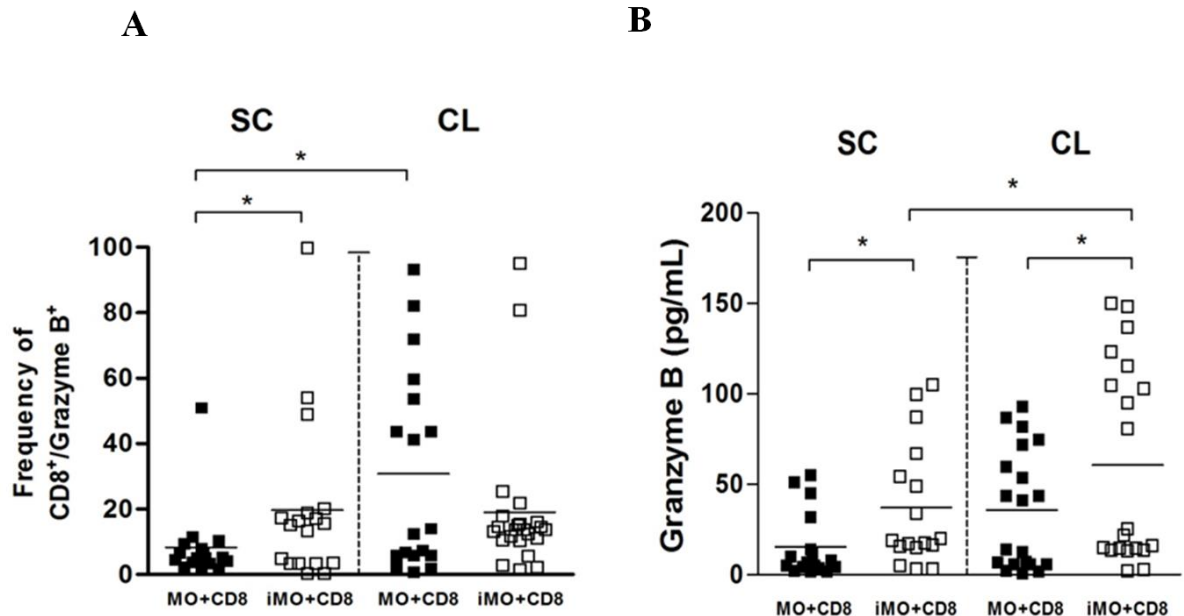


Fig.4



References:

1. Alvar, J., Velez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., and Team, W.H.O.L.C. 2012. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One* 7:e35671.
2. Malherbe, L., Filippi, C., Julia, V., Foucras, G., Moro, M., Appel, H., Wucherpfennig, K., Guery, J.C., and Glaichenhaus, N. 2000. Selective activation and expansion of high-affinity CD4⁺ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. *Immunity* 13:771-782.
3. Heinzl, F.P., Sadick, M.D., Holaday, B.J., Coffman, R.L., and Locksley, R.M. 1989. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 169:59-72.
4. Belkaid, Y., Von Stebut, E., Mendez, S., Lira, R., Caler, E., Bertholet, S., Udey, M.C., and Sacks, D. 2002. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. *J Immunol* 168:3992-4000.

5. Uzonna, J.E., Joyce, K.L., and Scott, P. 2004. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8⁺ T cells. *J Exp Med* 199:1559-1566.
6. Bacellar, O., Lessa, H., Schriefer, A., Machado, P., Ribeiro de Jesus, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., and Carvalho, E.M. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70:6734-6740.
7. Mendes, D.S., Dantas, M.L., Gomes, J.M., dos Santos, W.L., Silva, A.Q., Guimaraes, L.H., Machado, P.R., de Carvalho, E.M., and Arruda, S. 2013. Inflammation in disseminated lesions: an analysis of CD4⁺, CD20⁺, CD68⁺, CD31⁺ and vW⁺ cells in non-ulcerated lesions of disseminated leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 108:18-22.
8. Antonelli, L.R., Dutra, W.O., Almeida, R.P., Bacellar, O., Carvalho, E.M., and Gollob, K.J. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101:226-230.
9. Faria, D.R., Gollob, K.J., Barbosa, J., Jr., Schriefer, A., Machado, P.R., Lessa, H., Carvalho, L.P., Romano-Silva, M.A., de Jesus, A.R., Carvalho, E.M., et al. 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect Immun* 73:7853-7859.
10. Carvalho, L.P., Passos, S., Bacellar, O., Lessa, M., Almeida, R.P., Magalhaes, A., Dutra, W.O., Gollob, K.J., Machado, P., and de Jesus, A.R. 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 29:251-258.
11. Da-Cruz, A.M., Conceicao-Silva, F., Bertho, A.L., and Coutinho, S.G. 1994. *Leishmania*-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62:2614-2618.
12. Da-Cruz, A.M., Bertho, A.L., Oliveira-Neto, M.P., and Coutinho, S.G. 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br J Dermatol* 153:537-543.
13. Barral-Netto, M., Barral, A., Brodskyn, C., Carvalho, E.M., and Reed, S.G. 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 17:21-28.
14. Brodskyn, C.I., Barral, A., Boaventura, V., Carvalho, E., and Barral-Netto, M. 1997. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. *J Immunol* 159:4467-4473.
15. Faria, D.R., Souza, P.E., Duraes, F.V., Carvalho, E.M., Gollob, K.J., Machado, P.R., and Dutra, W.O. 2009. Recruitment of CD8⁽⁺⁾ T cells expressing granzyme A is

- associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31:432-439.
16. Santos Cda, S., Boaventura, V., Ribeiro Cardoso, C., Tavares, N., Lordelo, M.J., Noronha, A., Costa, J., Borges, V.M., de Oliveira, C.I., Van Weyenbergh, J., et al. 2013. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNgamma(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 133:1533-1540.
 17. Jirmanus, L., Glesby, M.J., Guimaraes, L.H., Lago, E., Rosa, M.E., Machado, P.R., and Carvalho, E.M. 2012. Epidemiological and clinical changes in American tegumentary leishmaniasis in an area of *Leishmania (Viannia) braziliensis* transmission over a 20-year period. *Am J Trop Med Hyg* 86:426-433.
 18. Follador, I., Araujo, C., Bacellar, O., Araujo, C.B., Carvalho, L.P., Almeida, R.P., and Carvalho, E.M. 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* 34:E54-58.
 19. Schnorr, D., Muniz, A.C., Passos, S., Guimaraes, L.H., Lago, E.L., Bacellar, O., Glesby, M.J., and Carvalho, E.M. 2012. IFN-gamma production to leishmania antigen supplements the leishmania skin test in identifying exposure to *L. braziliensis* infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1947.
 20. Novoa, R., Bacellar, O., Nascimento, M., Cardoso, T.M., Ramasawmy, R., Oliveira, W.N., Schriefer, A., and Carvalho, E.M. 2011. IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* Infection. *Parasite Immunol* 33:132-136.
 21. Reed, S.G., Badaro, R., Masur, H., Carvalho, E.M., Lorencio, R., Lisboa, A., Teixeira, R., Johnson, W.D., Jr., and Jones, T.C. 1986. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 35:79-85.
 22. Khamesipour, A., Nateghi Rostami, M., Tasbihi, M., Miramin Mohammadi, A., Shahrestani, T., Sarrafnejad, A., Sohrabi, Y., Eskandari, S.E., and Keshavarz Valian, H. 2012. Phenotyping of circulating CD8(+) T cell subsets in human cutaneous leishmaniasis. *Microbes Infect* 14:702-711.
 23. Derby, E., Reddy, V., Kopp, W., Nelson, E., Baseler, M., Sayers, T., and Malyguine, A. 2001. Three-color flow cytometric assay for the study of the mechanisms of cell-mediated cytotoxicity. *Immunol Lett* 78:35-39.
 24. Chavez-Galan, L., Arenas-Del Angel, M.C., Zenteno, E., Chavez, R., and Lascrain, R. 2009. Cell death mechanisms induced by cytotoxic lymphocytes. *Cell Mol Immunol* 6:15-25.
 25. Carvalho, L.P., Passos, S., Schriefer, A., and Carvalho, E.M. 2012. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. *Front Immunol* 3:301.

26. Gollob, K.J., Antonelli, L.R., Faria, D.R., Keesen, T.S., and Dutra, W.O. 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 8:1338-1343.
27. Da-Cruz, A.M., de Oliveira, M.P., De Luca, P.M., Mendonca, S.C., and Coutinho, S.G. 1996. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 91:225-229.
28. Machado, P.R., Lessa, H., Lessa, M., Guimaraes, L.H., Bang, H., Ho, J.L., and Carvalho, E.M. 2007. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 44:788-793.
29. Lessa, H.A., Machado, P., Lima, F., Cruz, A.A., Bacellar, O., Guerreiro, J., and Carvalho, E.M. 2001. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. *Am J Trop Med Hyg* 65:87-89.
30. Bottrel, R.L., Dutra, W.O., Martins, F.A., Gontijo, B., Carvalho, E., Barral-Netto, M., Barral, A., Almeida, R.P., Mayrink, W., Locksley, R., et al. 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble Leishmania antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 69:3232-3239.
31. Nateghi Rostami, M., Keshavarz, H., Edalat, R., Sarrafnejad, A., Shahrestani, T., Mahboudi, F., and Khamesipour, A. 2010. CD8+ T cells as a source of IFN-gamma production in human cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 4:e845.
32. Jayakumar, A., Castilho, T.M., Park, E., Goldsmith-Pestana, K., Blackwell, J.M., and McMahon-Pratt, D. 2011. TLR1/2 activation during heterologous prime-boost vaccination (DNA-MVA) enhances CD8+ T Cell responses providing protection against Leishmania (Viannia). *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1204.
33. Bogdan, C. 2008. Mechanisms and consequences of persistence of intracellular pathogens: leishmaniasis as an example. *Cell Microbiol* 10:1221-1234.
34. Giudice, A., Vendrame, C., Bezerra, C., Carvalho, L.P., Delavechia, T., Carvalho, E.M., and Bacellar, O. 2012. Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with Leishmania braziliensis infection. *BMC Infect Dis* 12:75.
35. Bosque, F., Saravia, N.G., Valderrama, L., and Milon, G. 2000. Distinct innate and acquired immune responses to Leishmania in putative susceptible and resistant human populations endemically exposed to L. (Viannia) panamensis infection. *Scand J Immunol* 51:533-541.
36. Silverio, J.C., Pereira, I.R., Cipitelli Mda, C., Vinagre, N.F., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., and Lannes-Vieira, J. 2012. CD8+ T-cells expressing interferon

gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog* 8:e1002645.

Report

Association between obesity measured by different parameters and severity of psoriasis

Gleison Vieira Duarte¹, MSc, MD, Maria de Fatima S. P. Oliveira², MD, PhD,
Thiago M. Cardoso², PhD, Ivonise Follador², MD, PhD, Thadeu S. Silva²,
Carolina M. A. Cavalheiro², MD, Walker Nonato^{2,3}, and Edgar M. Carvalho^{2,3}, MD, PhD

¹Departments of Dermatology and
²Immunology, Complexo Hospital
Universitário Professor Edgard Santos,
Universidade Federal da Bahia
(University Hospital of Professor Edgard
Santos, State University of Bahia),
Salvador, Bahia, Brazil, and ³Instituto
Nacional de Ciência e Tecnologia de
Doenças Tropicais (CNPq/MCT;
National Institute of Science and
Technology for Tropical Diseases),
Salvador, Bahia, Brazil

Correspondence

Gleison Vieira Duarte, MD, PhD,
Serviço de Dermatologia
Complexo Hospitalar Universitário
Professor Edgard Santos
Rua Augusto Vasques s/n, 3º andar –
Canela
40111-0170 Salvador
Bahia
Brasil
E-mail: gleisonvduarte@yahoo.com.br

Funding: None.

Conflicts of interest: None.

Introduction

Psoriasis is an immune-mediated disease with a worldwide prevalence of 2–5%.^{1–4} Obesity, alcoholism, smoking, diabetes, and coronary artery disease have been considered risk factors for or are associated with the severity of psoriasis.^{5–7} Initial studies documenting the association between psoriasis and obesity were performed in Europe.^{6,7} In Utah, USA, Herron *et al.*⁸ showed that although obesity was observed in 34% of patients with psoriasis, it occurred in only 18% of the general population. The association between obesity and psoriasis has been explained by the relationships among the immune system, adipokines, and metabolism. Fat tissue induces a low degree of proinflammatory status in subjects with obesity.^{9,10} The

Abstract

Background: Obesity has been associated with the severity of psoriasis, but this relationship is not completely understood.

Objectives: This study aimed to evaluate associations between the severity of psoriasis and weight excess as determined using a variety of parameters.

Methods: A cross-sectional study was performed in 296 psoriasis patients. Their body mass index (BMI), waist circumference (WC), and waist: hip ratio (WHR) values were compared with results on a psoriasis area severity index (PASI).

Results: The frequency of severe psoriasis was higher in men ($P < 0.05$). Direct correlations were established between PASI scores and each of BMI ($R = 0.0154$, $P = 0.01$), WC ($R = 0.207$, $P = 0.001$), and WHR ($R = 0.184$, $P = 0.007$).

Conclusions: This study extends previous reports of an association between psoriasis and obesity and shows a direct correlation between obesity as measured according to different parameters and psoriasis severity.

consequent increase in levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) enhances resistance to insulin and atherosclerosis.^{11–14} Additionally, keratinocytes and inflammatory cells produce vascular endothelial growth factor (VEGF), which induces angiogenesis and endothelial activation. Adipocytes also produce VEGF induced by hyperinsulinemia. The inflammation and increased levels of VEGF may not only initiate psoriasis but may cause it to be more severe.¹⁵ Obesity measured by body mass index (BMI) has been associated with severity of psoriasis.⁵ This study used BMI and other parameters to evaluate visceral fat.

According to the World Health Organization (WHO),¹⁶ obesity affects about 35% of the world population. In Brazil, where this study was conducted, overweight is observed in up to 40.6% and obesity in 5.0%

177

Evaluation of the Microbicidal Activity and Cytokines/Chemokines Profile Released by Neutrophils from HTLV-1-Infected Individuals

Caroline A. Bezerra*, Thiago M. Cardoso*, Angela Giudice*, Aurélia F. Porto†, Silvane B. Santos*‡, Edgar M. Carvalho*‡ & Olívia Bacellar*‡

*Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil; †Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, Sergipe, Brazil; and ‡Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (INCT-DT/CNPQ), Salvador, Bahia, Brazil

Received 18 October 2010; Accepted in revised form 11 May 2011

Correspondence to: Maria Olívia Amado Ramos Bacellar, PhD, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Serviço de Imunologia, 5o andar, Rua João das Botas, s/n, Canela, 40110-160, Salvador, BA, Brazil. E-mail: olivinha@ufba.br

Abstract

Human T cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) induces activation and spontaneous proliferation of T cells with production of type-1 pro-inflammatory cytokines. It modifies the immune response to other antigens and increases susceptibility to infectious diseases. However, little is known about innate immunity in HTLV-1 infection. HTLV-1-infected individuals have higher spontaneous neutrophil activation than HTLV-1-seronegative individuals, as shown by the nitroblue tetrazolium (NBT) assay. This study was conducted to evaluate neutrophil function in HTLV-1-infected individuals. Participants in the study included 18 HTLV-1-infected individuals and 14 HTLV-1-seronegative controls. We evaluated the ability of neutrophils (PMNs) to control a parasite infection, to produce peroxynitrite, cytokines and chemokines and to express activation markers in cultures when stimulated with LPS or infected with *Leishmania*. When compared with the control group, there was no difference in the percentage of PMNs infected with *Leishmania* or in the number of amastigotes/100 PMNs in HTLV-1-infected individuals. The microbicidal activity of the PMNs and the levels of CXCL8 and CCL4 released by these cells did not show a difference between HTLV-1-infected individuals and the control group. In both the HTLV-1 group and the control group, infection with *Leishmania* or stimulation of PMNs led to cellular activation. These observations suggest that neutrophils from HTLV-1-infected individuals have preserved their ability to become activated and to produce chemokines and peroxynitrite after stimulation and that the susceptibility to infection by intracellular *Leishmania amazonensis* in HTLV-1-infected individuals does not depend on impairment of neutrophil function.

Introduction

It is estimated that worldwide 10–20 million people are infected by human T cell lymphotropic virus type-1 (HTLV-1) [1]. HTLV-1 predominantly infects T cells, leading to T cell activation and secretion of chemokines and cytokines [2–5]. High levels of interferon- γ (IFN- γ) and tumour necrosis factor- α (TNF- α) are produced during HTLV-1 infection, and these pro-inflammatory cytokines have been associated with disease progression to HTLV-1-associated myelopathy (HAM/TSP) [5]. On the other hand, HTLV-1 suppresses the immune response to other antigens and increases susceptibility and severity of infections caused by other pathogens such as *Strongyloides*

stercoralis, *Sarcoptes scabiei* and *Mycobacterium tuberculosis* [6–9]. Patients coinfecting with *S. stercoralis* and HTLV-1 have decreased the production of IgE and Th2 cytokines, mechanisms involved in *S. stercoralis* killing [8]. Regarding tuberculosis, it has been shown that immune response to purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* (PPD) is decreased in HTLV-1-infected individuals compared with controls [10–12].

While the abnormalities in the adaptive immune response have been documented in HTLV-1 infection, very little is known about the innate immune response in HTLV-1-infected individuals. Neutrophils (PMNs) play a crucial role in the first line of defence against invading bacteria, fungi and protozoa [13–15]; Impairment in

Brief Definitive Report

IL-17 and Regulatory Cytokines (IL-10 and IL-27) in *L. braziliensis* InfectionR. NOVOA,¹ O. BACELLAR,^{1,2} M. NASCIMENTO,¹ T. M. CARDOSO,^{1,2} R. RAMASAWMY,^{1,2} W. N. OLIVEIRA,^{1,2} A. SCHRIEFER^{1,2} & E. M. CARVALHO^{1,2}¹Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brazil, ²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais (CNPq/MCT), Salvador, Brazil

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis (CL) is characterized by high production of pro-inflammatory cytokines and development of pathology. Individuals with subclinical *L. braziliensis* infection (SC) have a positive skin test to leishmania, but do not develop disease. We evaluated whether the downregulation of inflammatory response in SC is mediated by IL-10 and IL-27 and whether IL-17 is associated with control of infection. Participants include SC individuals, patients with CL and healthy subjects. Cytokines protein and mRNA were detected by ELISA and real-time PCR. IFN- γ and TNF- α levels were higher in CL than in SC group. The IL-10 levels and mRNA for IL-10 were similar in both SC and CL. mRNA for IL-27 was increased in cells from SC after stimulation with *L. braziliensis* antigen. There was a tendency for increased levels of IL-17 in SC compared to CL. The weak type 1 immune response observed in SC *L. braziliensis* infection is not because of the regulatory effects of IL-10 and IL-27. The control of *Leishmania* infection may be mediated by innate immune response with participation of IL-17. The results from this pilot study warrant further larger studies to investigate the potential contributions of IL-17 and IL-27 to the control of *L. braziliensis* infection.

Keywords cutaneous leishmaniasis, IL-17, *Leishmania braziliensis*, regulatory cytokines, subclinical infection

Correspondence: Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5° andar, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Canela, 40110-160 Salvador, BA, Brazil. (e-mail: edgar@ufba.br and imuno@ufba.br).
Disclosures: None.

Received: 23 December 2009

Accepted for publication: 22 July 2010

INTRODUCTION

Cutaneous leishmaniasis (CL) because of *Leishmania braziliensis* is characterized by well-delimited ulcerated skin lesions with raised borders. About 3% of patients with CL develop mucosal leishmaniasis (ML) (1). Patients with CL and ML have a strong type 1 immune response to *Leishmania* antigen, with high production of IFN- γ and TNF- α and decreased ability of IL-10 in downmodulating IFN- γ production (2,3). In endemic areas of *L. braziliensis*, about 10% of the individuals have a positive delayed-type hypersensitivity (DTH) skin test to leishmania antigen, but do not have a previous history of CL or a typical scar of CL. These individuals are considered as having a subclinical (SC) *L. braziliensis* infection (2). Individuals with SC *L. braziliensis* infection produce significantly lower levels of IFN- γ and TNF- α than patients with CL (3). Others have shown that levels of IL-10 are greater in SC *L. braziliensis*-infected individuals when compared with those from patients with CL (4). IL-27 is a cytokine that can initiate a Th1 response, but can also regulate inflammatory response (5,6). Therefore, we evaluated whether the downregulation of TNF- α and IFN- γ production in individuals with SC *L. braziliensis* infection is mediated by IL-10 and IL-27.

The mechanisms by which individuals with subclinical *L. braziliensis* infection achieve control over the infection are as yet not understood. In a highly endemic area for *L. major*, DTH to *Leishmania* antigen was associated with protection to CL (7). Recently, it was shown that IL-17 may protect against visceral leishmaniasis (VL) (8). In this report, we characterized the immune response in individuals with SC *L. braziliensis* infection, focusing on the role of IL-10 and IL-27 in the modulation of immune response and evaluating whether IL-17 production was associated with control of infection.

Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis

Olivia Bacellar,¹ Daniela Faria,² Márcia Nascimento,¹ Thilago M. Cardoso,¹ Kenneth J. Gollob,³ Walderez O. Dutra,² Phillip Scott,⁴ and Edgar M. Carvalho³

¹Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Prof. Edgard Santos, Universidade Federal da Bahia, Salvador-Bahia, ²Departamento de Morfologia and ³Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, and ⁴Department of Pathobiology, School of Veterinary Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia

Interleukin 17 (IL-17) plays a critical role in inflammation and autoimmunity. Very little is known about IL-17 in protozoa infection. Here, we show that lymphocytes obtained from patients with mucosal leishmaniasis and cutaneous leishmaniasis produce higher levels of IL-17 than do lymphocytes obtained from uninfected control subjects ($P < .01$). There was a tendency for tissue obtained from patients with mucosal leishmaniasis to contain a higher number of cells expressing IL-17, compared with tissue obtained from patients with cutaneous leishmaniasis, and there was a direct correlation between the number of cells expressing IL-17 and the presence of cellular inflammation at the lesion site ($r^2 = 0.86$; $P < .001$). These data support the role of IL-17 in the pathogenesis of the inflammatory reaction in leishmaniasis.

Interleukin 17 (IL-17) is a member of a newly identified cytokine family that is produced predominantly by Th17 cells [1]. IL-17 enhances T cell priming and stimulates fibroblasts, endothelial cells, neutrophils, macrophages, and epithelial cells to produce multiple pro-inflammatory mediators, including IL-1, IL-6, tumor necrosis factor α (TNF- α), nitric oxide synthase 2, metalloproteinases, and chemokines [2]. IL-17 may protect against bacterial, fungal, and protozoal infection [3], but it has been linked predominantly to the pathogenesis of chronic inflammatory and autoimmune diseases. In humans, expression of IL-17 has been detected in serum samples and target tissue samples obtained from

patients with systemic rheumatic diseases, multiple sclerosis, inflammatory bowel disease, and asthma [4, 5]. In arthritis, IL-17 is directly involved in the destruction of cartilage and bone [5].

Cutaneous leishmaniasis (CL) is a disease caused by protozoa of the genus *Leishmania*, characterized by the development of ulcerated skin lesions. In areas of *Leishmania braziliensis* transmission, a small percentage of patients develop mucosal leishmaniasis (ML), concomitantly or after CL. ML affects predominantly the nose, leading to tissue damage and, occasionally, to disfiguring facial lesions. Although diffuse cutaneous leishmaniasis is associated with impaired T cell responses against parasite antigen, patients with CL and ML have a strong type 1 immune response to *Leishmania* species, with high production of interferon γ (IFN- γ) and TNF- α [6]. However, the infection is only partially controlled, and the exaggerated T cell response participates in tissue damage observed in both CL and ML. High concentrations of TNF- α , IL-6, IFN- γ , and nitric oxide are documented in peripheral blood and tissue specimens and are characterized by an intense inflammatory infiltrate with few or no detectable parasites [7].

Only a few studies have assessed the role of IL-17 in human infectious diseases, and it is not known whether this cytokine participates as a defense mechanism or in

Received 17 November 2008; accepted 3 February 2009; electronically published 28 May 2009.

Potential conflicts of interest: none reported.
Financial support: National Institutes of Health (grant AI-30639), National Institutes of Health Fogarty International Center (grant D43 TW007127), and National Institute of Studies in Tropical Diseases (INEOT-CNPq). E.M.C. is a senior investigator of the Brazilian National Research Council.

Presented in part: 13th International Congress of Immunology, Rio de Janeiro, Brazil, 21–25 August 2007 (abstract 1001).

Reprints or correspondence: Dr. Edgar M. Carvalho, Serviço de Imunologia, 5º andar, Hospital Universitário Professor Edgard Santos, Rua João das Botas s/n, Cariela, 40110-160, Salvador, BA, Brazil (edgar@ufba.br).

The Journal of Infectious Diseases 2009;200:75–8

© 2009 by the Infectious Diseases Society of America. All rights reserved.

0022-1866/2009/20001-0012\$15.00

DOI: 10.1093/infdis/jin330