



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DICOTOMIA FUNCIONAL DE CÉLULAS NK NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA: PARTICIPAÇÃO NA PATOGÊNESE E DESTRUIÇÃO DE PARASITOS

Taís Menezes Cerqueira Campos de Britto

Tese de Doutorado

Salvador (Bahia), 2015

Ficha Catalográfica

Brito, Taís Menezes Cerqueira Campos de
Dicotomia funcional de células NK na Leishmaniose cutânea: participação na patogênese e destruição de parasitos/ Taís Menezes Campos de Brito.- Salvador, 2016.
99f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Lucas Pedreira de Carvalho
Co-orientador Profª Dr. Sara Timóteo Passos

Tese (pós-graduação) Programa de Pós-graduação Ciências da Saúde.
Faculdade de Medicina da Bahia.Universidade Federal da Bahia.

1. Leishmaniose cutânea. 2. Células NK. 3. Linfócitos Citotóxicos.
4. Citotoxicidade. I. Carvalho, Lucas Pedreira de. II. Passos, Sara Timóteo.
III. Universidade Federal da Bahia. IV. Título.

CDU: 616.928.5



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE



DICOTOMIA FUNCIONAL DE CÉLULAS NK NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA: PARTICIPAÇÃO NA PATOGÊNESE E DESTRUIÇÃO DE PARASITOS

Taís Menezes Cerqueira Campos de Britto

Professor-orientador: Lucas Pedreira de Carvalho

Professora Co-orientadora: Sara Timóteo Passos

Tese apresentada ao Colegiado do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde, da área de concentração em Imunologia.

Salvador (Bahia), 2015

FONTES DE FINANCIAMENTO

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq
- National Institute of Health - NIH
- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Doenças Tropicais - INCT-DT

COMISSÃO EXAMINADORA

Membros Titulares:

Dra. Camila Indiani de Oliveira, professora do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde (PPgCS) da Universidade Federal da Bahia (UFBA) e pesquisadora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Dr. Paulo Novis Rocha, professor adjunto do Departamento de Medicina e Apoio Diagnóstico da FMB-UFBA e professor do PPgCS da UFBA.

Dr. Ricardo Riccio, professor do Curso de Pós-Graduação em Patologia (PGPAT) da FIOCRUZ e pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

Dra. Rita Elizabeth Moreira Mascarenhas, professora adjunta do componente curricular Biointeração do curso de medicina da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública e pesquisadora colaboradora do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ.

Dra. Daniella Regina Arantes Martins, professora adjunta do Departamento de Biologia Celular e Genética da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Membro Suplente:

Dr. Lucas Pedreira de Carvalho, professor adjunto de Imunologia, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia, professor do Curso de Pós Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia e pesquisador do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada.

Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

Cora Coralina

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, Magali e Aloísio, por todo amor, carinho e dedicação.
Por todos os ensinamentos que me ajudaram a chegar até aqui.

Ao meu amado esposo Paulo Eduardo, por todo amor. Por se fazer presente em todos os momentos da minha vida, apoiando e incentivando minhas escolhas.

À minha amada irmã Kaila, por todo carinho e amizade. Por estar sempre ao meu lado.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Lucas Pedreira de Carvalho

Deixo aqui meus sinceros agradecimentos por ter acreditado no meu potencial. Pela confiança, suporte e apoio. Pela simplicidade e sabedoria com a qual me ensinou a fazer pesquisa. Tenha minha eterna admiração e gratidão.

Sara Timóteo Passos

Agradeço pelas boas palavras de orientação, ensinamentos, críticas e sugestões. Por sempre me oferecer uma palavra amiga. Pelo carinho e dedicação que sempre teve comigo. Serei eternamente grata.

AGRADECIMENTOS

Dedicação, paciência e fé! Não existe caminho certo ou errado, nossas escolhas nos levarão a algum lugar. Neste momento de realização de mais uma importante etapa da minha vida, percebo que fiz as escolhas certas. Com a ideia de encerrar ciclos para começar um novo, gostaria de registrar aqui o quanto sou grata a todos que contribuíram para essa concretização.

À Deus, por permitir a concretização deste trabalho. Dando-me sabedoria, paciência e serenidade para nunca desistir. Por ter colocado em meu caminho pessoas maravilhosas que ajudaram esta realização.

À minha família, por todo carinho e compreensão. Obrigada por sempre acreditarem em mim.

Aos Dr. Edgar Carvalho e Dr. Paulo Machado, pela oportunidade de desenvolver este projeto no Serviço de Imunologia.

Aos colegas do Serviço de Imunologia, por toda dedicação e solicitude.

Aos colegas do Laboratório de Imunologia e Biologia Celular, Andréa, Daniela, Camila, Maurício, Ivonete, por todo apoio prestado e pelos bons momentos de dedicação a ciência.

Às minhas queridas amigas, Giovana Bergheme e Rúbia Costa, pela amizade construída. Pelas trocas de ensinamentos, ajuda e compreensão. Por tornarem esta jornada mais prazerosa.

Aos funcionários do Posto de Saúde de Corte de Pedra, em especial, ao Sr. Ednaldo Lago.

A toda equipe que dá suporte clínico na área endêmica.

Aos colegas do programa de pós-graduação, por fazerem esta jornada agradável e enriquecedora.

Aos pacientes, por colaborarem e permitirem a realização desta pesquisa.

ÍNDICE

Índice de tabelas	13
Índice de figuras	14
Lista de abreviaturas e siglas	15
I. Resumo	17
II. Objetivos	18
III. Introdução	19
IV. Revisão da Literatura	21
IV.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	21
IV.1.1 Epidemiologia, aspectos clínicos e imunológicos	21
IV.1.2 Imunopatogênese da Leishmaniose Cutânea	24
IV.2 Classificação e características funcionas de células NK e NKT	26
IV.3 Atividade citotóxica das células NK e células NKT	29
IV.4 Papel da atividade citotóxica na patogênese da leishmaniose cutânea	31
V. Casuística, Material e Métodos	33
V.1 Área do estudo	33
V.2 Desenho do Estudo	33
V.3 Definições dos casos	33
V.3.1 Leishmaniose Cutânea	33
V.3.2 Indivíduos Sadios	34
V.4 Critérios de Inclusão	34
V.5 Critérios de Exclusão	34
V.6 Cálculo Amostral	34
V.7 Métodos Experimentais	35
V.7.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico	35
V.7.2 Purificação de células NK a partir de células mononucleares do sangue periférico	35
V.7.3 Cultura de células mononucleares do sangue periférico	36
V.7.4 Separação de células mononucleares de biópsias	36
V.7.5 Cultura de células mononucleares da biópsia	36
V.7.6 Marcação de superfície celular para análise por citometria de fluxo	37
V.7.7 Marcação intracelular para análise por citometria de fluxo	37
V.7.8 Infecção de CMSP com <i>L.braziliensis</i>	38

V.7.9 Co-Cultura e neutralização dos receptores NKp46, NKG2D e dos ligantes MICA/B	38
V.7.10 Viabilidade de parasitos	39
V.7.11 Microarranjo baseado no perfil de expressão gênica de lesões de LC	39
V.7.12 Análise Imunoistoquímica	39
V.8 Análises Estatísticas	40
V.9 Considerações Éticas	41
VI. Manuscrito 1	42
VII. Resultados	63
VII.1 Características clínicas e demográficas de pacientes com LC	63
VII.2 Identificação de sub-populações de células citotóxicas com base na expressão de CD56, CD8 e CD3	63
VII.3 Expressão do receptor FcγIII (CD16) nas sub-populações de células citotóxicas	65
VII.4 Frequência das sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de pacientes com LC	66
VII.5 Correlação entre a frequência das sub-populações de células citotóxicas e o número de lesões de pacientes com LC	67
VII.6 Frequência da expressão de TNF em células citotóxicas do sangue periférico de indivíduos sadios e de pacientes com LC	69
VII.7 Expressão de granzima e perforina em células citotóxicas do sangue periférico de pacientes com LC	70
VII.8 Determinação da atividade citotóxica de células NK e células T CD8 ⁺ em lesões de pacientes com LC	71
VII.9 Expressão dos ligantes MICA/B em células NK e células T CD8 ⁺ de lesões de pacientes com LC	73
VII.10 Neutralização de NKG2D em células NK e T CD8 ⁺	74

de lesões de pacientes com LC	
VII.11 Participação de células NK na infecção por <i>L. braziliensis</i>	75
VIII. Discussão	76
IX. Propostas de Estudo	84
X. Conclusões	85
XI. Sumary	86
XII. Referências	87
Anexos	
Anexo I – Normas de Publicação AJTMH	93
Anexo II – Carta ao Editor	99

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.	Achados demográficos e clínicos dos indivíduos sadios e dos pacientes com LC
------------------	---

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Identificação de sub-populações de células citotóxicas com base na expressão de CD56, CD8 e CD3 no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC
- Figura 2.** Expressão do receptor FcγIII (CD16) nas sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC
- Figura 3.** Frequência das sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC
- Figura 4.** Correlação entre a frequência das sub-populações de células citotóxicas e o número de lesões de pacientes com LC
- Figura 5.** Frequência da expressão de TNF em células citotóxicas do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com LC
- Figura 6.** Expressão de granzima e perforina nas sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC
- Figura 7.** Determinação da atividade citotóxica de células NK e células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LC
- Figura 8.** Expressão dos ligantes MICA/B em células NK e T CD8⁺ de lesões de pacientes com LC
- Figura 9.** Neutralização de NKG2D em células NK e T CD8⁺ de lesões de pacientes com LC
- Figura 10.** Participação de células NK na infecção por *L. braziliensis*

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IFN- γ	Interferon-gamma
TNF	Fator de Crescimento Tumoral
IL	Interleucina
LPS	Lipopolissacárideo
WHO	World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Th1	Type 1 helper cells (Células auxiliaadoras do tipo 1)
Th2	Type 2 helper cells (Células auxiliaadoras do tipo 2)
Treg	Linfócito T Regulatório
CD56	Cluster of Differentiation 56 (grupo de diferenciação 56)
CD8	Cluster of Differentiation 8 (grupo de diferenciação 8)
CD4	Cluster of Differentiation 4 (grupo de diferenciação 4)
CD3	Cluster of Differentiation 3 (grupo de diferenciação 3)
CD107a	Cluster of Differentiation 107a (grupo de diferenciação 107a)
LAMP-1	Lysosome-associated Membrane Glycoprotein 1 (glicoproteína de membrana 1 associada ao lisossomo)
NK	Natural Killer cell (célula assassina natural)
NKT	Natural Killer T cell (célula T assassina natural)
iNKT	Invariant Natural Killer T cell (célula T assassina natural invariante)
NKT-like	Natural Killer like T cell (célula semelhante à célula T assassina natural)
NKp43	Natural killer cell p43-related protein (célula assassina natural associada a proteína 43)
NKp44	Natural killer cell p44-related protein (célula assassina natural associada a proteína 44)
NKp46	Natural killer cell p46-related protein (célula assassina natural associada a proteína 46)
NKG2D	Natural Killer Group 2 Member D (célula assassina natural do grupo 2 membro D)

MHC I	Major Histocompatibility Complex I (Complexo de histocompatibilidade principal I)
MHC II	Major Histocompatibility Complex II (Complexo de histocompatibilidade principal II)
MICA/B	Major Histocompatibility Complex class I-related chain A/B (Complexo de histocompatibilidade principal I associado à cadeia A/B)
TLR	Toll Like Receptor (receptor do tipo toll)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
APC	Antigen Presenting Cell (Célula Apresentadora de Antígeno)
RPMI-1640	Meio de Cultura
IS	Indivíduos Sadios
LCR	Leishmaniose Cutânea Recente
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucosa
LD	Leishmaniose Disseminada
SSC	Side scatter (dispersão lateral)
FSC	Forward scatter (dispersão frontal)
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting (separação celular ativada por fluorescência)
RPM	Rotações por minuto
MEC	Matriz Extracelular
MMP	Matrix metalloproteinases (metaloproteinases de matriz)

I. RESUMO

DICOTOMIA FUNCIONAL DE CÉLULAS NK NA LEISHMANIOSE CUTÂNEA: PARTICIPAÇÃO NA PATOGÊNESE E DESTRUIÇÃO DE PARASITOS

Introdução: Leishmaniose cutânea (LC) devido à infecção por *L. braziliensis* é caracterizada pelo desenvolvimento de lesões cutâneas ulcerativas. Recentemente, atenção tem sido dada à participação das células T CD8⁺ para a resposta inflamatória deletéria observada em pacientes com LC. Foi demonstrado que estas células contribuem para a imunopatologia através da produção de citocinas pró-inflamatórias, granzima e perforina. Em adição às células T CD8⁺, células NK e NKT são também importantes fontes de citocinas pró-inflamatórias, granzima e perforina, e o papel destas células na infecção por *L. braziliensis* ainda não foi investigado. **Objetivo:** Avaliar o papel das células NK na infecção por *L. braziliensis*. **Métodos:** As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas a partir de indivíduos saudáveis e de pacientes com LC para a marcação *ex-vivo* com CD56, CD8, CD3, e marcação intracelular para granzima e perforina. As células derivadas de biópsias foram obtidas para imunofenotipagem por citometria de fluxo e imunohistoquímica. **Resultados:** Identificamos quatro sub-populações de células citotóxicas: células NK (CD8⁻CD3⁻), células NK (CD8^{dim}CD3⁻), células NKT-like (CD8^{brigh}CD3⁺) e células T CD8⁺. Observamos que as frequências de sub-populações de células NK (CD8⁻ e CD8⁺) estavam aumentadas no sangue periférico de pacientes com LC quando comparadas com IS, e estas duas populações expressam mais granzima e perforina do que as células T CD8⁺ em pacientes com LC. Observamos ainda que as células NK derivadas de lesões de pacientes com LC expressam mais CD107a, marcador de degranulação, do que as células T CD8⁺. E que as células NK contribuem para destruição de parasitos na infecção por *L. braziliensis*. **Conclusão:** Os nossos dados sugerem uma dicotomia funcional das células NK na leishmaniose cutânea, participando tanto na patogênese da doença quanto na destruição de parasitos. **Palavras-chave:** leishmaniose cutânea, células NK, linfócitos citotóxicos, citotoxicidade.

II. OBJETIVOS

II.1 GERAL

Avaliar o papel das células NK na infecção por *L. braziliensis*.

II.2 ESPECÍFICOS

1. Caracterizar fenotipicamente as sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com LC e comparar as frequências destas células entre os grupos.
2. Avaliar e comparar a capacidade citotóxica das sub-populações de células citotóxicas do sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com LC.
3. Determinar e comparar a frequência e a capacidade citotóxica de células T CD8⁺ e células NK em biópsias de pacientes com LC.
4. Avaliar a contribuição das células NK no controle da infecção por *L. braziliensis*.

III. INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitida ao homem pela picada de flebótomos infectados com o parasita e caracterizada pelo aparecimento de lesões ulcerativas que acometem a pele e as mucosas (Desjeux 1996). A ação coordenada das respostas imune inata e adaptativa é fundamental para uma resposta imune protetora contra a *Leishmania*. As células NK representam a primeira linha de defesa da resposta imune do hospedeiro após a invasão do parasito, atuando como principal fonte de IFN- γ no início da infecção, direcionando, desta maneira, a uma resposta Th1 (Gorak, Engwerda et al. 1998). A susceptibilidade ou resistência à doença está relacionada a uma resposta mediada por linfócitos (TCD4⁺ e TCD8⁺) (Scott, Natovitz et al. 1988), os quais atuam como fonte produtora de citocinas, como TNF e INF- γ , importantes para o controle da infecção (Pirmez, Yamamura et al. 1993; Da-Cruz, Bittar et al. 2002).

A presença de células T CD8⁺ e NK e suas atividades citotóxicas no infiltrado celular de lesões de pacientes com LC sugerem não só a participação ativa destas células na morte do parasito, mas também no desenvolvimento da ulceração (Machado, Kanitakis et al. 2002). Faria et al., (2009) observaram que a frequência de células T CD8⁺ expressando granzima B está diretamente associada com a intensidade da reação inflamatória em úlceras de pacientes com LC (Faria, Souza et al. 2009). Recentemente, foi demonstrada a contribuição das células T CD8⁺ para o dano tecidual em pacientes com LC. Santos Cda et al., 2013 observaram que células derivadas da lesão de pacientes com LC após a

infecção por *L. braziliensis* apresentaram um aumento da expressão de CD107a quando comparadas as células não estimuladas. Além disso, foi observada a co-localização de células T CD8⁺ e Granzima B nas biópsias destes pacientes e uma correlação positiva entre a frequência de células T CD8⁺ granzima B⁺ com o tamanho da lesão (Santos Cda, Boaventura et al. 2013). A expressão de CD8 é frequentemente aplicada na caracterização de células T CD8⁺ no sangue, porém algumas células NK (CD3⁻) são conhecidas por expressarem CD8 (Addison, North et al. 2005). Como a capacidade citotóxica de células NK ainda não foi muito estudada na leishmaniose, e sabendo-se que existe uma sub-população destas células que expressa CD8, nossa hipótese é que as sub-populações de células NK possuem capacidade citotóxica mais acentuada do que as células T CD8⁺, contribuindo não só para a destruição de parasitos, como também para a patogênese da doença.

IV. REVISÃO DA LITERATURA

IV.1 LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA (LTA)

IV.1.1 Epidemiologia, Aspectos Clínicos e Imunológicos

As leishmanioses são um grupo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, transmitidas ao homem através da picada de flebótomos infectados por estes parasitos. São divididas em três tipos principais: visceral (ou calazar), a forma mais grave da doença (LV); cutânea, a mais comum (LC); e mucocutânea. Constituem um problema de saúde pública, sendo endêmicas em mais de 98 países e territórios (World Health Organization. 2015).

A leishmaniose cutânea é a forma clínica mais amplamente distribuída, cerca de um terço dos casos ocorrem em cada uma das três regiões epidemiológicas: Américas, bacia do Mediterrâneo e Ásia, e sua estimativa anual é de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos. O Brasil está entre os dez países com as maiores estimativas de casos, os quais juntos representam 70 a 75% da incidência global estimada da LC. Além de possuir uma ampla distribuição mundial, a leishmaniose tegumentar é uma doença epidemiologicamente instável com grandes flutuações, observando-se picos de transmissão a cada cinco anos (World Health Organization. 2015).

No Brasil, nos últimos cinco anos, foram registrados cerca de 21.000 casos/ano de LTA, com coeficiente de incidência de 11,3 casos/100.000 habitantes. O maior coeficiente registrado foi o da região Norte (54,4 casos/100.000 habitantes), seguido das regiões Centro-Oeste (22,9 casos/10.000 habitantes) e Nordeste (14,2 casos/100.000 habitantes). O principal agente etiológico da LTA, no Brasil, é a espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis*

(Ministério da Saúde. 2015) e na Bahia, o distrito de Corte de Pedra, localizado no sudeste do estado, é considerado uma das mais importantes áreas de transmissão de *L. braziliensis*, com alta prevalência de casos de LTA. A vila de Corte de Pedra registra as maiores incidências de leishmaniose tegumentar no estado, em 2012 foram notificados 1.814 novos casos da doença. E a detecção de casos novos tem aumentado, em 1985 eram registrados 200/ano, passando para 1000/ano, em 2009. Nesta área endêmica três apresentações clínicas da infecção por *L. braziliensis* são identificadas: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose disseminada (LD) (Jirmanus, Glesby et al. 2012).

A LC é a forma mais comum da LTA representando 90 a 95% dos casos da doença, classicamente se caracteriza pela presença de uma ou mais lesões ulceradas, granulomatosa, com bordas elevadas, geralmente autolimitada, com poucos parasitos, podendo ocorrer cura espontânea (Llanos Cuentas, Cuba et al. 1984; Bittencourt and Barral 1991). Na evolução natural da doença os pacientes apresentam uma pápula ou nódulo seguido de ulceração superficial no sítio de inoculação do parasito que aumenta gradativamente até formar uma úlcera crônica (Da-Cruz, Bittar et al. 2002; Machado, Kanitakis et al. 2002; Unger, O'Neal et al. 2009). Em pacientes com ausência de lesões na pele a linfadenopatia pode ser o primeiro sinal da infecção por *L. braziliensis* (Barral, Barral-Netto et al. 1992; Barral, Guerreiro et al. 1995). A resposta imune dos pacientes com LC é caracterizada por uma alta resposta linfoproliferativa, com altos níveis de citocinas Th1, como IL-2 e INF- γ , e teste de Montenegro positivo (Carvalho, Johnson et al. 1985).

A LM pode se desenvolver como uma complicação da leishmaniose cutânea devido à habilidade dos parasitas persistirem nas lesões cicatrizadas

após a cura clínica. Cerca de 5% dos indivíduos com leishmaniose cutânea pode desenvolver a forma mucosa e ao contrário das lesões de LC, as lesões mucosas não apresentam cura espontânea (Murray, Berman et al. 2005). A LM é uma das formas mais agressivas da LTA, acomete preferencialmente a mucosa nasal, podendo comprometer também o palato, a faringe e a laringe, o que favorece o aparecimento de problemas respiratórios e infecções bacterianas secundárias (Barral-Netto, Barral et al. 1995). A LM resulta de uma exacerbada e mal modulada resposta imune Th1 para antígenos de *Leishmania*, devido à redução da habilidade de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- β , em modular a resposta imune, favorecendo a produção de altos níveis de INF- γ e TNF e maior reatividade ao teste de Montenegro (Bacellar, Lessa et al. 2002).

A LD é uma forma grave e emergente da leishmaniose tegumentar, corresponde a cerca de 2% dos casos de infecção por *L. braziliensis* e caracteriza-se clinicamente pela presença de múltiplas lesões papulosas e acneiformes, localizadas em duas ou mais partes do corpo. Os pacientes apresentam inicialmente uma lesão ulcerada no local da picada do flebótomo, seguida, após um período de dias ou meses, do aparecimento de múltiplas lesões por todo corpo, podendo estar associada a um relato de febre. A resposta imune celular na LD encontra-se diminuída, com menor produção de INF- γ e TNF, o que favorece a multiplicação do parasito e disseminação da doença. Além disso, os pacientes com LD podem apresentar teste de Montenegro positivo ou negativo e baixa resposta linfoproliferativa. Embora o mecanismo de disseminação não esteja totalmente estabelecido, sugere-se que este ocorra por via hematogênica (Carvalho, Barral et al. 1994; Turetz, Machado et al. 2002; Guimarães, Machado et al. 2005).

IV.1.2 Imunopatogênese da leishmaniose cutânea

O espectro clínico das leishmanioses está relacionado com fatores do parasito, do vetor e do hospedeiro (Barral-Netto, Brodskyn et al. 1998; Castellano, Filho et al. 2009; Schriefer, Guimaraes et al. 2009). Em todos os casos, a resposta imune começa com a resposta inata, onde os neutrófilos são recrutados rapidamente para o local da inoculação permitindo a captura da *Leishmania*, através da produção de TNF, espécies reativas de oxigênio e elastase (Peters, Egen et al. 2008; Thalhoffer, Chen et al. 2011; Falcao, Weinkopff et al. 2015). Os neutrófilos também produzem citocinas e quimiocinas, além de interagir com células inflamatórias, tais como fagócitos mononucleares contribuindo para a resistência e susceptibilidade a infecções por *Leishmania* (Scapini, Lapinet-Vera et al. 2000; Ribeiro-Gomes, Otero et al. 2004; Ribeiro-Gomes, Moniz-de-Souza et al. 2007; Novais, Santiago et al. 2009; Ribeiro-Gomes, Peters et al. 2012). Além dos neutrófilos, fagócitos mononucleares são também uma das primeiras populações celulares que interagem com a *Leishmania* no início da infecção, desempenhando um papel fundamental na promoção da resistência ao parasito, principalmente por induzir a produção de IL-12, ativar células T CD4⁺ e promover a sua diferenciação em células Th1. Além disso, a IL-12 aumenta a secreção de IFN- γ por células NK e células T CD4⁺ para promover a destruição de parasitos (Gorak, Engwerda et al. 1998; Lemos, Esquivel et al. 2004).

Enquanto a predominância de uma resposta Th1 está associada a um bom prognóstico para a doença, uma vez que a produção de INF- γ é necessária para a ativação de macrófagos e síntese de derivados de O₂, como óxido nítrico (NO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂), importantes para o controle da infecção. A

predominância de uma resposta Th2, com alta produção de IL-10, está relacionada à multiplicação e estabelecimento do parasito, favorecendo uma resposta imune exacerbada (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998; Bacellar, Lessa et al. 2002).

Neste contexto, as células T CD8⁺ contribuem para a manutenção da resposta imune do tipo Th1, através da produção de citocinas, como o TNF e IFN- γ , e a sua atividade citotóxica, também ajuda a eliminação do parasito (Pirmez, Yamamura et al. 1993; Da-Cruz, Bittar et al. 2002; Wolint, Betts et al. 2004; Pipkin and Lieberman 2007). Enquanto a atividade citotóxica induz a morte de células-alvo, citocinas como IFN- γ e TNF participam no desenvolvimento de respostas inflamatórias benéficas modulando a atividade dos macrófagos e das células dendríticas (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998; Follador, Araujo et al. 2002). Quando estas vias não são adequadamente reguladas, desordens inflamatórias podem ser desenvolvidas, o que é observado na leishmaniose, embora a atividade citotóxica e a produção de citocinas pró-inflamatórias sejam importantes no controle da proliferação da *Leishmania* (Da-Cruz, Conceicao-Silva et al. 1994; Barral-Netto, Barral et al. 1995; Montoya, Lowe et al. 1996; Purner, Berens et al. 1996; Jordan and Hunter 2010; Arias, Jimenez de Bagues et al. 2014). Após a infecção, a maioria dos pacientes desenvolvem linfadenopatia, seguido pelo aparecimento de uma pápula no local da picada, que subsequentemente, se torna em lesão ulcerada caracterizada por um intenso infiltrado inflamatório, incluindo a presença de linfócitos T e B, macrófagos, células de Langerhans e plasmócitos, com poucos ou nenhuns parasitos no local da ulceração (Pirmez, Yamamura et al. 1993; Ribeiro-de-

Jesus, Almeida et al. 1998; Bacellar, Lessa et al. 2002; Da-Cruz, Bittar et al. 2002; Gaze, Dutra et al. 2006).

Citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF, são detectadas em biópsias de pacientes com LC (Antonelli, Dutra et al. 2005). Esta citocina contribui para a destruição da *Leishmania*, mas induz danos nos tecidos, contribuindo para a patogênese da doença (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998; Bacellar, Lessa et al. 2002; Da-Cruz, Bittar et al. 2002). Além de citocinas pró-inflamatórias, atividade citotóxica também é observada em lesões de LC. Machado et al., (2002) observaram a presença de células T CD8⁺ e células NK e as suas atividades citotóxicas no infiltrado celular de lesões de pacientes com LC (Machado, Kanitakis et al. 2002), mostrando a participação ativa destas células na infecção por *L. braziliensis*.

IV.2 CLASSIFICAÇÃO E CARACTERÍSTICAS FUNCIONAS DE CÉLULAS NK E NKT

As células NK compreendem aproximadamente 10 a 15% de todos os linfócitos circulantes e são cruciais para a resposta imune inata devido à sua habilidade de produzir rapidamente citocinas e lisar células alvo sem prévia sensibilização (Cooper, Fehniger et al. 2001). Até o momento, não existe um único marcador de superfície capaz de identificar todas as células NK em humanos. Noventa e cinco por cento das células NK são caracterizadas como células CD3⁻/CD56⁺, enquanto que 5% são conhecidas por expressarem tanto CD3 quanto CD56, e por serem capazes de realizar citotoxicidade não restrita ao MHC-I. Com base na densidade de expressão na superfície celular da molécula CD56, duas sub-populações de células NK podem ser identificadas em humanos.

A maioria (90%) de células NK humanas possuem baixa densidade de expressão de CD56 (CD56^{dim}) e alta expressão do receptor de baixa afinidade para imunoglobulinas G (FcγRIII, CD16), e representam a sub-população de células NK mais citotóxica. Enquanto que 10% das células NK apresentam uma alta densidade de expressão de CD56 e uma baixa expressão de CD16 (CD56^{bright}CD16^{dim}) ou uma alta densidade de expressão de CD56 e não expressam CD16 (CD56^{bright}CD16⁻) e possuem maior habilidade para produção de citocinas e menor capacidade citotóxica (Cooper, Fehniger et al. 2001; Vokurková, Vávrováb et al. 2010). Já os linfócitos T citotóxicos são caracterizados pela co-expressão do receptor de células T (TCR), e das moléculas CD3 e CD8 e por reconhecerem antígenos via MHC-I. Além dos linfócitos T citotóxicos, 30-40% das células NK são conhecidas por expressarem a molécula CD8⁺ porém, a densidade de expressão deste marcador é menor nas células NK do que nas células T CD8⁺ (Robertson and Ritz 1990; Vokurková, Vávrováb et al. 2010). Campbell et al, demonstrou que 25% de todas as células CD8⁺ são CD3 negativas, CD8^{dim} e expressam marcadores de células NK (CD56 e CD16) (Campbell, Guy et al. 2008).

Menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico humano expressam tanto marcadores de células NK quanto marcadores de células T e são conhecidas como células T NK (NKT) (Ohteki and MacDonald 1994; Emoto, Mittrucker et al. 1999). O TCR de células NKT não interage com antígenos peptídeos apresentados pelo MHC associado a moléculas de classe I ou II, este TCR interage com antígenos glicolipídicos associados à molécula CD1d, uma molécula apresentadora de antígeno não-clássica. A expressão de CD1d distingue células NK e NKT, mesmo se estas células compartilharem alguns

marcadores característicos de células NK. Desta maneira, dois tipos de células NKT foram descritas: células NKT do tipo I ou células NKT invariantes (iNKT) e células NKT do tipo II ou células NKT não-invariantes. As células iNKT possuem um TCR invariante codificado pelo segmento V α 24-J α 18 associado a cadeia V β 11. Estas células ainda podem ser sub-divididas em dois grupos: iNKT CD4⁺ e iNKT CD4⁻/CD8⁻ (duplo negativas). Enquanto que as células NKT do tipo II possuem TCR variados distintos do segmento V α 24-J α 18 (Lantz and Bendelac 1994; Godfrey, Hammond et al. 2000; Bendelac, Savage et al. 2007; Nyambayar, Iwabuchi et al. 2007; Balato, Unutmaz et al. 2009). Por compartilhar características de células NK e células T, as células NKT participam tanto da resposta imune inata quanto da resposta imune adaptativa, podendo atuar tanto como células efectoras quanto como células reguladoras, sendo capazes de produzir rapidamente altos níveis de IFN- γ ou IL-4 para promover uma resposta Th1 ou Th2, além de interagir indiretamente com células dendríticas (Godfrey, MacDonald et al. 2004; Bendelac, Savage et al. 2007).

Outra população de células, NKT-like, que assim como as células NK e NKT compartilham marcadores comuns entre elas, é restrita a moléculas clássicas de MHC classe I e II, mas não a molécula de MHC não clássica, CD1d, utilizada para distinguir células NK de células NKT (Eberl, Lees et al. 1999; Godfrey, MacDonald et al. 2004; Wingender, Berg et al. 2006; Balato, Unutmaz et al. 2009). Por esta razão Godfrey et al. 2004 sugerem que este grupo seja considerado separadamente, classificando estas células como células NKT-like (Godfrey, MacDonald et al. 2004). Diferentemente das células NKT, as células NKT-like CD8⁺, quando estimuladas, são capazes de produzir IFN- γ , mas não IL-4 (Emoto, Miyamoto et al. 2000).

IV.3 ATIVIDADE CITOTÓXICA DAS CÉLULAS NK E NKT

A atividade das células NK é controlada por um equilíbrio entre sinais de ativação e receptores inibitórios (Lanier 2005). Receptores inibitórios de células NK predominantemente reconhecem proteínas similares à MHC classe I e proporcionam a auto-tolerância para as células saudáveis (Long, Colonna et al. 1996). Células com ausência ou redução da expressão de proteínas de MHC classe I não são capazes de desencadear sinais inibitórios suficientes e tornam-se susceptíveis ao ataque das células NK. Além disso, o aumento da expressão de ligantes para os receptores de ativação de células NK podem tornar as células-alvo sensíveis ao ataque das células NK (Gleimer and Parham 2003; Watzl 2003). A atividade citotóxica de células NK é iniciada após o reconhecimento de ligantes presentes nas células-alvo por seus receptores de citotoxicidade naturais, NKp30, NKp44 e NKp46, e NKG2D que também é expresso por células T CD8+. Enquanto os ligantes para os receptores de citotoxicidade naturais de células NK permanecem desconhecidos, os ligantes para NKG2D já foram determinados, MICA/B (Watzl 2003; Lanier 2005).

A atividade citotóxica pode ocorrer através de vias de degranulação e não-degranulação por mecanismos dependentes ou independentes de antígeno (Trapani and Smyth 2002; Waterhouse and Trapani 2002; Pipkin and Lieberman 2007; Ruiz and Becker 2007). Na via de degranulação, as células liberam grânulos citotóxicos resultando na apoptose da célula alvo. A outra via, a apoptose da célula alvo é induzida por meio da produção e liberação de citocinas tais como IFN- γ e TNF (Wolint, Betts et al. 2004). As células T CD8⁺, células NK e NKT utilizam dois mecanismos para destruir as suas células-alvo. O primeiro mecanismo, a apoptose é induzida por meio da liberação do conteúdo

de grânulos citotóxicos nas sinapses imunológicas formadas com a célula alvo (Trapani and Smyth 2002). Perforina (proteína formadora de poros) usualmente trabalha em conjunto com granzimas (grânulos serino-proteases) para promover a citotoxicidade. A perforina facilita a entrada das granzimas para a célula, através da formação de poros na membrana da célula alvo. Depois de serem entregues ao citoplasma da célula alvo por perforina, as granzimas induzem a morte celular programada, através de fragmentação do DNA (Trapani 2001; Trapani and Smyth 2002; Pipkin and Lieberman 2007; Ruiz and Becker 2007). Esta é uma das vias de morte celular mais potente utilizada por células T CD8⁺ ativadas e células NK, e esta via pode ocorrer através da ativação de proteases baseadas em cisteínas (caspases), ou pode também conduzir à morte de células na ausência de caspases ativadas (Waterhouse, Sutton et al. 2006; Pipkin and Lieberman 2007; Hoves, Trapani et al. 2010). O segundo mecanismo envolve a ligação e a agregação de receptores à ligantes presentes nas células-alvo, tais como FAS (CD95), por seus ligantes, como FAS ligante (FASL), o que resulta na apoptose dependente de caspase (Waring and Mullbacher 1999; Trapani and Smyth 2002).

Granzimas estão envolvidas não só na morte celular por apoptose, como também em outras funções, incluindo a regulação da proliferação de células B, a clivagem de proteínas da matriz extracelular e a indução e ativação de citocinas (Coughlin, Morris et al. 2000; Trapani 2001). As granzimas formam uma família de serina-proteases encontradas nos grânulos de linfócitos citotóxicos, cinco membros desta família foram descritas em seres humanos, sendo as mais abundantes e estudadas as granzima A e B. Nos seres humanos, granzimas são secretadas apenas por células NK e células T. Em linfócitos citotóxicos, grânulos

líticos são compostos de lisossomas secretoras contendo um centro denso, onde estão incluídos as granzimas e perforinas (Trapani 2001; Thiery, Keefe et al. 2011). Este centro é coberto por uma glicoproteína de membrana lisossomal (LAMP-1), também conhecido como CD107a. Quando ocorre a degranulação dos linfócitos citotóxicos, CD107a é expressa na superfície da célula sendo assim um marcador para liberação de grânulos citotóxicos (Betts, Brenchley et al. 2003).

IV.4 PAPEL DA ATIVIDADE CITOTÓXICA NA PATOGÊNESE DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A citotoxicidade é um dos principais mecanismos patológicos induzido pela infecção por *L. braziliensis*. Trabalhos recentes sugerem que, ao invés de ser uma consequência da patologia, a citotoxicidade pode impulsionar a imunopatologia observada em lesões de pacientes com LC (Faria, Souza et al. 2009; Dantas, Oliveira et al. 2013; Novais, Carvalho et al. 2013; Santos Cda, Boaventura et al. 2013; Cardoso, Machado et al. 2015; da Silva Santos, Attarha et al. 2015; Novais, Carvalho et al. 2015).

Uma análise de microarranjo realizada com biópsias de pele normal e de lesões de pacientes com LC revelou um enriquecimento significativo em vias envolvidas na citotoxicidade mediada por células NK, e que estas vias estão grandemente enriquecidas nas lesões de pacientes com LC em comparação com as lesões dos pacientes com psoríase, sugerindo que esta é uma característica associada à resposta patológica da LC. Além disso, lesões não ulceradas e lesões ulceradas apresentaram um perfil similar, indicando que em lesões não ulceradas as vias inflamatórias já estão ativadas (Novais, Carvalho et al. 2015). A

expressão de mediadores de citólise tal como, granzima B, granzima A, granulicina e perforina em lesões de pacientes com LC (Novais, Carvalho et al. 2013) reforça a participação da citotoxicidade na patogênese da leishmaniose. Os mecanismos de morte celular induzidos pela granzima B através da via mitocondrial foram observados em lesões de pacientes com LC. Da Silva Santos et al., (2015), encontraram uma correlação positiva entre a expressão de caspase-9 e caspase-3, bem como de caspase-9 e granzima B. A via das caspases também se associou com a progressão da lesão desde que foi observada uma correlação positiva entre a expressão das proteínas caspase-9, caspase-3, granzima B e o tamanho da lesão em pacientes com LC (da Silva Santos, Attarha et al. 2015).

Modelos murinos têm sido usados para estudar a resposta imune inata e adaptativa nas infecções por diversas espécies de *Leishmania*. Uma evidência adicional para o efeito deletério da citotoxicidade por células T CD8⁺ foi observada por Novais et al., (2013), em camundongos infectados por *L. braziliensis* a progressão e metástases da doença foram diretamente associadas com a presença de células T CD8⁺. Além disso, esses autores identificaram que a atividade citotóxica patológica de células T CD8⁺ foi dependente de perforina (Novais, Carvalho et al. 2013). Mais recentemente, células T CD8⁺ “bystander” de memória expressando NKG2D também foram associadas com a imunopatologia na leishmaniose. Crosby et al., (2014), demonstraram a contribuição das células T CD8⁺ para o aumento da imunopatologia seguida da infecção por *L. major*. Camundongos previamente infectados com patógenos virais ou bacterianos e mais tarde infectados com *L. major* desenvolveram lesões significativamente maiores, com um aumento do número de células T CD8⁺ NKG2D⁺ (Crosby, Goldschmidt et al. 2014).

V. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

V.1 ÁREA DO ESTUDO

Corte de Pedra é um vilarejo pertencente ao município de Presidente Tancredo Neves, localizado no Sudeste do estado da Bahia, há 280 km de Salvador. Neste vilarejo está localizado o posto de saúde “ Centro de Referência em Leishmaniose Dr. Jackson M. L. Costa” referência para o diagnóstico e tratamento da leishmaniose tegumentar em 12 municípios que estão dentro de uma área de 35 km do Posto de Saúde. A cada duas semanas, uma equipe de médicos e pesquisadores vinculados ao Serviço de Imunologia do Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos (C-HUPES), visita esta região e presta assistência aos indivíduos acometidos por esta doença, sendo nesta ocasião selecionados os casos que participarão deste projeto de pesquisa.

V.2 DESENHO DO ESTUDO

Este estudo é um corte transversal com pacientes residentes na área endêmica de Corte de Pedra e com indivíduos sadios não pertencentes a esta área. No total, considerando todos os experimentos realizados, a amostra foi composta por 18 indivíduos sadios e 40 pacientes com LC.

V.3 DEFINIÇÕES DOS CASOS

V.3.1 Leishmaniose Cutânea (LC)

Esta forma clínica da leishmaniose caracteriza-se pela presença de lesão ulcerada na pele, sem evidência de envolvimento da mucosa. Sendo o diagnóstico definido pela detecção de DNA para *L. braziliensis* por PCR.

V.3.2 Indivíduos Sadios (IS)

Este grupo é caracterizado por indivíduos sadios, residentes em área não endêmica de leishmanioses, ou seja, residentes de uma região geográfica onde provavelmente não existe exposição à *L. braziliensis*, no caso do presente estudo na cidade de Salvador-Bahia.

V.4 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram incluídos indivíduos de ambos os gêneros, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, residentes na área endêmica que apresentaram diagnóstico de leishmaniose baseados nos critérios de definições de casos descritos acima.

Para o grupo controle foram incluídos indivíduos sadios de ambos os gêneros, com idade superior a 15 anos e inferior a 60, não residentes na área endêmica e sem história prévia de leishmaniose.

V.5 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo pacientes com história prévia de LTA, mulheres grávidas e pacientes com outras doenças infecciosas ou com deficiência imunológica.

V.6 CÁLCULO AMOSTRAL

O cálculo amostral foi realizado utilizando o programa G*Power versão 3.19.2 a partir de um experimento piloto com seis indivíduos sadios e seis pacientes com LC utilizando os critérios de seleção reproduzidos na coleta de dados. A partir dos dados da variável frequência de células NK (CD56+CD8-

CD3-) do sangue periférico o tamanho do efeito (d) encontrado foi de 1,15 e o tamanho amostral de 12 pacientes, considerando α igual a 5% e poder de 95%.

V.7 MÉTODOS EXPERIMENTAIS

V.7.1 Separação de células mononucleares do sangue periférico

Os grupos controle e de pacientes foram submetidos à coleta de 20 ml de sangue venoso periférico. O sangue foi coletado em tubo Falcon de 50 ml estéril contendo heparina (1000U/ml). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através de gradiente de concentração com Ficoll-PaqueTM Plus (GE healthcare, Biosciences AB Durhman, NC, USA). Após centrifugação a 1450 rpm durante 30 minutos a 25° C, um anel de CMSP foi obtido entre a mistura de Ficoll-Hypaque e o plasma. Em seguida, as CMSP foram centrifugadas duas vezes a 1290 rpm durante 10 minutos, com solução salina (0,9% de NaCl). As CMSP foram contadas em câmara de Newbauer, ajustando-se a concentração de interesse de acordo com cada ensaio realizado.

V.7.2 Purificação de células NK a partir de células mononucleares do sangue periférico

O grupo controle foi submetido à coleta de 60 ml de sangue venoso periférico. O sangue foi coletado em tubos Falcon de 50 ml estéril contendo heparina (1000U/ml). As células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram isoladas através de gradiente de concentração, como descrito anteriormente. Após a separação das CMSP, as células NK (CD56+CD8+/CD8-CD3-) foram purificadas utilizando o kit de separação por beads magnéticas (CD56+CD8+/CD8- NK Cell Isolation Kit, human, Milteny Biotec) de acordo com as recomendações do fabricante.

V.7.3 Cultura de células mononucleares do sangue periférico

CMSP foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, InvitrogenTM América do Sul), 10 IU/ml de penicilina e 100µg/ml de streptamicina e ajustadas para concentração 3×10^6 células/ml, para placas com 24 poços, ou 1×10^6 células/ml, para tubos de 5ml com tampa. Cultura por 72 horas foi realizada na presença ou ausência de SLA (5µg/ml). Cultura por 12 horas foram realizadas na presença ou ausência anticorpo anti-NKG2D, anti-NKp46 ou anti-MICA/B. As culturas foram deixadas na estufa a 37°C a 5% de CO₂ durante os tempos estabelecidos.

V.7.4 Separação de células mononucleares de biópsias

As biópsias de pacientes com LC foram extraídas do bordo da lesão, utilizando um punch de 4mm e colocadas em tubos estéreis com 1ml de RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, InvitrogenTM América do Sul), 10 IU/ml de penicilina e 100µg/ml de streptamicina. As biópsias foram incubadas com liberase (Roche Diagnostics, Germany) por 1 h a 37°C. Em seguida, foram maceradas e filtradas com filtro de 40 µm (BD falcon cell strainer, BD PharmingenTM).

V.7.5 Cultura de células mononucleares da biópsia

As CMSP foram ressuspensas em 1 ml de meio de cultura RPMI-1640 (Gibco Laboratories, Grand Island, NY, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, InvitrogenTM América do Sul), 10 IU/ml de penicilina e 100µg/ml de streptamicina em tubos de 5ml com tampa. A

cultura foi realizada por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂ na presença ou ausência anticorpo anti-NKG2D.

V.7.6 Marcação de superfície celular para análise por citometria de fluxo

As CMSP foram ressuspensas em solução salina e ajustadas para a concentração $0,5 \times 10^6$ células/ml, colocadas em tubos de poliestireno de 5 ml. Foi realizada a marcação de superfície celular *ex-vivo* utilizando os anticorpos monoclonais CD56-PE-Cy5 (BD PhamingenTM), CD56-FITC (BD PhamingenTM), CD8-APC (BD PhamingenTM), CD3-FITC (BD PhamingenTM), CD107a-PE (BD PhamingenTM), MICA/B -APC (BD PhamingenTM), CD11b – FITC (BD PhamingenTM) e CD16-PE (BD PhamingenTM), e para o controle do experimento foram utilizados tubos com todas as fluorescência menos uma (FMO - fluorescence-minus-one), após a adição dos anticorpos diluídos na concentração 1:10 os tubos foram deixados a 4°C, protegidos da luz, por 15 minutos. Em seguida, as CMSP foram lavadas com solução salina (0,9% NaCl) e fixadas com paraformaldeído a 2%.

V.7.7 Marcação intracelular para análise por citometria de fluxo

As CMSP marcadas superfície celular foram lavadas com solução salina (0,9% de NaCl) e ressuspensas em BD Perm/Wash 1x por 15 minutos, para a marcação intracelular. Após este período, as células foram lavadas e marcadas com anticorpo monoclonal Perforina-FITC (BD PhamingenTM), Granzima-APC (Abcam) ou TNF-FITC (BD PhamingenTM) diluído na concentração 1:10, por 30 minutos e protegidas da luz a 4°C. Em seguida, as CMSP foram lavadas com BD Perm/Wash 1x e ressuspensas em solução salina (0,9% de NaCl). Imediatamente

à marcação foram realizadas as leituras destas células utilizando o FACS Canto II.

V.7.8 Infecção de CMSP com *L.braziliensis*

Isolados de *L. braziliensis* foram obtidos a partir da lesão da pele de paciente com LC e caracterizados quanto à espécie pelo método de eletroforese de enzima multilocus (Cupolillo et al. 1994). Após isolamento, o parasito foi criopreservado em nitrogênio líquido. Antes da infecção, o isolado foi retirado do nitrogênio líquido e após o descongelamento, transferido para o meio Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, InvitrogenTM América do Sul) e 2% de urina estéril e mantido a 24°C para acompanhamento dos estágios de crescimento do parasito.

As CMSP foram infectadas por 1h com promastigotas de fase estacionária (5-7 dias) na proporção de 5:1 *Leishmanias*/monócitos, o número de células foi ajustado considerando 10% de monócitos no sangue periférico. Após a infecção as culturas foram centrifugadas por duas vezes com solução salina estéril a 0,9% (a 1000 rpm por 10 minutos) para a remoção dos parasitas não internalizados pelos monócitos.

V.7.9 Co-Cultura e neutralização dos receptores NKp46, NKG2D e dos ligantes MICA/B

As CMSP infectadas com *L. braziliensis* foram colocadas em co-cultura com as células NK isoladas do sangue periférico na proporção de 5:1 NK/monócitos. Esta proporção foi realizada considerando 10% de monócitos no

sangue periférico. A cultura foi realizada por 12 horas a 37°C e 5% de CO₂ na presença ou ausência dos anticorpos anti-NKp46, anti-NKG2D e anti-MICA/B.

V.7.10 Viabilidade de parasitos

Após 12 horas, as CMSP infectas em co-cultura com células NK com ou sem os inibidores foram lavadas e o meio trocado para Schneider (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB 12657 Gibco Laboratories, InvitrogenTM América do Sul) e 2% de urina estéril e mantido a 27°C a 5% de CO₂ por 24 horas. Em seguida, as leishmanias vivas foram contadas com câmara de Neubauer. A quantificação das promastigotas viáveis foi feita através da técnica de microscopia óptica em câmara de Neubauer observando a motilidade das promastigotas em meio Schneider.

V.7.11 Microarranjo baseado no perfil de expressão gênica de lesões de LC

Para a análise de microarranjo foram coletadas 10 biópsias de IS e 25 biópsias de lesão de LC e preservadas em RNAlater (Qiagen). Os microarranjos e as análises de dados foram realizados conforme previamente descrito (Beiting, Peixoto et al. 2014). Para este trabalho apenas os dados de expressão dos ligantes MICA/B foram utilizados.

V.7.12 Análise Imunoistoquímica

Os tecidos obtidos a partir de biópsias de lesões de pacientes com LC foram fixados em formol tamponado e embebidos em parafina. A desparafinização (5 µm de espessura), a recuperação antigênica e a desidratação foi realizada utilizando TrilogyTM 1:100 (Cell Marque, EUA) a 96° C. As reações de imunohistoquímica foram realizadas após bloqueio da atividade da

peroxidase com 3% de peróxido de hidrogênio durante 5 minutos e de proteínas com Protein Block Serum-Free (DAKO, EUA) durante 15 minutos. As lâminas foram incubadas a 25° C com os respectivos anticorpos e diluições: anti-CD56 (Thermo Scientific, EUA), 1:100 e anti-MICB (AbD Serotec, UK), 1:100. O kit KP500 (Peroxidase Mouse & Rabbit Kit - DBS USA) foi utilizado para realizar a reação de acordo com as recomendações do fabricante. Todas as lâminas foram contracoradas em hematoxilina de Harris, desidratadas e montadas com lamínulas e bálsamo do Canadá. Cortes controles, sem adição de anticorpo primário, foram utilizados como controle negativo em todas as reações.

Para avaliação das populações celulares presentes no tecido, as secções histológicas foram analisadas em microscópio óptico (Olympus BX51) com câmera digital (Olympus Q5) acoplada ao computador, e o software Image-Pro Plus, Media Cybernetics foi utilizado para análise da imagem. As lâminas foram fotografadas (cinco campos aleatórios de cada secção) em 40x e coradas com os respectivos anticorpos. Em cada campo o número de células positivas foi quantificada usando o recurso de seleção e contador semi-automático do software ImageJ 1.48v (NHI, EUA). As células positivas foram definidas pela identificação das moléculas amplificadas que reagiram com o substrato cromogênico, DAB. Em todas as reações, um padrão de secção pré-selecionado, foi utilizado como controle positivo, e uma secção que não tinha sido incubada com o anticorpo primário, para o controle negativo.

V.8 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados utilizando o programa Graphpad prism 5.0 (Graphpad software, San Diego, CA, USA). Os dados apresentaram distribuição

não-paramétrica segundo o teste da normalidade de D'Agostino-Pearson. O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações entre duas variáveis contínuas independentes, para as variáveis contínuas dependentes foi utilizado o teste U de Wilcoxon. O teste de Kruskal-Wallis e o pós-teste de Dunn foram utilizados para a comparação de três variáveis contínuas. As diferenças foram consideradas estatisticamente significantes quando o valor de p foi menor que 0.05.

V.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do Complexo Hospitalar Universitário Professor Edgar Santos (cadastro 25/12) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) com número do parecer 612.907. Todos os participantes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e a confidencialidade dos dados foi preservada de acordo com o disposto da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

VI. MANUSCRITO 1

“CYTOTOXIC ACTIVITY IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS”. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene (submetido, *vide* Normas de Publicação no ANEXO I e a carta ao Editor, no ANEXO II).

MINI-REVIEW

CYTOTOXIC ACTIVITY IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Taís M. Campos^{1,2} Rúbia Costa^{1,2}, Sara Passos^{1,3} and Lucas P. Carvalho^{1,2,3,4*}

(1) Immunology Service, Federal University of Bahia. Salvador, Brazil; (2) Postgraduate Program in Health Sciences, School of Medicine, Federal University of Bahia. Salvador, Brazil; (3) National Institute of Science and Technology - Tropical Diseases. Salvador, Brazil; (4) Advanced Laboratory of Public Health, CPqGM, Fiocruz. Salvador, Brazil.

ABSTRACT: Cutaneous leishmaniasis is a chronic diseases caused by species of *Leishmania* protozoan and characterized by the presence of skin ulcerated lesions. It is known that both, parasite and host factors have influence on the clinical presentation of the disease. The skin ulcer development in cutaneous leishmaniasis is associated with inflammatory response mediated by cells that are important for the control of parasite growth but also contribute to the pathogenesis. It has been shown that CD8⁺ T cells are involved in a deleterious inflammatory response observed in cutaneous leishmaniasis patients through cytotoxic mechanisms. In addition, NK cells also contribute with effector mechanisms against *Leishmania* infections by producing IFN- γ and performing cytotoxicity. In this review, we focus on the advances on studies of cytotoxicity in cutaneous leishmaniasis and its contribution to the pathogenesis of the disease. **KEY-WORDS:** Cytotoxicity; CD8⁺ T cells; NK cells; cutaneous leishmaniasis; immunopathology.

*Address correspondence to: Lucas P. Carvalho, Serviço de Imunologia, Complexo Hospitalar Prof. Edgard Santos (C-HUPES), S/N, 40.110-160, Canela. Salvador, Bahia - Brazil. FAX: +55 71 3245-7110, Tel: +55 71 3237-7353, E-mail: carvalholp@ig.com.br

INTRODUCTION

The outcome of cutaneous leishmaniasis (CL) depends on the parasite species and the type and intensity of immune response^{1, 2, 3}. The coordinated action of innate and adaptive immune responses is fundamental for a protective immune response against *Leishmania*⁴. As cells from innate response, NK cells represent one important line of defense against these parasites, acting as the main source of IFN- γ early in infection, contributing thus to the activation of macrophages to kill *Leishmania*⁴. The susceptibility or resistance to disease is associated with the responses mediated by T lymphocytes (CD4+ and CD8+)⁵, that produce cytokines, such as TNF and INF- γ , important to control infection^{6, 7}. Moreover, those cells mediate effector mechanisms to fight infections, not only through secretion of cytokines and chemokines, but also by performing cytotoxic activity to induce apoptosis of infected cells, as it has been reported⁸. Conversely, some studies have pointed out a role of cytotoxic activity in skin ulcer development in CL patients. Here, we discuss the recent advances in the literature about the contribution of cytotoxic cells to pathogenesis of CL.

CYTOTOXIC ACTIVITY AND PATHOGENESIS OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS

Leishmaniasis is caused by several different species of *Leishmania* protozoan parasites and both, parasite and host factors have influence on the clinical spectrum of the disease^{1, 2, 9}. In the early stage of the infection, neutrophils are recruited rapidly to the site of inoculation, capture *Leishmania* and produce reactive oxygen species and elastase^{10, 11, 12}. Neutrophils also release cytokines, such as TNF, chemokines, and interact with mononuclear

phagocytes contributing to both resistance and susceptibility to *Leishmania* infections^{13, 14, 15, 16, 17}. In addition of neutrophils, mononuclear phagocytes are also one of the first cell populations to interact with *Leishmania*, playing a pivotal role in promoting resistance to the parasite, mainly by inducing the production of IL-12, leading to naïve CD4⁺ T cells differentiation into Th1. IL-12 is also important in inducing IFN- γ secretion by NK cells that can also promote destruction of *Leishmania* by cytotoxicity^{4, 18}. Although *Leishmania* parasites reside in the parasitophorous vacuole there is also antigen presentation via MHC Class I that promotes CD8⁺ T cells immune response contributing to the maintenance of Th1 immune response through the production of TNF and IFN- γ ^{6, 7, 19, 20}. Moreover, it has been documented that CD8⁺ T cell cytotoxic activity is also important to parasite elimination^{19, 21, 22, 23, 24, 25}. While cytotoxic activity induces target cells death, cytokines as IFN- γ and TNF participate in the development of inflammatory responses modulating macrophages and dendritic cells activity^{26, 27}. However, when these pathways are not properly regulated, inflammatory disorders and tissue damage can be developed²⁸. Although the cytotoxic activity and proinflammatory cytokines production are important to the control of *Leishmania* proliferation, after infection, most patients develop lymphadenopathy, followed by the appearance of a papule at the bite site which, subsequently, becomes an ulcerated lesion characterized by intense inflammatory infiltrate including the presence of T and B lymphocytes, mononuclear phagocytes and plasma cells^{6, 7}, with few parasites at the site of ulceration^{26, 29, 30}. High levels of proinflammatory cytokines such as TNF are detected in biopsies of patients with CL³¹. This cytokine contributes to the destruction of *Leishmania*, but also induces cellular adhesion, necrosis and

cytotoxicity, thereby, contributing to disease pathogenesis^{7, 26, 29}. In this sense, CD8⁺ T cells and NK cells participate on immune response against *L. braziliensis* not only contributing to the proinflammatory cytokines production but also playing cytotoxic activity. Machado et al (2002)³² observed the presence of CD8⁺ T cells and NK cells and their cytotoxic activities in lesions of CL patients suggesting not only the active participation of these cells in the death of the parasite, but also in the development of ulceration. IL-10 is the main regulatory cytokine of the immune response and although presence of IL-10 is documented in ulcer of CL and mucosal leishmaniasis (ML) patients low expression of its receptor has been documented what is associated with high frequency of activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells^{29, 30, 33, 34}.

Recent works have demonstrated that cytotoxicity is one of the main mechanisms of disease induced by *L. braziliensis* infection^{35, 36, 37, 38, 39, 40, 41}. In a recent transcriptional work performed by our group³⁵ we compared genes expression from lesions of CL patients with those present on normal skin from healthy individuals. Genes associated with cytolysis, such granzyme B, granzyme A and granulysin, were strongly expressed in CL lesions when compared to normal skin. The same study revealed a significant enrichment of pathways involved in NK cells-mediated cytotoxicity in CL lesions. Interestingly, we also found that NK cells cytolytic pathways present in CL lesions were greatly enriched if compared to skin lesions of patients with psoriasis, suggesting that cytolysis is a pathological characteristic associated with skin ulcers rather than with skin inflammatory plaques. We also found that non-ulcerated papular early lesions from CL individuals had similar transcriptional profile of ulcerated ones, indicating that pathological response

occurs very early after infection in CL patients³⁶. All these results suggest that cytotoxicity may be one of the main mechanisms of immunopathology in CL, instead of being a consequence of pathology.

Cytotoxic is performed by a variety of cells from immune response, including CD8+ T cells, NK and NKT cells, to destroy targets through the release cytotoxic granules, containing perforin and granzymes. Perforin promotes pore forming in target cells membrane facilitating the entry of granzymes inducing programmed cell death through DNA fragmentation^{8, 42, 43, 44}. The cell death pathway can occur through the activation of apoptotic cysteine proteases (caspases) or in the absence of its activation^{44, 45, 46}. The activation of the mitochondrial pathway by granzyme B inducing cell death mechanisms was observed in CL lesions and a positive correlation between expressions of caspase-3 and caspase-9, as well as caspase-9 and granzyme B was observed in these individuals⁴¹. The caspases pathway is also associated with progression of the lesion since it was observed a positive correlation between protein expression of caspase-3, caspase-9 and granzyme B, and lesion size in CL patients⁴¹. Although, cytotoxic mechanisms are used to destroy target cells it was previously shown that cytotoxicity by CD8+ T cells does not control *L. braziliensis* parasites³⁷. Santos et al (2013)³⁷ found that CD8+ T cells in co-culture with *Leishmania*-infected macrophages released granzyme B but had no effect on parasite killing, whereas CD4+ T cells in co-culture with infected macrophages produced IFN- γ and mediated parasite killing. Additionally, association between lesion size with presence of cytotoxic cells has been documented in *L. braziliensis* infections. Faria et al (2009)³⁸ reported that the frequency of CD8+ T cells expressing granzyme is directly associated with the

intensity of inflammation in ulcers from CL patients. Furthermore, patients with ulcerated CL lesions have higher frequency of these cells when compared to those in the initial phase of infection, indicating a participation of CD8⁺ T cells in the progression of the disease. Recently, histopathological analysis of lesion fragments from early CL, late CL and disseminated leishmaniasis (DL) patients showed the presence of CD8⁺granzyme B⁺ lymphocytes in the papillary dermis. The evaluation of the presence of cytotoxic activity in inflammatory infiltrates revealed that recent lesions (less than 20 days of development) had fewer cells expressing granzyme B than late ulcers and ulcers from DL³⁹. Taken together, these data suggest that cytotoxic activity of CD8⁺ T cells and granzyme B production can lead to injury of the basal membrane layer contributing to ulcer formation and disease progression.

Some individuals in *L. braziliensis* transmission areas do not have history of leishmaniasis and have positive *Leishmania* skin test without symptoms what characterizes a sub-clinical infection²⁷. The ratio of infection to disease in a CL endemic area in Northeastern Brazil is 3:1⁴⁷. The evaluation cytotoxic activity from CD8⁺ T cells sub-clinical infection and CL patients showed that CD8⁺ T cells from CL individuals induced more apoptosis of infected monocytes than CD8⁺ T cells from sub-clinical infected subjects, and the production of granzyme B in CD8⁺ T cells was higher in CL individuals that in sub-clinical ones⁴⁰. It suggests that cytotoxic activity in CD8⁺ T cells from CL patients can be involved in pathology, since subjects with sub-clinical infection do not develop lesion. An additional evidence of the deleterious effect of CD8⁺ T cells was shown on *L. braziliensis*-infected mice, where disease progression and metastasis were directly associated with the presence of CD8⁺ T cells and

perforin³⁵. These data indicate that the mechanisms of cell death used by cytotoxic cells for destruction of target cells seems to contribute for tissue damage instead of parasite killing.

To date, the mechanisms of how cytotoxicity lead to tissue damage in CL is not completely understood, however, a few studies have pointed out the participation of some cytolytic molecules in deleterious immune response in *L. braziliensis* infection. In cytotoxic lymphocytes lytic granules are composed of secretory lysosomes containing a dense center of granzyme and perforin proteins^{48, 45}. This center is covered by a lipid bilayer composed of Lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP-1), also known as CD107a⁴⁹. CL lesion tissue cultured in presence of *L. braziliensis* showed an increase in CD107a expression when compared to non-infected control tissue from the same lesion³⁷. Furthermore, it was observed co-localization of CD8+ T cells and granzyme B in biopsies of these patients, and a positive correlation between the frequencies of CD8+ T cells granzyme B+ with lesion size³⁷. We also documented that CD8+ T cells from CL lesions express CD107a, whereas CD8+ T cells from the CL blood do not express it³⁵. Another mechanism of cytotoxicity that does not depend on antigen presentation via MHC class I is through the engagement of NKG2D, present in a variety of cell, including CD8+ T cells and NK/NKT cells. It was observed that memory bystander CD8+ T cells, not specific to *Leishmania* antigens and expressing NKG2D, were able to infiltrate lesion and contribute to immunopathology in mice infected with *L. major*⁵⁰. In this work, mice previously infected with viral or bacterial pathogens and later infected with *L. major* developed significantly larger lesions, with an increased number of NKG2D-positive CD8+ T cells.

Although cytotoxicity can be performed by several cell type, few works have shown the contribution cells other than CD8⁺ T cells for cytolysis in leishmaniasis. The cytotoxic activity of NK cells is initiated after recognition of ligands present on target cells by the receptors NKp30, NKp44 and NKp46, and NKG2D, the last one also expressed by CD8⁺ T cells^{51, 52}. Studies on NK cells showed that the most abundant surface molecule from *Leishmania*, gp63, causes inhibition of human NK cells proliferation and decreases expression of NKp30, NKp44 and CD16⁵³. Differently, *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells via Toll-like receptor 2, leading to the proinflammatory cytokines production, IFN- γ and TNF⁵⁴. It was also demonstrated that recognition of LPG by NK cells leads to lyses of promastigotes but causes destruction of NK cells via a non-apoptotic way⁵⁵. Recently, Naouar et al (2014)⁵⁶ evaluated the cytotoxic immune response of cells from individuals with previous contact with *L. major*. They observed that different CD4⁺ T cell subsets produce granzyme B in response to *Leishmania major* antigens. Although, this results suggest a potential cytotoxic role by CD4⁺ T cells the cytolysis was not assessed in those experiments. Previous works have shown that the main role of CD4⁺ T cells in *L. braziliensis* infections is IFN- γ production for parasite killing^{3, 37}.

Some mechanisms, other than cell death by apoptosis, may also indirectly contribute to pathology in leishmaniasis, for instance, excessive degradation of ECM^{57, 58, 59, 60}. It has been shown that granzymes can activate pro-inflammatory cytokines and degrade multiple components of the extracellular matrix (ECM), which found in chronic wound fluid⁶¹. Treatment of epithelial cells, fibroblasts or monocytes with purified human granzyme A resulted in the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-1 β , IL-6,

IL-8 and TNF, a process that may be dependent on caspase-1^{62, 63}. Granzyme B can indirectly promote inflammation through the activation of cytokines such as IL-18, IL-1 β and IL-1 α ^{61, 64, 65}. One likely explanation of how cytotoxic cells mediate inflammation and tissue injury in CL is that after degranulation of cytotoxic cells, granzyme B and perforin can be released for extracellular space inducing apoptosis of infected macrophage. Additionally, extracellular granzyme B may indirectly induce inflammation through the activation of proinflammatory cytokines and degradation of ECM substrates contributing to tissue injury (Figure 1). These data argues in favor of a possible role for granzymes in amplifying inflammation in *Leishmania* infections, contributing thus to tissue. However, future functional studies have to be performed in order to elucidate the role of granzymes in human CL.

CONCLUDING REMARKS

Taken together, the literature shows that NK cells and T lymphocytes not only participate in the control of *Leishmania* proliferation through IFN- γ production, but also may be involved in the ulceration of skin lesions through tissue disruption by their cytotoxic activity.

REFERENCES

1. Barral-Netto M, Brodskyn C, Carvalho EM, Barral A, 1998. Human_leishmaniasis/cytokines.bahia.br. Braz J Med Biol Res 31: 149-55.
2. Castellano LR, Filho DC, Argiro L, Dessein H, Prata A, Dessein A, Rodrigues V, 2009. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production. Hum Immunol 70: 383-90.
3. Kaye P, Scott P, 2011. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol 9: 604-15.
4. Gorak PM, Engwerda CR, Kaye PM, 1998. Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following Leishmania donovani infection. Eur J Immunol 28: 687-95.
5. Scott P, Natovitz P, Coffman RL, Pearce E, Sher A, 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. J Exp Med 168: 1675-84.
6. Pirmez C, Yamamura M, Uyemura K, Paes-Oliveira M, Conceicao-Silva F, Modlin RL, 1993. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. J Clin Invest 91: 1390-5.
7. Da-Cruz AM, Bittar R, Mattos M, Oliveira-Neto MP, Nogueira R, Pinho-Ribeiro V, Azeredo-Coutinho RB, Coutinho SG, 2002. T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy. Clin Diagn Lab Immunol 9: 251-6.

8. Ruiz JH, Becker I, 2007. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 29: 671-8.
9. Schriefer A, Guimaraes LH, Machado PR, Lessa M, Lessa HA, Lago E, Ritt G, Goes-Neto A, Schriefer AL, Riley LW, Carvalho EM, 2009. Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil. *Emerg Infect Dis* 15: 871-6.
10. Peters NC, Egen JG, Secundino N, Debrabant A, Kimblin N, Kamhawi S, Lawyer P, Fay MP, Germain RN, Sacks D, 2008. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. *Science* 321: 970-4.
11. Thalhoffer CJ, Chen Y, Sudan B, Love-Homan L, Wilson ME, 2011. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi. *Infect Immun* 79: 108-17.
12. Falcao SA, Weinkopff T, Hurrell BP, Celes FS, Curvelo RP, Prates DB, Barral A, Borges VM, Tacchini-Cottier F, de Oliveira CI, 2015. Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis. *PLoS Negl Trop Dis* 9: e0003601.
13. Scapini P, Lapinet-Vera JA, Gasperini S, Calzetti F, Bazzoni F, Cassatella MA, 2000. The neutrophil as a cellular source of chemokines. *Immunol Rev* 177: 195-203.
14. Ribeiro-Gomes FL, Peters NC, Debrabant A, Sacks DL, 2012. Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response. *PLoS Pathog* 8: e1002536.

15. Ribeiro-Gomes FL, Otero AC, Gomes NA, Moniz-De-Souza MC, Cysne-Finkelstein L, Arnholdt AC, Calich VL, Coutinho SG, Lopes MF, DosReis GA, 2004. Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection. *J Immunol* 172: 4454-62.
16. Ribeiro-Gomes FL, Moniz-de-Souza MC, Alexandre-Moreira MS, Dias WB, Lopes MF, Nunes MP, Lungarella G, DosReis GA, 2007. Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase. *J Immunol* 179: 3988-94.
17. Novais FO, Santiago RC, Bafica A, Khouri R, Afonso L, Borges VM, Brodskyn C, Barral-Netto M, Barral A, de Oliveira CI, 2009. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. *J Immunol* 183: 8088-98.
18. Lemos MP, Esquivel F, Scott P, Laufer TM, 2004. MHC class II expression restricted to CD8alpha⁺ and CD11b⁺ dendritic cells is sufficient for control of *Leishmania major*. *J Exp Med* 199: 725-30.
19. Jordan KA, Hunter CA, 2010. Regulation of CD8⁺ T cell responses to infection with parasitic protozoa. *Exp Parasitol* 126: 318-25.
20. D'Oliveira A, Jr., Machado P, Bacellar O, Cheng LH, Almeida RP, Carvalho EM, 2002. Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 35: 7-10.
21. Khan IA, Smith KA, Kasper LH, 1990. Induction of antigen-specific human cytotoxic T cells by *Toxoplasma gondii*. *J Clin Invest* 85: 1879-86.

22. Montoya JG, Lowe KE, Clayberger C, Moody D, Do D, Remington JS, Talib S, Subauste CS, 1996. Human CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes are both cytotoxic to *Toxoplasma gondii*-infected cells. *Infect Immun* 64: 176-81.
23. Purner MB, Berens RL, Nash PB, van Linden A, Ross E, Kruse C, Krug EC, Curiel TJ, 1996. CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans. *Infect Immun* 64: 4330-8.
24. Barral-Netto M, Barral A, Brodskyn C, Carvalho EM, Reed SG, 1995. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 17: 21-8.
25. Da-Cruz AM, Conceicao-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG, 1994. Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun* 62: 2614-8.
26. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM, 1998. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 31: 143-8.
27. Follador I, Araujo C, Bacellar O, Araujo CB, Carvalho LP, Almeida RP, Carvalho EM, 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* 34: E54-8.
28. Arias MA, Jimenez de Bagues MP, Aguilo N, Menao S, Hervas-Stubbs S, de Martino A, Alcaraz A, Simon MM, Froelich CJ, Pardo J, 2014. Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis. *Cell Rep* 8: 420-9.

29. Bacellar O, Lessa H, Schriefer A, Machado P, Ribeiro de Jesus A, Dutra WO, Gollob KJ, Carvalho EM, 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect Immun* 70: 6734-40.
30. Gaze ST, Dutra WO, Lessa M, Lessa H, Guimaraes LH, Jesus AR, Carvalho LP, Machado P, Carvalho EM, Gollob KJ, 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand J Immunol* 63: 70-8.
31. Antonelli LR, Dutra WO, Almeida RP, Bacellar O, Carvalho EM, Gollob KJ, 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol Lett* 101: 226-30.
32. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araujo C, Carvalho EM, 2002. Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 12: 449-51.
33. Faria DR, Gollob KJ, Barbosa J, Jr., Schriefer A, Machado PR, Lessa H, Carvalho LP, Romano-Silva MA, de Jesus AR, Carvalho EM, Dutra WO, 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: 7853-9.
34. Carvalho LP, Passos S, Bacellar O, Lessa M, Almeida RP, Magalhaes A, Dutra WO, Gollob KJ, Machado P, de Jesus AR, 2007. Differential immune regulation of activated T cells between cutaneous and mucosal leishmaniasis as a model for pathogenesis. *Parasite Immunol* 29: 251-8.

35. Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P, 2013. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog* 9: e1003504.
36. Novais FO, Carvalho LP, Passos S, Roos DS, Carvalho EM, Scott P, Beiting DP, 2015. Genomic profiling of human *Leishmania braziliensis* lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology. *J Invest Dermatol* 135: 94-101.
37. Santos Cda S, Boaventura V, Ribeiro Cardoso C, Tavares N, Lordelo MJ, Noronha A, Costa J, Borges VM, de Oliveira CI, Van Weyenbergh J, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn CI, 2013. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 133: 1533-40.
38. Faria DR, Souza PE, Duraes FV, Carvalho EM, Gollob KJ, Machado PR, Dutra WO, 2009. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol* 31: 432-9.
39. Dantas ML, Oliveira JC, Carvalho L, Passos ST, Queiroz A, Machado P, Carvalho E, Arruda S, 2013. CD8⁺ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Med Trop* 46: 728-34.
40. Cardoso TM, Machado A, Costa DL, Carvalho LP, Queiroz A, Machado P, Scott P, Carvalho EM, Bacellar O, 2015. Protective and Pathological Functions of CD8⁺ T Cells in *Leishmania braziliensis* Infection. *Infect Immun* 83: 898-906.

41. da Silva Santos C, Attarha S, Saini RK, Boaventura V, Costa J, Khouri R, Barral-Netto M, Brodskyn CI, Souchelnytskyi S, 2015. Proteome profiling of human cutaneous leishmaniasis lesion. *J Invest Dermatol* 135: 400-10.
42. Trapani JA, Smyth MJ, 2002. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2: 735-47.
43. Trapani JA, 2001. Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases. *Genome Biol* 2: REVIEWS3014.
44. Pipkin ME, Lieberman J, 2007. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol* 19: 301-8.
45. Waterhouse NJ, Sutton VR, Sedelies KA, Ciccone A, Jenkins M, Turner SJ, Bird PI, Trapani JA, 2006. Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis. *J Cell Biol* 173: 133-44.
46. Hoves S, Trapani JA, Voskoboinik I, 2010. The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways. *J Leukoc Biol* 87: 237-43.
47. Unger A, O'Neal S, Machado PR, Guimaraes LH, Morgan DJ, Schrieffer A, Bacellar O, Glesby MJ, Carvalho EM, 2009. Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil. *Am J Trop Med Hyg* 80: 574-9.
48. Thiery J, Keefe D, Boulant S, Boucrot E, Walch M, Martinvalet D, Goping IS, Bleackley RC, Kirchhausen T, Lieberman J, 2011. Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells. *Nat Immunol* 12: 770-7.

49. Betts MR, Brenchley JM, Price DA, De Rosa SC, Douek DC, Roederer M, Koup RA, 2003. Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8⁺ T cells by a flow cytometric assay for degranulation. *J Immunol Methods* 281: 65-78.
50. Crosby EJ, Goldschmidt MH, Wherry EJ, Scott P, 2014. Engagement of NKG2D on bystander memory CD8⁺ T cells promotes increased immunopathology following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog* 10: e1003970.
51. Lanier LL, 2005. NK cell recognition. *Annu Rev Immunol* 23: 225-74.
52. Watzl C, 2003. The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"? *Microbes Infect* 5: 31-7.
53. Lieke T, Nylen S, Eidsmo L, McMaster WR, Mohammadi AM, Khamesipour A, Berg L, Akuffo H, 2008. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. *Clin Exp Immunol* 153: 221-30.
54. Becker I, Salaiza N, Aguirre M, Delgado J, Carrillo-Carrasco N, Kobeh LG, Ruiz A, Cervantes R, Torres AP, Cabrera N, Gonzalez A, Maldonado C, Isibasi A, 2003. *Leishmania* lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. *Mol Biochem Parasitol* 130: 65-74.
55. Lieke T, Nylen S, Eidsmo L, Schmetz C, Berg L, Akuffo H, 2011. The interplay between *Leishmania* promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of *Leishmania* by NK cells and modulation of NK cell activity by *Leishmania* promastigotes. *Parasitology* 138: 1898-909.

56. Naouar I, Boussoffara T, Ben Ahmed M, Belhaj Hmida N, Gharbi A, Gritli S, Ben Salah A, Louzir H, 2014. Involvement of different CD4(+) T cell subsets producing granzyme B in the immune response to *Leishmania major* antigens. *Mediators Inflamm* 2014: 636039.
57. Campos TM, Passos ST, Novais FO, Beiting DP, Costa RS, Queiroz A, Mosser D, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP, 2014. Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e3282.
58. Maretti-Mira AC, de Oliveira-Neto MP, Da-Cruz AM, de Oliveira MP, Craft N, Pirmez C, 2011. Therapeutic failure in American cutaneous leishmaniasis is associated with gelatinase activity and cytokine expression. *Clin Exp Immunol* 163: 207-14.
59. Maretti-Mira AC, de Pinho Rodrigues KM, de Oliveira-Neto MP, Pirmez C, Craft N, 2011. MMP-9 activity is induced by *Leishmania braziliensis* infection and correlates with mucosal leishmaniasis. *Acta Trop* 119: 160-4.
60. Costa JD, Nogueira de Melo AC, Vermelho AB, Meirelles Mde N, Porrozzzi R, 2008. In vitro evidence for metalloproteinase participation in hepatocyte damage induced by *Leishmania chagasi*-infected macrophages. *Acta Trop* 106: 175-83.
61. Hiebert PR, Granville DJ, 2012. Granzyme B in injury, inflammation, and repair. *Trends Mol Med* 18: 732-41.

62. Metkar SS, Mena C, Pardo J, Wang B, Wallich R, Freudenberg M, Kim S, Raja SM, Shi L, Simon MM, Froelich CJ, 2008. Human and mouse granzyme A induce a proinflammatory cytokine response. *Immunity* 29: 720-33.
63. Sower LE, Klimpel GR, Hanna W, Froelich CJ, 1996. Extracellular activities of human granzymes. I. Granzyme A induces IL6 and IL8 production in fibroblast and epithelial cell lines. *Cell Immunol* 171: 159-63.
64. Afonina IS, Tynan GA, Logue SE, Cullen SP, Bots M, Luthi AU, Reeves EP, McElvaney NG, Medema JP, Lavelle EC, Martin SJ, 2011. Granzyme B-dependent proteolysis acts as a switch to enhance the proinflammatory activity of IL-1alpha. *Mol Cell* 44: 265-78.
65. Omoto Y, Yamanaka K, Tokime K, Kitano S, Kakeda M, Akeda T, Kurokawa I, Gabazza EC, Tsutsui H, Katayama N, Yamanishi K, Nakanishi K, Mizutani H, 2010. Granzyme B is a novel interleukin-18 converting enzyme. *J Dermatol Sci* 59: 129-35.

FIGURE 1:

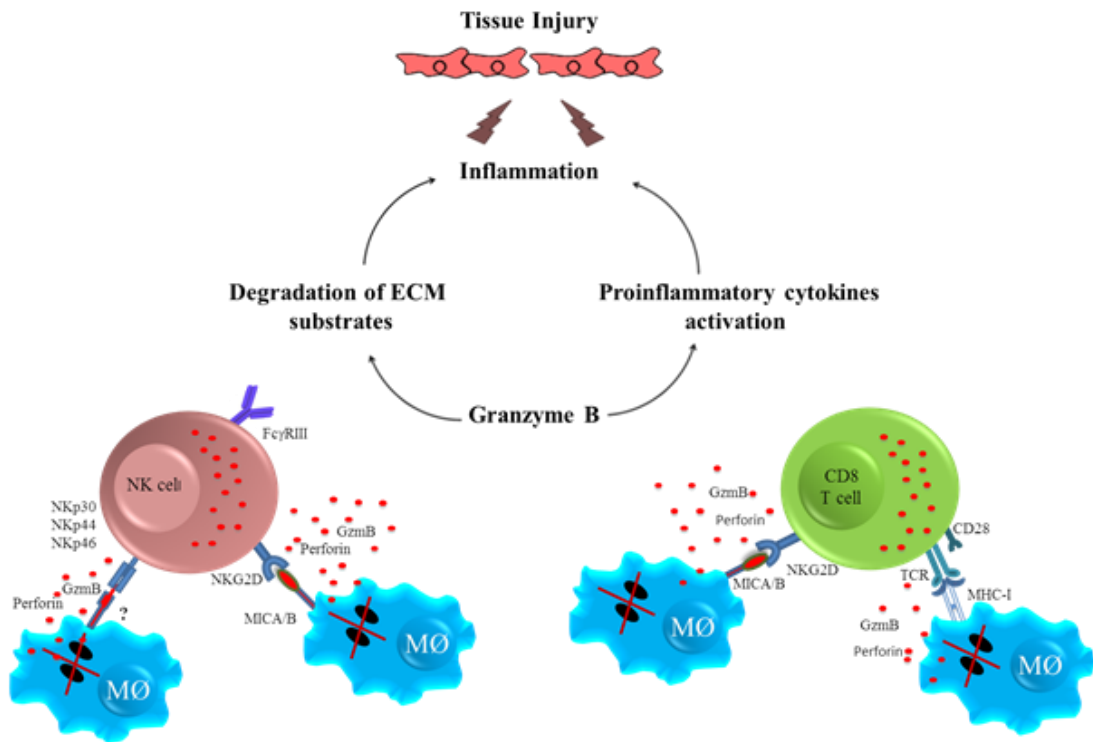


Figure 1. Possible mechanisms for cytotoxic cells mediated tissue damage and inflammation in cutaneous leishmaniasis. After degranulation NK and CD8⁺ T cells, granzyme B and perforin are released inducing apoptosis of infected macrophage. Additionally, granzyme B (GzmB) may indirectly induce inflammation through the activation of pro-inflammatory cytokines and degradation of extracellular matrix (ECM) substrates, contributing to tissue damage.

VII. RESULTADOS:

VII.1 Características clínicas e demográficas de pacientes com LC

As amostras do presente estudo foram coletas no período de março de 2013 a julho de 2015, sendo incluídos 18 indivíduos sadios e 12 pacientes com LC. A amostra foi composta predominantemente por adultos jovens, com mediana de 35 anos no grupo IS e de 22 anos no grupo LC. O grupo IS foi composto predominantemente pelo gênero feminino (63%), enquanto que o grupo LC foi predominantemente composto pelo gênero masculino (83%). As características clínicas dos pacientes com LC estão descritas na tabela 1.

Tabela 1. Dados demográficos e clínicos dos indivíduos sadios e dos pacientes com LC

Variáveis	IS (n=18)	LC (n=12)
Dados Demográficos		
Idade (anos)*	35 (28-39)	22 (17-36)
Gênero n (%)		
Feminino	11 (63%)	2 (17%)
Masculino	7 (37%)	10 (83%)
Dados Clínicos*		
Tamanho da lesão (mm)	NA	20 (2-50)
Número de lesões	NA	1 (1-4)
Duração das lesões (dias)	NA	30 (15-90)

* Valores expressos em Mediana, Min-Máx. IS: indivíduos sadios; LC: leishmaniose cutânea; NA: não se aplica.

VII.2 Identificação de sub-populações de células citotóxicas com base na expressão de CD56, CD8 e CD3

Um dos principais mecanismos de doença induzida pela infecção por *L. braziliensis* é a citotoxicidade (Faria, Souza et al. 2009; Novais, Carvalho et al.

2013; Santos Cda, Boaventura et al. 2013; Cardoso, Machado et al. 2015; da Silva Santos, Attarha et al. 2015; Novais, Carvalho et al. 2015). Considerando que a atividade citotóxica pode ser desempenhada por diferentes tipos celulares, caracterizamos as sub-populações de células citotóxicas com base na expressão dos marcadores de superfície CD56, CD8 e CD3. Identificamos quatro diferentes sub-populações: células NK ($CD56^+CD8^-CD3^-$), células NK ($CD56^+CD8^{dim}CD3^-$), células NKT-like ($CD56^+CD8^{bright}CD3^+$) e células T $CD8^+$ ($CD56^-CD8^+CD3^+$) (Figura 1). Este experimento foi realizado em CMSP *ex-vivo* de indivíduos sadios e pacientes com LC através da técnica de citometria de fluxo.

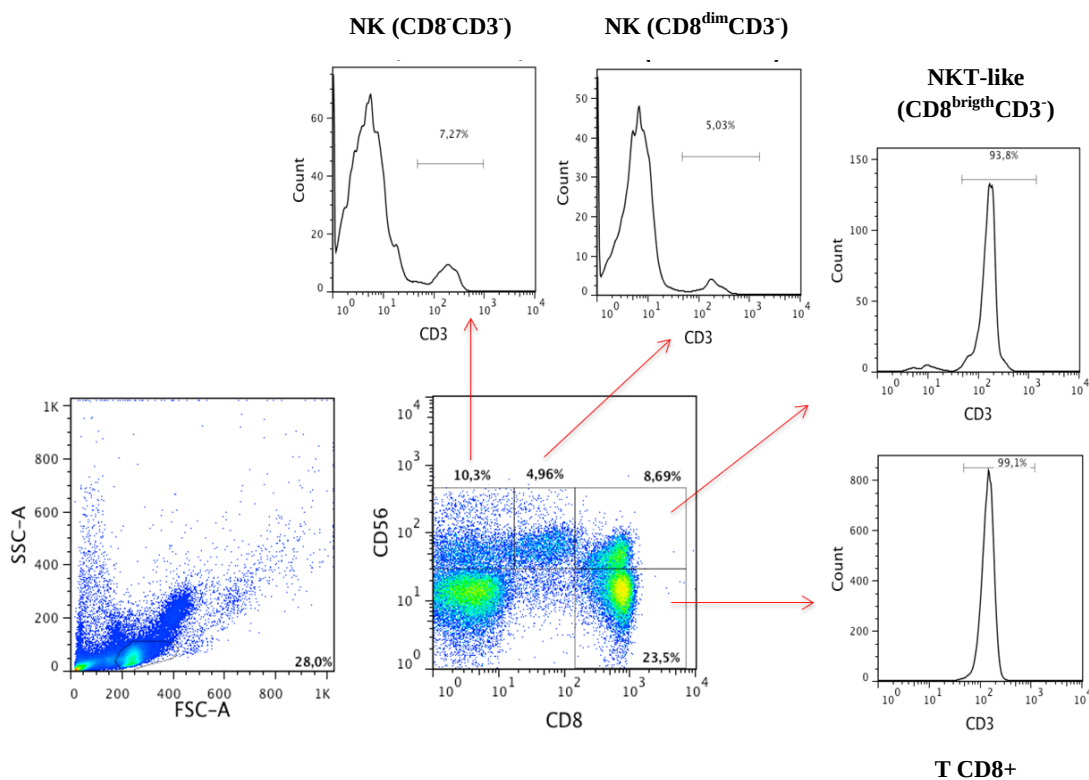
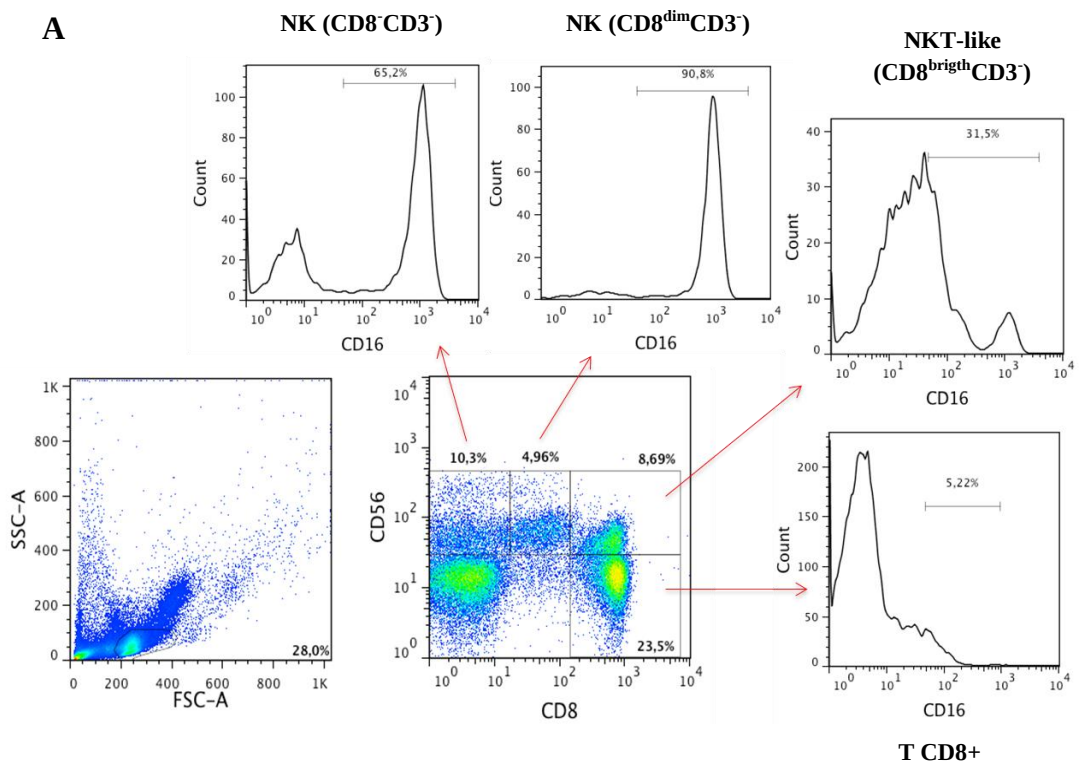


Figura 1. Identificação de quatro sub-populações de células citotóxicas. A região de linfócitos foi determinada de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) das células e as sub-populações de células citotóxicas definidas a partir da expressão de CD56, CD8 e CD3. Dados representativos de quatro experimentos realizados.

VII.3 Expressão do receptor FcγIII (CD16) nas sub-populações de células citotóxicas

A população de células NK humanas é subdividida com base na expressão dos marcadores de superfície CD56 e CD16, e a expressão de CD16 (receptor de baixa afinidade para IgG, FcγRIIIA) na maioria das células NK as tornam fortes mediadores de citotoxicidade celular dependente de anticorpos (Cooper, Fehniger et al. 2001). Com o objetivo de observar a frequência de CD16 nas quatro sub-populações de células citotóxicas, realizamos a análise *ex vivo* de CMSP de indivíduos sadios (IS) e pacientes com LC por citometria de fluxo. A figura 2A mostra a estratégia para a determinação da região (gate) de linfócitos e a determinação da expressão de CD16 em cada subpopulação de acordo com a expressão de CD56 e CD8. Na figura 2B observamos que as subpopulações de células NK (CD8⁻ e CD8^{dim}) expressam mais CD16 do que as células T CD8⁺ em ambos os grupos.



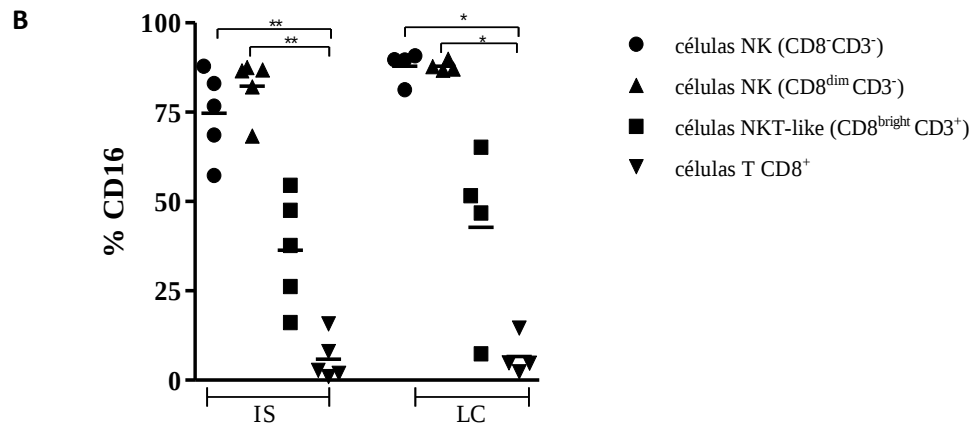


Figura 2. Expressão do receptor FcγIII (CD16) em células NK de indivíduos saudáveis e pacientes com leishmaniose cutânea. (A) A região de linfócitos foi determinada de acordo com o tamanho (FSC) e a granulosidade (SSC) das células e as subpopulações de células citotóxicas definidas a partir da expressão de CD56, CD8 e CD3. A frequência de CD16 em cada subpopulação foi determinada por histograma. Dados representativos de um experimento realizado com quatro pacientes com LC. (B) Frequência de CD16 nas subpopulações de células citotóxicas de IS (n=5) e LC (n=4). Teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparações entre as subpopulações de cada grupo, pós-teste de Dunn. * p <0,05.; ** p <0,005.

VII.4 Frequência das sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC

As células NK atuam como primeira linha de defesa contra patógenos, representando a sub-população de linfócitos citotóxicos capaz de reconhecer e lisar células alvos sem prévia sensibilização (Moretta, Marcenaro et al. 2008). Para determinar a frequência das sub-populações de células citotóxicas na leishmaniose cutânea, CMSP de pacientes com LC e de indivíduos saudáveis foram marcadas *ex-vivo* com anticorpos CD56, CD8 e CD3 e avaliadas por citometria de fluxo. Nós observamos que pacientes com LC apresentam um aumento da frequência de células NK (CD8⁻CD3⁻) e uma diminuição da frequência de células T CD8⁺ quando comparados a indivíduos saudáveis (figura 3).

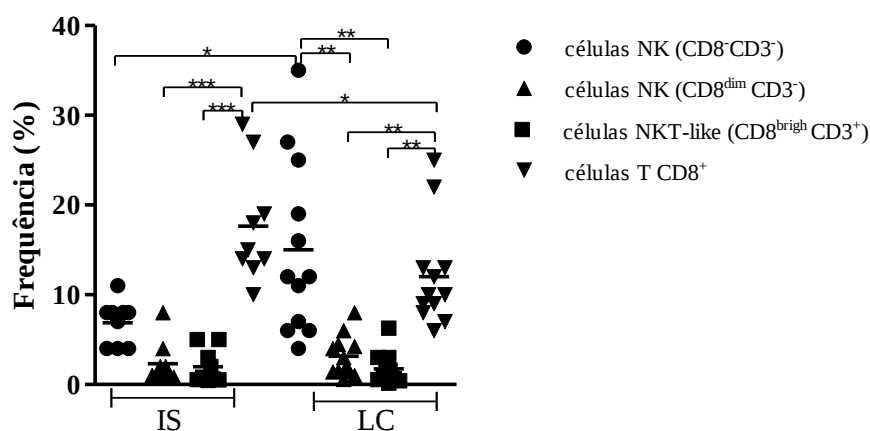


Figura 3. Frequência das sub-populações de células citotóxicas no sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes com LC. Frequência das sub-populações de células citotóxicas de IS (n=9) e LC (n=12). O teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações das sub-populações de células citotóxicas entre os grupos e o teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparações entre as sub-populações dentro de cada grupo, pós-teste de Dunn. * p <0,05, ** p <0,005, *** p <0,0005.

VII.5 Correlação entre a frequência das sub-populações de células citotóxicas e o número de lesões de pacientes com LC

Com objetivo de determinar de que maneira os achados clínicos dos pacientes com LC poderiam estar associados com o aumento da frequência de células NK (CD8⁺CD3⁻) no sangue periférico (figura 3), avaliamos a relação da frequência das sub-populações de células citotóxicas com as variáveis tamanho da lesão, número de lesões e duração das lesões. Os testes de análise de correlação de Spermann mostraram uma correlação positiva entre a frequência de células NK (CD8⁺CD3⁻) e de células NK (CD8^{dim}CD3⁻) com o número de lesões (figura 4).

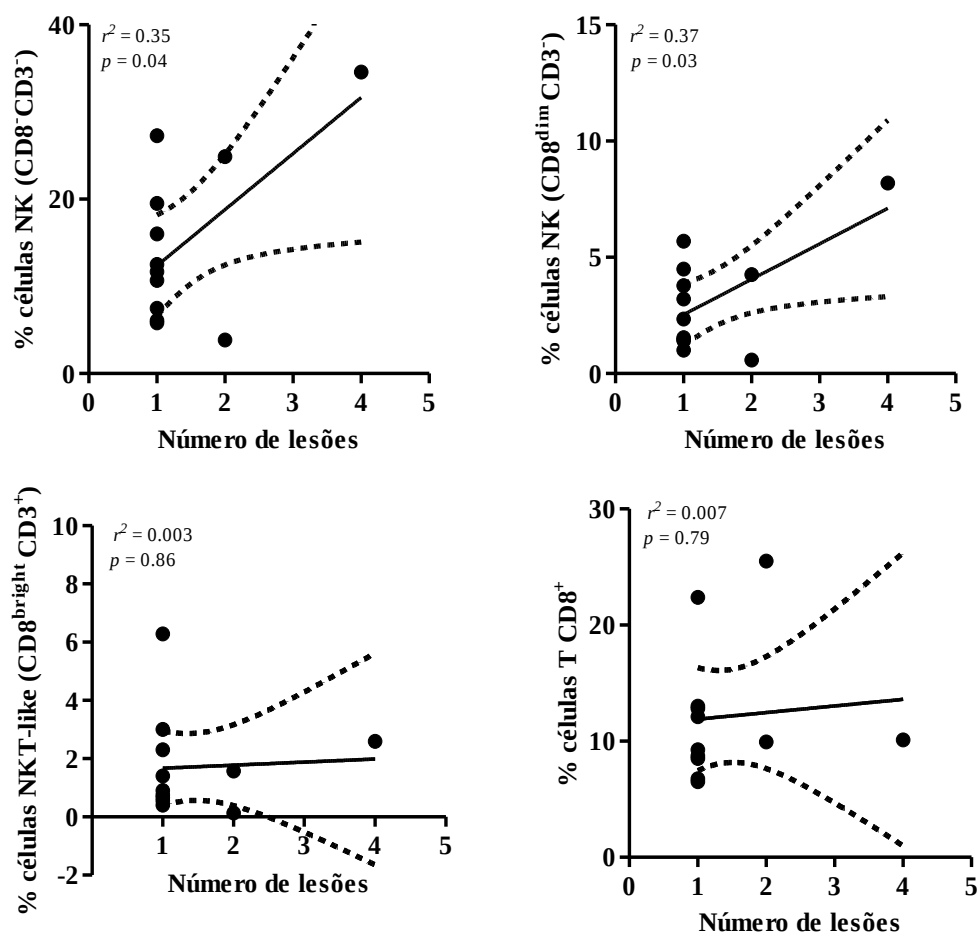


Figura 4. Correlação entre a frequência das sub-populações de células citotóxicas e o número de lesões de pacientes com LC. As análises estatísticas entre o número de lesões e a frequência de sub-populações de células citotóxicas do sangue periférico de pacientes com LC (n = 12) foram feitas utilizando o teste de Spearman.

VII.6 Frequência da expressão de TNF em células citotóxicas do sangue periférico de pacientes com LC

O dano tecidual observado na leishmaniose cutânea tem sido associado à produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998; Antonelli, Dutra et al. 2005). Com o objetivo de avaliar se as sub-populações de células citotóxicas contribuem para a produção desta citocina, CMSP de indivíduos sadios (n=5) e pacientes com LC (n=4) foram colocadas em cultura na presença ou ausência de antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) por 18 horas e a expressão de TNF determinada por citometria de fluxo. Observamos que as sub-populações de células NK ($CD8^-CD3^-$) e NK ($CD8^{dim}CD3^-$) e NKT-like ($CD8^{brigh}CD3^+$) produzem significativamente mais TNF do que as células T $CD8^+$ nos pacientes com LC (figura 5).

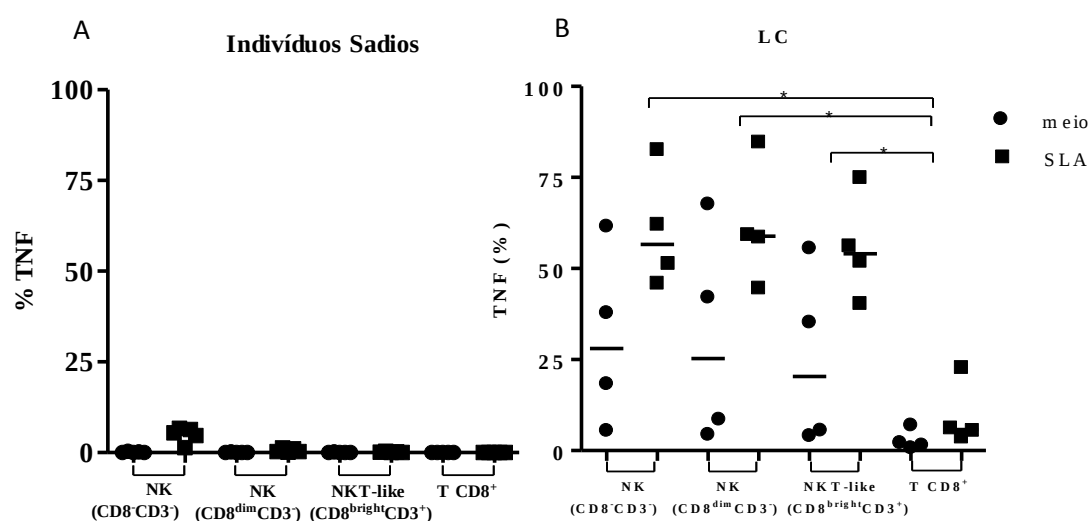
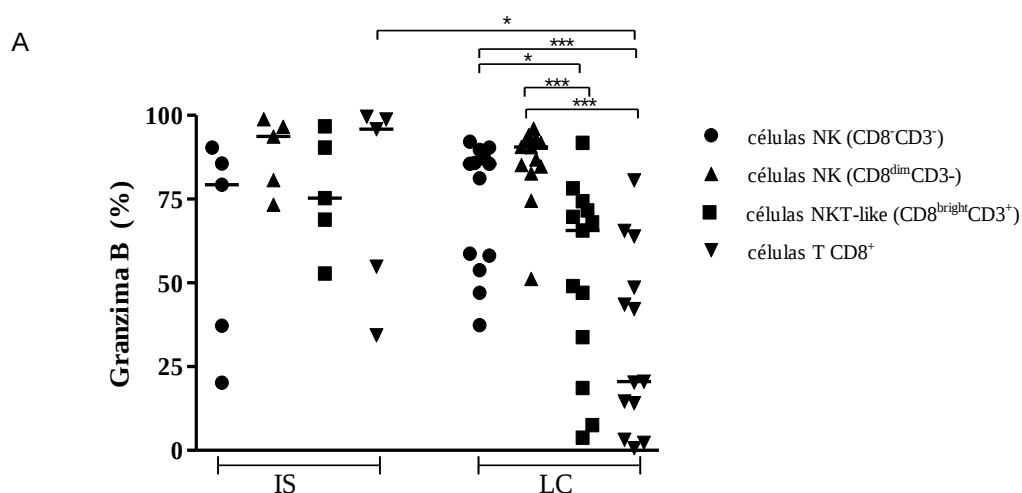


Figura 5. Frequência da expressão de TNF nas sub-populações de células citotóxicas do sangue periférico de pacientes com LC. (A) Expressão de TNF nas sub-populações de células citotóxicas de indivíduos sadios (n=5). (B) Expressão de TNF nas sub-populações de células citotóxicas de pacientes com LC (n = 4). Teste de Wilcoxon utilizado para a análise pareada, significância estatística $p < 0.05$.

VII.7 Expressão de granzima e perforina em células citotóxicas do sangue periférico de pacientes com LC

As células NK e os linfócitos T CD8⁺ medeiam mecanismos efetores no combate às infecções não só através da secreção de citocinas e quimiocinas, mas também na indução de atividade citotóxica. Estas células utilizam o mesmo mecanismo básico para destruir suas células alvo através da liberação do conteúdo de grânulos citotóxicos, tal como as granzimas e perforina (Trapani and Smyth 2002; Ruiz and Becker 2007). Avaliamos a frequência das sub-populações de células citotóxicas que expressam granzima e perforina no sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC através da marcação *ex-vivo* de CD56, CD8 e CD3 e intracelular de granzima e perforina em CMSP. Observamos que as duas sub-populações de células NK (CD8⁻ e CD8^{dim}) expressam significativamente mais granzima B (figura 6A) e perforina (figura 6B) do que as células T CD8⁺ de pacientes com LC. Além disso, quando comparamos a expressão de granzima B nas células T CD8⁺ de IS e de pacientes com LC, observamos uma diminuição da expressão de granzima B nos pacientes com LC (figura 6A).



B

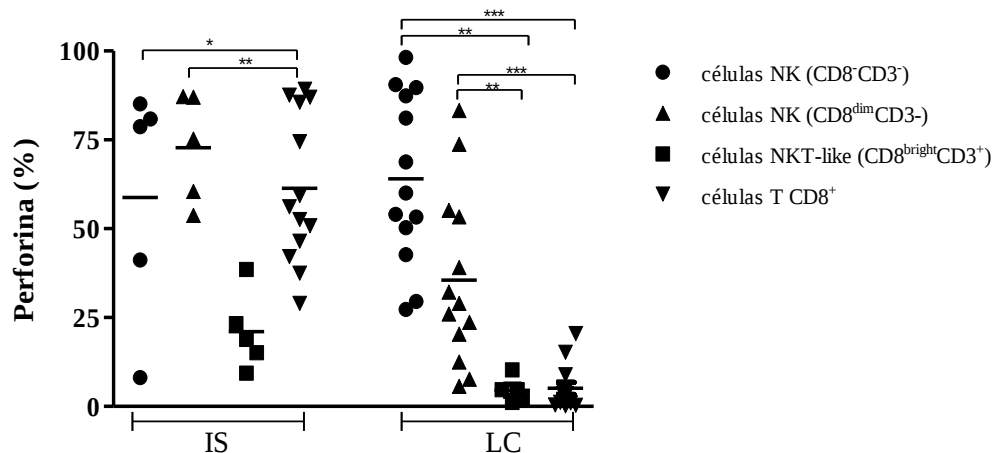


Figura 6. Expressão de granzima e perforina em células citotóxicas do sangue periférico de pacientes com LC. (A) Frequência de granzima nas sub-populações de células citotóxicas de IS (n=5) e pacientes com LC (n=13). (B) Frequência de perforina nas sub-populações de células citotóxicas de IS (n=5) e pacientes com LC (n=13). Teste de Mann-Whitney foi utilizado para comparações das sub-populações de células citotóxicas entre os grupos e o teste de Kruskal-Wallis utilizado para comparações de médias entre os grupos, pós-teste de Dunn. * p < 0,05; ** p < 0,005; *** p < 0,0005.

VII.8 Determinação da atividade citotóxica de células NK e células T

CD8+ em lesões de pacientes com LC

Linfócitos citotóxicos tem um centro denso, onde estão incluídas as proteínas granzima e perforina. Este centro é coberto por uma glicoproteína de membrana lisossomal, conhecida como CD107a, durante a degranulação, CD107a é exposto na superfície da célula (Betts, Brenchley et al. 2003). Considerando que a expressão deste marcador é um indicativo da atividade citotóxica dos linfócitos, avaliamos sua expressão em lesões de pacientes com LC. A figura A mostra a estratégia de determinação da região de linfócitos de acordo com o tamanho (FSC) e a granulabilidade (SSC) das células e a expressão de CD107a nas células CD56⁺ e CD8⁺. Em B, a frequência das células T CD8⁺ e células NK de lesões de pacientes com LC. Em C, a frequência de CD107a em

células T CD8⁺ e células NK de lesões de pacientes com LC. D, Imunomarcacão para CD56 confirmando a presença das células NK em lesão de paciente com LC. Observamos que as células NK expressam significativamente mais CD107a do que as células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LC.

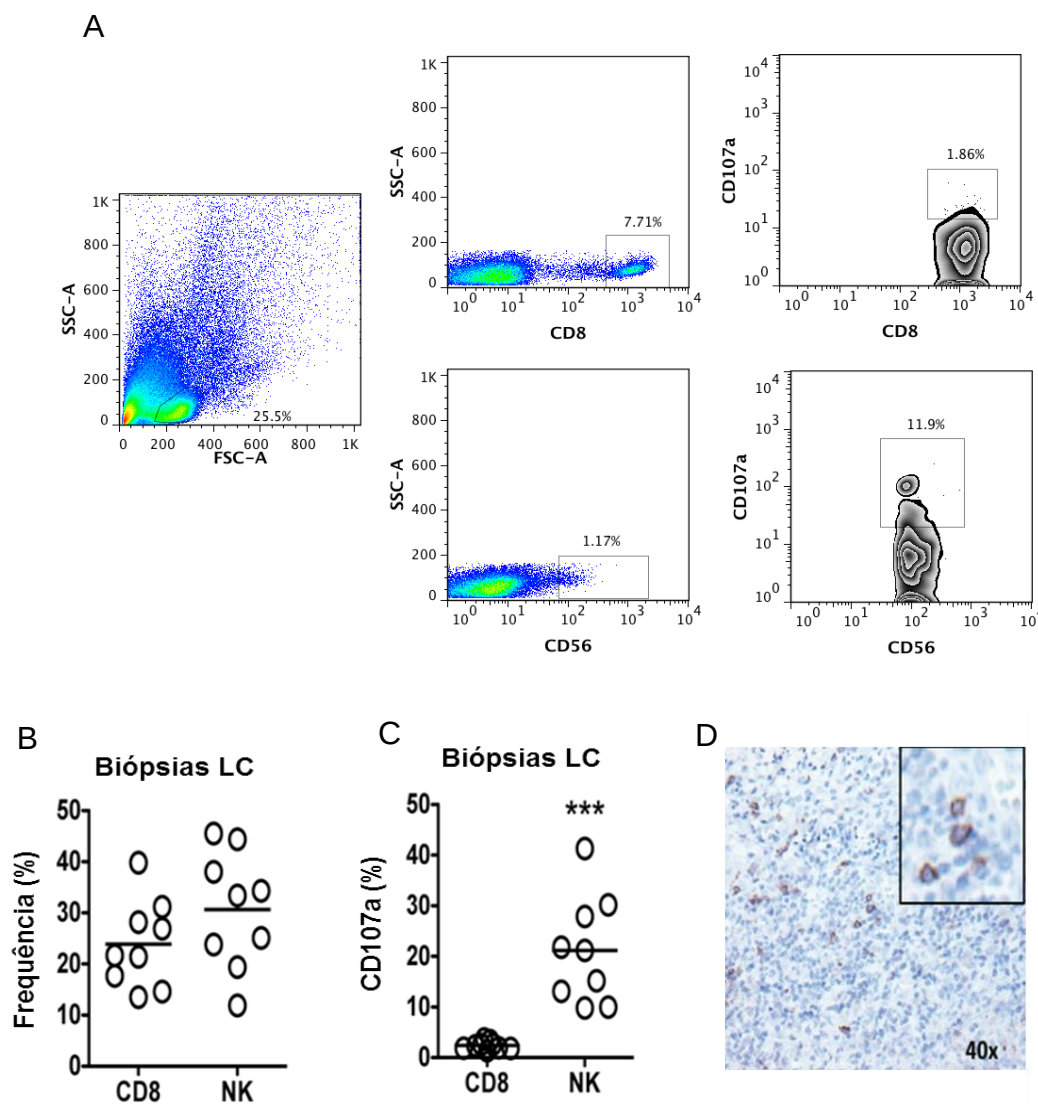


Figura 7. Determinação da atividade citotóxica de células NK e células T CD8⁺ em lesões de pacientes com LC. (A) Estratégia de determinação da expressão de CD107a em células T CD8⁺ e células NK em lesões de pacientes com LC. (B) Frequência de células T CD8⁺ e células NK em lesões de pacientes com LC (n = 9). (C) Expressão de CD107a em células T CD8⁺ e células NK em biópsias de pacientes com LC (n=9). *** p <0,0001. (D) Imunomarcacão para células NK (CD56) em lesão de paciente com LC.

VII.9 Expressão dos ligantes MICA/B em lesões de pacientes com LC

Os ligantes para o receptor NKG2D são induzidos durante a infecção fazendo a célula susceptível à lise por células NK e células T CD8⁺ (Watzl 2003). Para avaliar se a infecção por *L. braziliensis* induz a expressão de MICB em pacientes com LC, realizamos uma análise de expressão gênica em células obtidas de biópsias de IS e pacientes com LC e identificamos uma maior expressão de MICB em lesões de pacientes com LC quando comparados com IS (figura 8A). Em seguida, analisamos a expressão dos ligantes MICA/B em macrófagos (CD11b⁺) de lesões de pacientes com LC e observamos que estes ligantes estão mais expressos em pacientes com LC quando comparados com IS (figura 8B). Na figura 8C mostrando em azul a presença do ligante MICB em lesão de paciente com LC.

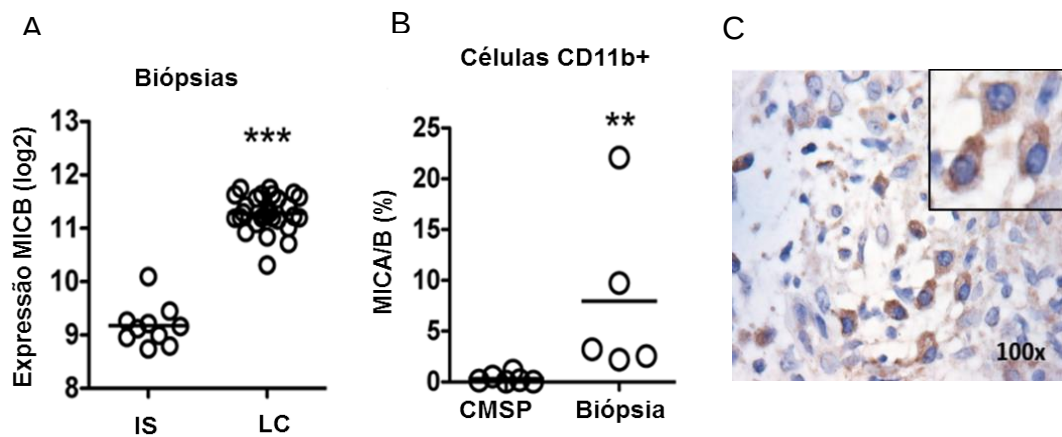


Figura 8. Expressão dos ligantes MICA/B em lesões de pacientes com LC. (A) Comparação da expressão de MICB em microarranjo realizado com biópsias de IS (n=10) e de pacientes com LC (n=25). (B) Frequência de MICA/B em células CD11b⁺ de CMSP (n=6) e biópsias (n=5). (C) Imunomarcagem em azul para MICB em lesão de LC. **p<0,001; *** p <0,0001

VII.10 Neutralização de NKG2D em células NK e T CD8⁺ de lesões de pacientes com LC

NKG2D é um receptor de ativação encontrado em células NK e células T CD8⁺. Com o objetivo de avaliar se a neutralização deste receptor diminuiria a atividade citotóxica de células T CD8⁺ e células NK na leishmaniose cutânea, células derivadas da lesão de pacientes com LC foram colocadas em cultura na presença ou ausência de a-NKG2D (20ug/ml) por 12 horas e a expressão de CD107a em células T CD8⁺ e células NK foi determinada por citometria de fluxo. Observamos que a neutralização do receptor NKG2D não foi capaz de diminuir a atividade citotóxica em lesões de pacientes com LC.

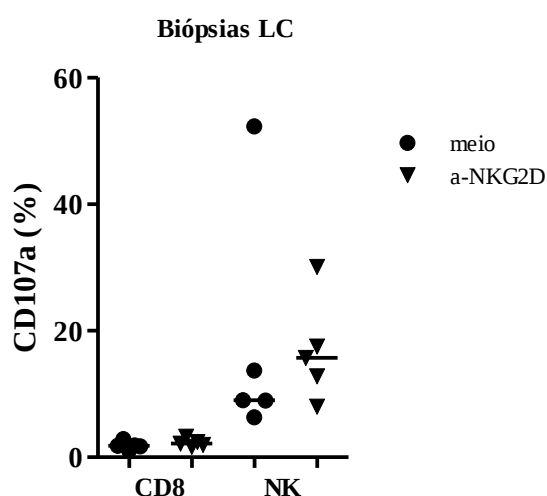


Figura 9. Neutralização de NKG2D em células NK e T CD8⁺ de lesões de pacientes com LC. Expressão de CD107a em lesões de pacientes com LC (n=5) após a neutralização de NKG2D. Teste de Wilcoxon utilizado para a análise pareada, significância estatística p<0.005.

VII.11 Participação das células NK no controle da infecção por *L. braziliensis*

A morte de células infectadas é fundamental para o controle da infecção por *Leishmania* (Ruiz and Becker 2007; Giudice, Vendrame et al. 2012). Com o objetivo de verificar se as células NK participam do controle da infecção por *L. braziliensis*, CMSP de indivíduos sadios foram infectadas com *L. braziliensis* e colocadas em co-cultura com células NK separadas previamente por beads magnéticas e cultivadas na presença ou ausência dos inibidores a-NKG2D, a-NKp46 e a-MICA/B por 12 horas. Em seguida, os sobrenadantes foram deixados em cultura por 24 horas e a viabilidade dos parasitos foi avaliada. Observamos que a inibição do receptor NKp46, presente nas células NK, e dos ligantes MICA/B, presentes em macrófagos, aumentou a viabilidade dos parasitos.

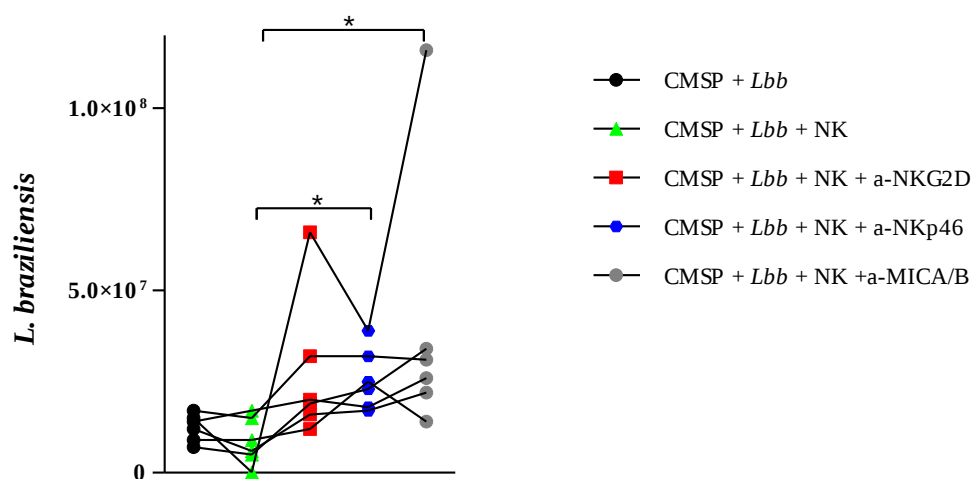


Figura 10. Participação das células NK no controle da infecção por *L. braziliensis*. Viabilidade das promastigotas no sobrenadante CMSP de IS (n=5) infectadas e enriquecidas com células NK na ausência ou presença dos inibidores a-NKG2D, a-NKp46 e a-MICA/B. O teste de Kruskal-Wallis foi utilizado para as comparações entre os grupos e a significância estatística determinada pelo pós-teste de Dunn, $p < 0.005$.

VIII. DISCUSSÃO

A morte de células infectadas por citotoxicidade é um dos principais mecanismos efetores no combate às infecções desempenhado pelas células NK (Smyth, Cretney et al. 2005; Topham and Hewitt 2009). Uma vez que a presença de células T CD8⁺ e NK e suas atividades citotóxicas em lesões de pacientes com LC sugerem a participação ativa destas células na leishmaniose (Machado, Kanitakis et al. 2002), investigamos o papel das células NK na infecção por *L. braziliensis* e observamos uma dicotomia funcional destas células na leishmaniose cutânea, participando tanto na patogênese da doença quanto na destruição de parasitos.

A atividade citotóxica pode ser desempenhada por vários tipos celulares a exemplo das células T CD8⁺, T CD4⁺, NK e NKT (Ruiz and Becker 2007). Como a expressão da molécula CD8 é frequentemente aplicada na caracterização de linfócitos T CD8⁺ e algumas células NK (CD3⁻) também expressam CD8 (Addison, North et al. 2005; Campbell, Guy et al. 2008), identificamos quatro sub-populações de células citotóxicas de acordo com a expressão dos marcadores de superfície CD56, CD8 e CD3 no sangue periférico de pacientes com LC. Addison et al. 2005 observaram que a expressão da molécula CD8 proporciona às células NK um mecanismo de sobrevivência após a lise de células alvo, permitindo potencialmente a conjugação e a lise de várias células alvo (Addison, North et al. 2005). Outro marcador utilizado para a identificação das células NK é o receptor de baixa afinidade para imunoglobulina G (IgG) FcγRIII (CD16) que confere a estas células a capacidade citotóxica dependente de anticorpo (Cooper, Fehniger et al. 2001).

Observamos que as células NK ($CD8^-$ e $CD8^{dim}$) expressam mais CD16 do que as células T $CD8^+$ no sangue periférico de indivíduos saudáveis e de pacientes com LC. A participação das células T $CD8^+$ na patogênese da LC têm sido muito estudada (Faria, Souza et al. 2009; Dantas, Oliveira et al. 2013; Novais, Carvalho et al. 2013; Santos Cda, Boaventura et al. 2013; Cardoso, Machado et al. 2015), enquanto pouco se sabe sobre a participação das células NK na resposta imune de pacientes com LC. Uma vez que a expressão da molécula CD8 foi observada nas células NK de pacientes com LC, acreditamos que o papel atribuído às células T $CD8^+$ na resposta inflamatória destes pacientes também pode estar associado às células NK.

A ação coordenada das respostas imune inata e adaptativa é fundamental para uma resposta imune protetora contra a *Leishmania*. Neste sentido, as células NK e as células T $CD8^+$ atuam produzindo citocinas pró-inflamatórias, granzima e perforina em resposta à invasão do parasito (Trapani and Smyth 2002; Faria, Souza et al. 2009; Novais, Carvalho et al. 2013). Neste trabalho, pacientes com LC apresentaram um aumento da frequência de células NK ($CD8^-CD3^-$) e uma diminuição da frequência de células T $CD8^+$ quando comparados a indivíduos saudáveis. A frequência aumentada de células NK no sangue periférico destes pacientes pode estar associada não só a capacidade citotóxica dessas células, mas também à produção de citocinas como IFN- γ e TNF, que contribuem para o desenvolvimento de uma resposta Th1 e à ativação de macrófagos (Stetson, Mohrs et al. 2003; Laouar, Sutterwala et al. 2005; Prajeeth, Haeberlein et al. 2011; Bogdan 2012). Além disso, a correlação positiva observada entre as frequências de células NK ($CD8^-$ e $CD8^{dim}$) com o número de lesões dos

pacientes com LC indica a participação destas células no dano tecidual observado nestes pacientes.

Alguns mecanismos de controle da infecção podem contribuir indiretamente para a patologia da leishmaniose cutânea, como é o caso das citocinas IFN- γ e TNF que ajudam no controle da *Leishmania*, porém induzem ao dano tecidual, participando da patogênese da doença (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998; Bacellar, Lessa et al. 2002; Da-Cruz, Bittar et al. 2002; Gomes-Silva, de Cassia Bittar et al. 2007). O TNF contribui para o dano tecidual através da indução de óxido nítrico, apoptose, aumento de citotoxicidade e indução de metaloproteinases de matriz (MMPs) (Baugh and Bucala 2001; Gupta 2002; Lehmann, Edgar et al. 2005). Na LC, esta citocina está associada não só ao desenvolvimento, mas como também à progressão das lesões cutâneas (Melby, Andrade-Narvaez et al. 1994; Antonelli, Dutra et al. 2005). Determinamos a produção de TNF pelas sub-populações de células citotóxicas em resposta ao antígeno solúvel de *Leishmania* e observamos que as células NK (CD8⁻ e CD8^{dim}) e NKT-like (CD8^{brigh}CD3⁻) do sangue periférico de pacientes com LC produzem mais TNF quando comparadas com as células T CD8⁺. Becker et al. 2003 demonstraram que lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania* podem ativar as células NK via receptor Toll-like 2, levando à produção de TNF e IFN- γ (Becker, Salaiza et al. 2003). Outras células também contribuem para a produção de TNF na leishmaniose, um estudo recente mostrou que a sub-população de monócitos intermediários são os maiores produtores desta citocina em pacientes com LC (Passos, Carvalho et al. 2015). Campos et al. 2014 observaram que TNF induz a produção de MMP-9, uma enzima capaz de degradar a membrana basal, contribuindo para a patogênese da LC (Campos,

Passos et al. 2014). Uma vez que TNF participa da patogênese da LC contribuindo para o dano tecidual e isso já está bem estabelecido (Ribeiro-de-Jesus, Almeida et al. 1998; Antonelli, Dutra et al. 2005), a produção de TNF por células NK observada nos pacientes com LC sugere que estas células contribuem para patogênese da doença.

O principal mecanismo para destruição das células alvo utilizado pelas células citotóxicas é a liberação de granzima e perforina na sinapse imunológica formada com a sua célula-alvo (Trapani and Smyth 2002). Desta maneira, o potencial citotóxico das células NK e T CD8⁺ pode ser determinado através da avaliação da expressão de granzima e perforina nestas células. No presente estudo, observamos que as duas sub-populações de células NK (CD8⁻ e CD8^{dim}) expressam significativamente mais granzima B e perforina do que as células T CD8⁺ de pacientes com LC, e que as células T CD8⁺ de pacientes com LC apresentam uma diminuição da expressão de granzima B quando comparadas as de indivíduos sadios. Novais et al. 2013 avaliaram o potencial citotóxico de células T CD8⁺ do sangue periférico e da lesão de pacientes com LC e observaram que as células da lesão expressam mais granzima B do que as células do sangue periférico e que ambas expressam perforina (Novais, Carvalho et al. 2013). A associação entre a expressão de granzima B e a progressão da lesão tem sido mostrada em infecções por *L. braziliensis*. Faria et al. 2009 observaram que a frequência de células T CD8⁺ expressando granzima B⁺ está diretamente associada com a intensidade da reação inflamatória em úlceras de pacientes com LC. E que pacientes com a forma cutânea têm uma maior frequência destas células quando comparados com pacientes com a forma inicial da infecção (Faria, Souza et al. 2009). Santos Cda et al. 2013 avaliaram a

expressão de granzima B em células T CD8⁺ em biópsias de pacientes com LC e encontraram uma correlação positiva entre a frequência de células T CD8⁺ granzima B⁺ com o tamanho da lesão destes pacientes (Santos Cda, Boaventura et al. 2013). Dantas et al. 2013 identificaram a presença de células T CD8⁺ expressando granzima B em lesões recentes (com menos de 20 dias) e tardias de LC. Além disso, as lesões recentes apresentaram menor expressão de granzima B do que as lesões já estabelecidas. (Dantas, Oliveira et al. 2013). Cardoso et al. 2015 demonstraram que as células T CD8⁺ de pacientes com LC induziam mais apoptose de monócitos infectados do que as células T CD8⁺ de indivíduos com infecção sub-clínica, e que a produção de granzima B nas células T CD8⁺ foi maior em células de pacientes com LC (Cardoso, Machado et al. 2015). A maior disponibilidade de granzima e perforina em células NK (CD8⁻ e CD8^{dim}), observada no nosso estudo, sugere que estas células podem, não só atuar rapidamente durante a infecção, como contribuir de uma forma maior do que as células T CD8⁺ para a atividade citotóxica observada na infecção por *L. braziliensis*.

As células citotóxicas se mantêm num estado estável até que ocorra a interação com as células-alvo levando a degranulação, onde lisossomos secretores contendo granzima e perforina são liberados, e a proteína de membrana associada ao lisossoma (LAMP-1, CD107a) é transportada para a superfície das células tornando possível identificar as células ativadas por degranulação (Betts, Brenchley et al. 2003; Thiery, Keefe et al. 2011). Avaliamos a atividade citotóxica em biópsias de pacientes com LC e identificamos que as células NK expressam mais CD107a do que as células T CD8⁺. Em infecções por *L. braziliensis* a medição da atividade citotóxica têm

sido investigada. Santos Cda et al. 2013 infectaram com *L. braziliensis* células derivadas da lesão de pacientes com LC e observaram um aumento na expressão CD107a em comparação as células não infectadas (Santos Cda, Boaventura et al. 2013). Novais et al. 2013 mostraram que as células T CD8⁺ de lesões de LC expressam CD107a, enquanto as células T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com LC não expressam (Novais, Carvalho et al. 2013). No nosso estudo, apesar da diminuição da frequência de células T CD8⁺ no sangue periférico em pacientes com LC poder ser explicada pelo recrutamento destas células para as lesões, a atividade citotóxica observada em lesões de pacientes com LC foi preferencialmente desempenhada pelas células NK.

A atividade das células NK é controlada por um equilíbrio entre sinais de ativação e receptores inibitórios (Lanier 2005). NKG2D é um receptor de ativação expresso por células NK e T CD8⁺ e os seus ligantes (MICA/B) são induzidos nas células-alvos por estresse celular tornando-as sensíveis ao ataque das células NK e T CD8⁺ (Gleimer and Parham 2003; Watzl 2003). No nosso estudo, a análise de microarranjo com biópsias de pele saudável e de lesões de pacientes com LC mostrou uma elevada expressão de MICB nas lesões de pacientes e a expressão dos ligantes MICA/B em macrófagos (CD11b⁺) foi confirmada em biópsias de pacientes com LC. Estudos recentes com microarranjo mostraram um enriquecimento significativo em vias envolvidas na citotoxicidade e a expressão de genes citolíticos em biópsias de pacientes com LC (Novais, Carvalho et al. 2013; Novais, Carvalho et al. 2015), reforçando a participação da citotoxicidade na patogênese da leishmaniose. Em modelo murino, camundongos previamente infectados por agentes patogênicos bacterianos ou virais foram desafiados por *L. major* e desenvolveram lesões

significativamente maiores, com um aumento do número de células T CD8⁺ NKG2D⁺ (Crosby, Goldschmidt et al. 2014). Embora, a expressão de MICA/B esteja aumentada nas lesões de pacientes com LC, identificamos que a atividade citotóxica das células NK em lesões de pacientes com LC não é dependente do receptor NKG2D, uma vez que o bloqueio do receptor NKG2D não foi capaz de reduzir a atividade citotóxica dessas células. Como as células NK possuem diversos receptores de ativação a exemplo de NKp30, NKp44 e NKp46 (Lanier 2005), é provável que estes receptores estejam contribuindo para a ativação e a manutenção da atividade citotóxica destas células nas lesões de pacientes com LC.

Previamente foi mostrado que a citotoxicidade por células T CD8⁺ não controla a multiplicação da *L. braziliensis* na leishmaniose cutânea humana (Santos Cda, Boaventura et al. 2013). No nosso trabalho, identificamos que as células NK são capazes de controlar a multiplicação da *Leishmania* e que o receptor NKp46 e os ligantes MICA/B contribuem para este controle. Estes dados são interessantes uma vez que observamos que apesar do bloqueio do receptor NKG2D não diminuir a atividade citotóxica das células NK, o bloqueio dos seus ligantes, MICA/B, aumentou significativamente a viabilidade dos parasitos. O que sugere que apesar da atividade citotóxica das células NK ocorrer por diferentes vias de ativação, a exemplo do receptor NKp46, a via NKG2D-MICA/B é importante para o controle da multiplicação de parasitos na infecção por *L. braziliensis*. Santos Cda et al. 2013 observaram que as células T CD8⁺ em co-cultura com macrófagos infectados liberam granzima B, mas que estas células não têm nenhum efeito sobre a morte do parasito (Santos Cda, Boaventura et al. 2013). Embora estes autores não tenham observado a

contribuição da atividade citotóxica de células T CD8⁺ para a destruição de parasitos, os nossos dados indicam que as células NK desempenham uma atividade citotóxica maior do que as células T CD8⁺ e que esta atividade pode não só estar contribuindo para a patogênese da doença, através da produção de citocinas pró-inflamatórias e de mediadores citotóxicos, como também participando da destruição de parasitos. Santos Cda et al. 2013 também demonstraram que as células T CD4⁺ em co-cultura com macrófagos infectados produzem IFN- γ e medeiam a morte da *Leishmania*. Trabalhos anteriores também mostraram que o principal papel das células T CD4⁺ na infecção por *L. braziliensis* é a produção de IFN- γ levando à morte de parasitos (Kaye and Scott 2011; Santos Cda, Boaventura et al. 2013). Em infecções com outras espécies de *Leishmanias* as células NK também contribuíram para a morte do parasito. Lieke et al. 2011 demonstraram que as células NK humanas reconhecem lipofosfoglicanos (LPG) de *Leishmania* (*L. major* e *L. aethiopica*) conduzindo à lise de promastigotas, mas este reconhecimento provoca a destruição imediata destas células (Lieke, Nylen et al. 2011).

Observamos que as células NK estão presentes e realizando suas atividades citotóxicas nas lesões dos pacientes com LC e que estas células não só expressam mais granzima e perforina, como também produzem mais TNF quando comparadas às células T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com LC. Além disso, a frequência aumentada das células NK no sangue periférico de pacientes com LC está associada ao maior número de lesões. Tomando em conjunto, nossos dados sugerem que os mecanismos de morte celular utilizados pelas células NK para a destruição de células-alvo podem contribuir para o

controle da multiplicação dos parasitos, mas também induzir a inflamação e consequente destruição dos tecidos.

IX. PROPOSTA DE ESTUDO

O principal mecanismo para destruição das células alvo utilizado pelas células citotóxicas é a liberação de granzima e perforina na sinapse imunológica formada com a sua célula-alvo (Trapani and Smyth 2002). Além de destruir as células-alvo, as granzimas podem induzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e degradar vários componentes da matriz extracelular, contribuindo para a inflamação dos tecidos (Hiebert and Granville 2012). Com objetivo de enriquecer os resultados encontrados, nossa proposta de estudo será determinar a contribuição da granzima B para a resposta imune patológica observada em pacientes com leishmaniose cutânea por *L. braziliensis*.

Nosso primeiro objetivo será determinar os níveis de granzima B em culturas de células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC e em biópsias de pacientes com LC. O segundo objetivo será avaliar a associação dos níveis de granzima B com a gravidade da doença. Nossa hipótese é que pacientes com LC apresentam níveis mais elevados de granzima B do que os indivíduos saudáveis, e os níveis de granzima B estão associados à gravidade da doença.

O terceiro objetivo será determinar o efeito de citocinas anti e pró-inflamatórias na produção de granzima B em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos saudáveis e pacientes com LC. Com esse objetivo pretendemos determinar os mecanismos de produção de granzima B. O quarto e último objetivo será determinar o efeito de granzima B para a produção de

citocinas anti e pró-inflamatórias em células mononucleares do sangue periférico de indivíduos sadios e pacientes com LC.

X. CONCLUSÕES

1. Pacientes com LC apresentaram maior frequência de células NK no sangue periférico do que indivíduos sadios. E a frequência de células NK esteve associada ao maior número de lesões nos pacientes com LC.

2. As células NK do sangue periférico de pacientes com LC expressaram significativamente mais granzima B e perforina, como também produziram mais TNF quando comparadas às células T CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com LC.

3. As células NK estiveram presentes e realizando suas atividades citotóxicas de forma mais acentuada do que as células T CD8⁺ nas lesões dos pacientes com LC.

4. As células NK contribuíram para destruição de parasitos participando no controle da infecção por *L. braziliensis*.

Os nossos dados sugerem uma dicotomia funcional das células NK na leishmaniose cutânea, participando tanto na patogênese da doença quanto na destruição de parasitos.

XI. SUMMARY

FUNCTIONAL DICHOTOMY OF NK CELLS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS: PARTICIPATION IN THE PATHOGENESIS AND PARASITES DESTRUCTION

Background: Cutaneous leishmaniasis (CL) due to *L. braziliensis* infection is characterized by the development of ulcerative skin lesions. Recently, attention has been given to the participation of CD8⁺ T cells in the deleterious inflammatory response observed in CL patients. It was shown that these cells contribute to the immunopathology by producing pro-inflammatory cytokines, granzyme and perforin. In addition to the CD8⁺ cells, NK and NKT cells can also be important sources of pro-inflammatory cytokines, granzyme and perforin, and the role of these cells in *L. braziliensis* infection has not yet been investigated. **Aim:** To evaluate the role of NK cells in *L. braziliensis* infection. **Methods and Results:** Peripheral blood mononuclear cells were obtained from healthy controls and CL patients for *ex-vivo* staining with CD56, CD8, CD3 antibodies, and intracellular staining for perforin and granzyme. Cells from biopsies were obtained for immuno-phenotyping by flow cytometry and immunohistochemistry. We identified four sub-populations of cytotoxic cells: NK cells (CD8⁻CD3⁻), NK cells (CD8^{dim}CD3⁻), NKT cells (CD8^{brigh}CD3⁺) and CD8⁺ T cells. We observed that the frequency of sub-populations of NK cells (CD8⁻ and CD8^{dim}) was increased in peripheral blood from CL patients when compared to healthy controls, and these two populations express more granzyme and perforin than CD8⁺ T cells from the same patients. We also found that NK cells from lesions of CL patients expressed more CD107a, a marker of degranulation, than CD8⁺ T cell. Moreover, we observed that the NK cells contribute to the destruction of *L. braziliensis*. **Conclusion:** Our data suggest a functional dichotomy of NK cells in CL, participating both in the pathogenesis of the disease and killing parasites. **Key words:** Cutaneous leishmaniasis, cytotoxic activity

XII. REFERÊNCIAS

- Addison, E. G., J. North, et al. (2005). "Ligation of CD8alpha on human natural killer cells prevents activation-induced apoptosis and enhances cytolytic activity." Immunology **116**(3): 354-61.
- 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): 226-30.
- Arias, M. A., M. P. Jimenez de Bagues, et al. (2014). "Elucidating sources and roles of granzymes A and B during bacterial infection and sepsis." Cell Rep **8**(2): 420-9.
- Bacellar, O., H. Lessa, et al. (2002). "Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients." Infect Immun **70**(12): 6734-40.
- Balato, A., D. Unutmaz, et al. (2009). "Natural killer T cells: an unconventional T-cell subset with diverse effector and regulatory functions." J Invest Dermatol **129**(7): 1628-42.
- Barral-Netto, M., A. Barral, et al. (1995). "Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **17**(1): 21-8.
- Barral-Netto, M., C. Brodskyn, et al. (1998). "Human_leishmaniasis/cytokines.bahia.br." Braz J Med Biol Res **31**(1): 149-55.
- Barral, A., M. Barral-Netto, et al. (1992). "Lymphadenopathy associated with Leishmania braziliensis cutaneous infection." Am J Trop Med Hyg **47**(5): 587-92.
- Barral, A., J. Guerreiro, et al. (1995). "Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by Leishmania braziliensis." Am J Trop Med Hyg **53**(3): 256-9.
- Baugh, J. A. and R. Bucala (2001). "Mechanisms for modulating TNF alpha in immune and inflammatory disease." Curr Opin Drug Discov Devel **4**(5): 635-50.
- Becker, I., N. Salaiza, et al. (2003). "Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2." Mol Biochem Parasitol **130**(2): 65-74.
- Beiting, D. P., L. Peixoto, et al. (2014). "Differential induction of TLR3-dependent innate immune signaling by closely related parasite species." PLoS One **9**(2): e88398.
- Bendelac, A., P. B. Savage, et al. (2007). "The biology of NKT cells." Annu Rev Immunol **25**: 297-336.
- Betts, M. R., J. M. Brenchley, et al. (2003). "Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+ T cells by a flow cytometric assay for degranulation." J Immunol Methods **281**(1-2): 65-78.
- Bittencourt, A. L. and A. Barral (1991). "Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis." Mem Inst Oswaldo Cruz **86**(1): 51-6.
- Bogdan, C. (2012). "Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis." Front Cell Infect Microbiol **2**: 69.
- Campbell, J. P., K. Guy, et al. (2008). "Total lymphocyte CD8 expression is not a reliable marker of cytotoxic T-cell populations in human peripheral

- blood following an acute bout of high-intensity exercise." Brain Behav Immun **22**(3): 375-80.
- Campos, T. M., S. T. Passos, et al. (2014). "Matrix metalloproteinase 9 production by monocytes is enhanced by TNF and participates in the pathology of human cutaneous Leishmaniasis." PLoS Negl Trop Dis **8**(11): e3282.
- Cardoso, T. M., A. Machado, et al. (2015). "Protective and Pathological Functions of CD8+ T Cells in Leishmania braziliensis Infection." Infect Immun **83**(3): 898-906.
- Carvalho, E. M., A. Barral, et al. (1994). "Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis." Acta Trop **56**(4): 315-25.
- Carvalho, E. M., W. D. Johnson, et al. (1985). "Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis." J Immunol **135**(6): 4144-8.
- Castellano, L. R., D. C. Filho, et al. (2009). "Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon-gamma production." Hum Immunol **70**(6): 383-90.
- Cooper, M. A., T. A. Fehniger, et al. (2001). "The biology of human natural killer-cell subsets." Trends Immunol **22**(11): 633-40.
- Coughlin, P., E. Morris, et al. (2000). "The role of granzymes and serpins in regulating cell growth and death." Symp Soc Exp Biol **52**: 55-64.
- Crosby, E. J., M. H. Goldschmidt, et al. (2014). "Engagement of NKG2D on bystander memory CD8 T cells promotes increased immunopathology following Leishmania major infection." PLoS Pathog **10**(2): e1003970.
- Da-Cruz, A. M., R. Bittar, et al. (2002). "T-cell-mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal leishmaniasis: long-term evaluation after therapy." Clin Diagn Lab Immunol **9**(2): 251-6.
- 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): 2614-8.
- da Silva Santos, C., S. Attarha, et al. (2015). "Proteome profiling of human cutaneous leishmaniasis lesion." J Invest Dermatol **135**(2): 400-10.
- Dantas, M. L., J. C. Oliveira, et al. (2013). "CD8+ T cells in situ in different clinical forms of human cutaneous leishmaniasis." Rev Soc Bras Med Trop **46**(6): 728-34.
- Desjeux, P. (1996). "Leishmaniasis. Public health aspects and control." Clin Dermatol **14**(5): 417-23.
- Eberl, G., R. Lees, et al. (1999). "Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NK T cells." J Immunol **162**(11): 6410-9.
- Emoto, M., H. W. Mittrucker, et al. (1999). "Critical role of leukocyte function-associated antigen-1 in liver accumulation of CD4+NKT cells." J Immunol **162**(9): 5094-8.
- Emoto, M., M. Miyamoto, et al. (2000). "Participation of leukocyte function-associated antigen-1 and NK cells in the homing of thymic CD8+NKT cells to the liver." Eur J Immunol **30**(10): 3049-56.

- Falcao, S. A., T. Weinkopff, et al. (2015). "Exposure to *Leishmania braziliensis* triggers neutrophil activation and apoptosis." PLoS Negl Trop Dis **9**(3): e0003601.
- 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): 432-9.
- Follador, I., C. Araujo, et al. (2002). "Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection." Clin Infect Dis **34**(11): E54-8.
- Gaze, S. T., W. O. Dutra, et al. (2006). "Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population." Scand J Immunol **63**(1): 70-8.
- 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.
- Gleimer, M. and P. Parham (2003). "Stress management: MHC class I and class I-like molecules as reporters of cellular stress." Immunity **19**(4): 469-77.
- Godfrey, D. I., K. J. Hammond, et al. (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." Immunol Today **21**(11): 573-83.
- Godfrey, D. I., H. R. MacDonald, et al. (2004). "NKT cells: what's in a name?" Nat Rev Immunol **4**(3): 231-7.
- Gomes-Silva, A., R. de Cassia Bittar, et al. (2007). "Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection?" Clin Exp Immunol **149**(3): 440-4.
- Gorak, P. M., C. R. Engwerda, et al. (1998). "Dendritic cells, but not macrophages, produce IL-12 immediately following *Leishmania donovani* infection." Eur J Immunol **28**(2): 687-95.
- Guimarães, L. H., Machado, P. R. L., Lessa, H. A., Lessa, M., D'Oliveira, A. Jr., Carvalho, E. M. (2005). "Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar." Gazeta Médica da Bahia **1**: 66-74.
- Gupta, S. (2002). "A decision between life and death during TNF-alpha-induced signaling." J Clin Immunol **22**(4): 185-94.
- Hiebert, P. R. and D. J. Granville (2012). "Granzyme B in injury, inflammation, and repair." Trends Mol Med **18**(12): 732-41.
- Hoves, S., J. A. Trapani, et al. (2010). "The battlefield of perforin/granzyme cell death pathways." J Leukoc Biol **87**(2): 237-43.
- 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): 426-33.
- Jordan, K. A. and C. A. Hunter (2010). "Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa." Exp Parasitol **126**(3): 318-25.
- Kaye, P. and P. Scott (2011). "Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface." Nat Rev Microbiol **9**(8): 604-15.
- Lanier, L. L. (2005). "NK cell recognition." Annu Rev Immunol **23**: 225-74.
- Lantz, O. and A. Bendelac (1994). "An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans." J Exp Med **180**(3): 1097-106.

- Laouar, Y., F. S. Sutterwala, et al. (2005). "Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma." Nat Immunol **6**(6): 600-7.
- Lehmann, W., C. M. Edgar, et al. (2005). "Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha) coordinately regulates the expression of specific matrix metalloproteinases (MMPS) and angiogenic factors during fracture healing." Bone **36**(2): 300-10.
- Lemos, M. P., F. Esquivel, et al. (2004). "MHC class II expression restricted to CD8alpha+ and CD11b+ dendritic cells is sufficient for control of Leishmania major." J Exp Med **199**(5): 725-30.
- Lieke, T., S. Nylen, et al. (2011). "The interplay between Leishmania promastigotes and human Natural Killer cells in vitro leads to direct lysis of Leishmania by NK cells and modulation of NK cell activity by Leishmania promastigotes." Parasitology **138**(14): 1898-909.
- Llanos Cuentas, E. A., C. C. Cuba, et al. (1984). "Clinical characteristics of human Leishmania braziliensis braziliensis infections." Trans R Soc Trop Med Hyg **78**(6): 845-6.
- Long, E. O., M. Colonna, et al. (1996). "Inhibitory MHC class I receptors on NK and T cells: a standard nomenclature." Immunol Today **17**(2): 100.
- Machado, P., J. Kanitakis, et al. (2002). "Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis." Eur J Dermatol **12**(5): 449-51.
- Melby, P. C., F. J. Andrade-Narvaez, et al. (1994). "Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis." Infect Immun **62**(3): 837-42.
- Montoya, J. G., K. E. Lowe, et al. (1996). "Human CD4+ and CD8+ T lymphocytes are both cytotoxic to Toxoplasma gondii-infected cells." Infect Immun **64**(1): 176-81.
- Moretta, A., E. Marcenaro, et al. (2008). "NK cells at the interface between innate and adaptive immunity." Cell Death Differ **15**(2): 226-33.
- Murray, H. W., J. D. Berman, et al. (2005). "Advances in leishmaniasis." Lancet **366**(9496): 1561-77.
- Novais, F. O., L. P. Carvalho, et al. (2013). "Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis." PLoS Pathog **9**(7): e1003504.
- Novais, F. O., L. P. Carvalho, et al. (2015). "Genomic profiling of human Leishmania braziliensis lesions identifies transcriptional modules associated with cutaneous immunopathology." J Invest Dermatol **135**(1): 94-101.
- Novais, F. O., R. C. Santiago, et al. (2009). "Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against Leishmania braziliensis infection." J Immunol **183**(12): 8088-98.
- Nyambayar, D., K. Iwabuchi, et al. (2007). "Characterization of NKT-cell hybridomas expressing invariant T-cell antigen receptors." J Clin Exp Hematop **47**(1): 1-8.
- Ohteki, T. and H. R. MacDonald (1994). "Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4+8- and CD4-8- subsets of natural killer 1.1+ T cell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice." J Exp Med **180**(2): 699-704.

- Passos, S., L. P. Carvalho, et al. (2015). "Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in *Leishmania braziliensis* infections." J Infect Dis **211**(2): 274-82.
- Peters, N. C., J. G. Egen, et al. (2008). "In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies." Science **321**(5891): 970-4.
- Pipkin, M. E. and J. Lieberman (2007). "Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works." Curr Opin Immunol **19**(3): 301-8.
- Pirmez, C., M. Yamamura, et al. (1993). "Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis." J Clin Invest **91**(4): 1390-5.
- Prajeeth, C. K., S. Haeblerlein, et al. (2011). "Leishmania-infected macrophages are targets of NK cell-derived cytokines but not of NK cell cytotoxicity." Infect Immun **79**(7): 2699-708.
- Purner, M. B., R. L. Berens, et al. (1996). "CD4-mediated and CD8-mediated cytotoxic and proliferative immune responses to *Toxoplasma gondii* in seropositive humans." Infect Immun **64**(10): 4330-8.
- Ribeiro-de-Jesus, A., R. P. Almeida, et al. (1998). "Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis." Braz J Med Biol Res **31**(1): 143-8.
- Ribeiro-Gomes, F. L., M. C. Moniz-de-Souza, et al. (2007). "Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase." J Immunol **179**(6): 3988-94.
- Ribeiro-Gomes, F. L., A. C. Otero, et al. (2004). "Macrophage interactions with neutrophils regulate *Leishmania major* infection." J Immunol **172**(7): 4454-62.
- Ribeiro-Gomes, F. L., N. C. Peters, et al. (2012). "Efficient capture of infected neutrophils by dendritic cells in the skin inhibits the early anti-leishmania response." PLoS Pathog **8**(2): e1002536.
- Robertson, M. J. and J. Ritz (1990). "Biology and clinical relevance of human natural killer cells." Blood **76**(12): 2421-38.
- Ruiz, J. H. and I. Becker (2007). "CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis." Parasite Immunol **29**(12): 671-8.
- Santos Cda, S., V. Boaventura, et al. (2013). "CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFNgamma(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis." J Invest Dermatol **133**(6): 1533-40.
- Saúde, M. d. (2015). "Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)." Retrieved Situação Epidemiológica / Dados, 2015, from <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/secretarias/svs/leishmaniose-tegumentar-americana-lta>.
- Scapini, P., J. A. Lapinet-Vera, et al. (2000). "The neutrophil as a cellular source of chemokines." Immunol Rev **177**: 195-203.
- Schriefer, A., L. H. Guimaraes, et al. (2009). "Geographic clustering of leishmaniasis in northeastern Brazil." Emerg Infect Dis **15**(6): 871-6.
- Scott, P., P. Natovitz, et al. (1988). "Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens." J Exp Med **168**(5): 1675-84.
- Smyth, M. J., E. Cretney, et al. (2005). "Activation of NK cell cytotoxicity." Mol Immunol **42**(4): 501-10.

- Stetson, D. B., M. Mohrs, et al. (2003). "Constitutive cytokine mRNAs mark natural killer (NK) and NK T cells poised for rapid effector function." J Exp Med **198**(7): 1069-76.
- Thalhofer, C. J., Y. Chen, et al. (2011). "Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *Leishmania infantum* chagasi." Infect Immun **79**(1): 108-17.
- Thiery, J., D. Keefe, et al. (2011). "Perforin pores in the endosomal membrane trigger the release of endocytosed granzyme B into the cytosol of target cells." Nat Immunol **12**(8): 770-7.
- Topham, N. J. and E. W. Hewitt (2009). "Natural killer cell cytotoxicity: how do they pull the trigger?" Immunology **128**(1): 7-15.
- Trapani, J. A. (2001). "Granzymes: a family of lymphocyte granule serine proteases." Genome Biol **2**(12): REVIEWS3014.
- Trapani, J. A. and M. J. Smyth (2002). "Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway." Nat Rev Immunol **2**(10): 735-47.
- Turetz, M. L., P. R. Machado, et al. (2002). "Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil." J Infect Dis **186**(12): 1829-34.
- Unger, A., S. O'Neal, et al. (2009). "Association of treatment of American cutaneous leishmaniasis prior to ulcer development with high rate of failure in northeastern Brazil." Am J Trop Med Hyg **80**(4): 574-9.
- Vokurková, D. V., Jiřina; Šinkorac, Jiří; Stoklasová, Alena; Bláha, Václav; Řezáčová, Martina (2010). "Radiosensitivity of CD3-CD8+CD56+ NK cells." Radiation Measurements **45**(9): 1020-1023.
- Waring, P. and A. Mullbacher (1999). "Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology." Immunol Cell Biol **77**(4): 312-7.
- Waterhouse, N. J., V. R. Sutton, et al. (2006). "Cytotoxic T lymphocyte-induced killing in the absence of granzymes A and B is unique and distinct from both apoptosis and perforin-dependent lysis." J Cell Biol **173**(1): 133-44.
- Waterhouse, N. J. and J. A. Trapani (2002). "CTL: Caspases Terminate Life, but that's not the whole story." Tissue Antigens **59**(3): 175-83.
- Watzl, C. (2003). "The NKG2D receptor and its ligands-recognition beyond the "missing self"?" Microbes Infect **5**(1): 31-7.
- Wingender, G., M. Berg, et al. (2006). "Immediate antigen-specific effector functions by TCR-transgenic CD8+ NKT cells." Eur J Immunol **36**(3): 570-82.
- Wolint, P., M. R. Betts, et al. (2004). "Immediate cytotoxicity but not degranulation distinguishes effector and memory subsets of CD8+ T cells." J Exp Med **199**(7): 925-36.
- World Health Organization. (2015). Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases: third WHO report on neglected tropical diseases. Geneva, World Health Organization.

ANEXO I

NORMAS DE PUBLICAÇÃO AJTMH

American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Instructions for Authors

The AJTMH publishes a broad range of papers covering topics in tropical medicine. Authors uncertain about the appropriateness of a manuscript for the Journal are encouraged to review recent issues of the Journal and to contact editorial staff with any questions. Manuscripts and correspondence should be submitted at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>. Questions about the submission process can be directed to the AJTMH editorial office at cbs15@case.edu and technical support questions should be sent to support@scholarone.com

Cover Letter and Signatures. All manuscripts should be accompanied by a cover letter with the following information:

- The title of the paper
- A brief description of the significance of the paper to the readers of the AJTMH
- A statement confirming that the material is original, has not already been published, and has not and will not be submitted for publication elsewhere as long as it is under consideration by the AJTMH
- Written disclosure of any relationships or support which might be perceived as constituting a conflict of interest
- Names and signatures of all contributing authors accompanied by a statement indicating that they have participated in the study and concur with the submission and subsequent revisions of the manuscript. Electronic signatures and multiple copies of the letter to facilitate gathering of signatures are acceptable, but it is preferable to submit signatures in one batch
- The corresponding author must sign and return the copyright form (available at <http://mc.manuscriptcentral.com/ajtmh>) upon submission.

Authorship. There is no limit to the number of authors that may be listed (except for Images in Clinical Tropical Medicine articles; see below), but only those individuals who contributed substantially to the manuscript should be authors. The AJTMH adheres to standard of authorship as described in the following link: http://publicationethics.org/files/International%20standards_authors_for%20website_11_Nov_2011.pdf. In some cases, for papers with a large number of authors participating in a working group, the group may be cited as author, and all individual authors listed in a footnote.

MANUSCRIPT TYPES

Original research reports. These form the large majority of papers published by the AJTMH and consist of reports of novel research. There is no word limit or limit to the number of references, but efforts should be made to keep manuscripts as succinct as possible. Full reports should include separate sections entitled Abstract, Introduction, Materials and Methods, Results, and Discussion; the last two sections can be combined.

The abstract should not include sub-headings and should contain no more than 200 words. The following sections should be included after the text: Acknowledgments, Financial Support, and Disclosures regarding real or perceived conflicts of interest. Manuscripts should end with a listing of all authors' current addresses, including affiliation, city, country, and email address, followed by References (see Reference section below).

Short reports. This format can be used for submission of important preliminary observations, technique modifications, or data that do not warrant publication as a full paper. Short reports should contain no sub-headings, and be no more than 1500 words in length, with no more than 150 words in the abstract, 3 tables and/or figures, and 20 references

Reviews. The AJTMH will consider reviews on relevant topics in tropical medicine, global health, and related areas. Typically reviews will be submitted by leading authorities in a field. Reviews may be solicited by the editors. Alternatively, for unsolicited reviews, prospective authors are asked to send a presubmission letter to the Journal (cbs15{at}case.edu) for consideration of their proposed topic before submission. We encourage mini-reviews, providing concise reviews of focused topics in no more than 2000 words, but larger reviews will also be considered.

Perspectives: These are short articles (up to 1500 words) on timely topics that offer both a focused review of the subject and a balanced presentation of issues that may include key recent changes or areas of controversy. Perspectives may offer the opinions of authoritative experts on timely topics or personal accounts from those with compelling tropical medicine experiences. As with reviews, some Perspectives may be solicited, and for unsolicited manuscripts a presubmission letter should be sent to the Journal (cbs15{at}case.edu) for consideration of the proposed topic before submission.

Case reports. Short reports of no more than 1500 words can describe a single case or small case series. These must present novel information about a tropical medicine problem of broad interest. Case reports should include an Introduction offering a succinct description of the area, a Case Report section including only clinical information that is relevant to the manuscript, and a brief Discussion.

Images in Clinical Tropical Medicine. Short reports (typically up to 200 words, but up to 400 words if complex descriptions are needed, with 5 references and no abstract) including images that demonstrate particularly informative, striking, or unusual presentations of tropical disease are welcome. Manuscripts that offer visual immediacy and clinical relevance will be prioritized. Images will be published in black and white in the print version of the Journal (author will have the option to pay for color) and in color online. Images articles should have no more than 3 authors.

Book Reviews. These are occasionally solicited by the editors. They should have no sub-headings and be no more than 1000 words in length.

Letters to the Editor. Letters are uncommonly published and should only be responses to recently published articles in the AJTMH. If letters are deemed worthy of publication, they will typically be sent to the authors of the published paper for a response.

Submission process. Prepare your manuscript using a word processing program and save it as a .doc file using Microsoft Word. For items that accompany the text (letters, figures, copyright forms, etc.), you may upload the following file types: .xls, .ppt, .gif, .pdf, .jpg, .eps, .png, and .tif. However, for the manuscript text, do NOT upload .pdf files, but rather use the Word "Save As" option to save your text as a .doc file. Reviewers will see a PDF containing all files you uploaded except for those files you have marked as "Not for Review." Other file types such as LaTeX files and QuickTime movies can be uploaded. Videos are best uploaded in mp4 format.

MANUSCRIPT FORMATTING

Spacing. The text should be in 11 or 12 point type, fully double-spaced, leaving a margin of 1 inch on all sides. Continuous line numbers (NOT restarting with each page) should be included throughout the manuscript and pages should be numbered consecutively.

Title page. This should include, in the following sequence, the title, a list of all authors, and author institutions, identified by superscripts in Arabic numerals. The corresponding author should be denoted by an asterisk, with address, e-mail, and phone number in a footnote. Also include a list of up to 5 key words and the word counts for the abstract and for the text (not including the abstract, figures, or references). The title page should also list the number of figures, tables, and other pertinent information such as supplementary materials.

Title. The manuscript title should be as succinct as possible. Titles should generally not include abbreviations. A running head, for use as a header, should also be provided; the running head should be not longer than 60 characters (including spaces).

Style. American spelling should be used. Indent the first sentence of each paragraph. Use only one space between sentences. For presentation of a series of terms, a serial comma (e.g. "red, white, and blue") should be used. For italics, italicize the words and phrases in your text, but do not underline. Italicize genus and species. For words that were originally foreign, but are now standard English (e.g. i.e., e.g., in vitro, in vivo), italics are not necessary. For complex sentences, parentheses should enclose brackets. Punctuation should follow the parentheses. Superscripts, including reference numbers, should directly follow punctuation marks. Numbers in text should be in Arabic format, except for one. Insert a space between a number and a unit of measure and both before and after the < symbol, > symbol, and = symbol; no space is needed between a number and the % sign.

Abbreviations. Abbreviations are commonly overused, compromising the clarity of manuscripts. Authors are advised to keep abbreviations to a minimum, using them when they are clearer than long terms (e.g. PCR, DNA), but avoiding them when possible when they are non-standard and idiosyncratic. Abbreviations should conform to the AMA Style Manual (<http://amamanualofstyle.com>). Terms should be spelled out with first usage in both the abstract and text, with the abbreviation following in parentheses. After this first usage, the abbreviation must be used consistently. Plurals of abbreviations do not require apostrophes.

Drug names. Proprietary names of drugs may not appear in the title but may be used in conjunction with the generic name when the drug is first mentioned in the abstract, and again when first mentioned in the text. Thereafter, use only the generic name.

Names of organisms. Genus and species should be italicized. After the first usage the genus should be abbreviated with a single letter (e.g. *E. coli*). For different species within a genus, the genus should be spelled out with the first usage of each. Adjectives referring to organisms (e.g. plasmodial, falciparum malaria) are not italicized. Viral nomenclature should be based on the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV; see: <http://amamanualofstyle.com>). A complete listing of ICTV recognized viral species can be found at: http://talk.ictvonline.org/files/ictv_documents/m/msl/4911.aspx.

Figures. Figures should be numbered in Arabic numerals and cited in the text. It should be noted that a fee is required for color illustrations in print, but authors can choose black & white in print, but color online at no charge. All figures should contain a brief legend.

Tables. Tables should be serially numbered in Arabic numerals and cited in the text. Each table should be placed on a separate page at the appropriate point in the text or at the end of the manuscript.

References. References must use standard AJTMH formatting; please refer to prior issues of the Journal and the information below to assure correct formatting. References should be cited by consecutive numbers in the text. The numbers should appear in superscripts that appear after closing punctuation. All authors should be listed. Abbreviate journal names as in PubMed, with journal name and volume number in italics. References should be from peer-reviewed publications. Unpublished sources, including abstracts, conference proceedings, dissertations, and manuscripts not yet accepted for publication, should be cited in parentheses in the text as unpublished data or a personal communication (e.g. Kazura, J., personal communication).

Examples of references:

Durbin AP, Whitehead SS, 2013. The dengue human challenge model: has the time come to accept this challenge? *J Infect Dis* 207: 697–699.

Muirhead-Thomson RC, 1953. Mosquito Behavior in Relation to Malaria Transmission and Control in the Tropics. London, UK: Edward Arnold and Company.

White GW, 2007. Terminology of insect repellents. Debboun M, Frances SP, Strickman D, eds. Insect Repellents. Boca Rotan, FL: CRC Press, 31–46.

GAVI, 2013. Cholera Vaccine Investment Strategy. Available at: <http://www.gavialliance.org/about/strategy/vaccine-investment-strategy/>. Accessed March 11, 2014.

REVIEW PROCESS. After submission, manuscripts are first reviewed by editorial staff. Manuscripts with incorrect formatting or unacceptable language or style will be returned to authors for correction before transmission to the Editor-in-Chief. A common

reason for return at this point is unacceptable quality of English, and so authors who are not fluent in English are encouraged to seek help with writing prior to submission. Acceptable manuscripts will be examined by the Editor-in-Chief and either accepted without review, rejected without review, or assigned to a Section Editor. Section Editors elicit reviews from qualified experts. Reviews are considered by Section Editors and the Editor-in-Chief, a decision is made, and authors are notified of review decisions as promptly as possible.

REQUESTED AND EXCLUDED REVIEWERS. Authors must list at least 4 potential reviewers, including name and contact information. The careful selection of relevant experts as reviewers will facilitate and speed up the review process. Please do not list reviewers from within an author's institution, and, especially for international authors, avoid only local reviewers. Authors may exclude up to 4 individuals as reviewers, although such exclusions should be uncommon.

REVISION OF MANUSCRIPTS. Articles typically require revision before final acceptance. Authors are asked to respond by letter to all concerns raised by editors and reviewers. For each concern the authors should explain exactly how they have modified their manuscript based on the concern, or if they feel that no change is needed, they must justify this decision. Changes to the manuscript must be clearly described, with identification of the site of the change. With resubmission, authors should provide both a marked up version of the earlier submission, with all changes indicated (using Track Changes or highlighting), and a final version. In response to revised manuscripts, editors may seek additional reviews and/or request a second revision, or they may reach a conclusion as to acceptability for publication. Final decisions are confirmed by the Editor-in-Chief.

SHARING OF INFORMATION. Newly determined nucleotide and/or amino acid sequence data must be deposited, and GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers must be included in the Materials and Methods section. It is expected that the sequence data will be released to the public no later than the publication date of the paper. New information on arboviruses should be deposited into the registry described at: <https://wwwn.cdc.gov/arbocat/>.

ETHICAL GUIDELINES. For all human research, the Material and Methods section must declare that informed consent was obtained from adult participants and from parents or legal guardians of minors and it must include the names of appropriate institutional review boards that approved the project. Clinical trials must have been registered with clinicaltrials.gov or an equivalent body, and the trial number should be provided. For studies involving experimental animals, the Materials and Methods section must declare that the experiments complied with guidelines for the humane use of laboratory animals from the National Institutes of Health or an equivalent organization, and it must include the names of appropriate institutional review boards that approved the project. The journal recommends adhering to the guidelines stated in the Belmont Report <http://www.hhs.gov/ohrp/humansubjects/guidance/belmont.html> or those set forth by the Council for International Organizations of Medical Sciences http://www.cioms.ch/publications/guidelines/guidelines_nov_2002_blurb.htm

PAGE CHARGES. These are \$125 per page for manuscripts submitted by a Corresponding Author who is a member of the ASTMH and \$150 per page for non-

members. Charges for printed color figures are \$1,395 per color plate (one page including one or more color figures). There is no charge for figures that are in color only online. Supplemental data such as additional tables and figures can be included in the online version of a paper and referenced in the print version. Page charges are due upon receipt of galley proofs. There are no page charges for Letters to the Editor, book reviews, Images in Clinical Tropical Medicine, or manuscripts that are recruited by the editors.

PAGE CHARGE WAIVERS. Manuscripts with only authors from developing countries and with no sources of support for page charges may qualify for a partial or full waiver of charges. Please appreciate that funds for waivers are limited. We do not grant waivers until a paper is accepted.

AJTMH POLICY ON OPEN ACCESS. Manuscripts may be made freely available online immediately upon publication for a flat fee of \$2,500, paid instead of the usual page charges. This fee does not include additional charges for print color figures. For articles for which the open access fee is not paid, authors must honor a 12-month embargo on current content and not deposit their paper in a public repository without permission from the AJTMH. Email cbs15@case.edu to obtain permission. Authors may elect the open access option on the page charge form when they receive their galley proofs, or they may notify the editorial office of their decision. Published papers will be deposited in PubMedCentral (PMC) by the journal office. Open access articles will be made freely available on PMC at the time of publication. All other articles will be deposited in PMC but will not be available until the 12-month embargo period has expired. Wellcome Trust/Research Council UK authors can self-archive their manuscripts and make these available from PMC and Europe PMC 6 months after the publication date.

ANEXO II

CARTA AO EDITOR



**Universidade Federal da Bahia
C-HUPES - Serviço de Imunologia**

Rua João das Botas, s/n - Canela 40110-160 Salvador - Bahia - Brasil
Tel.: (55 71) 3237-7353/3339-6320 FAX: (55 71) 3245-7110
carvalholp@ig.com.br



Lucas P. Carvalho, Ph.D.
Professor of Immunology
Associate Researcher of Immunology Service
Federal University of Bahia - Brazil

Salvador, Nov 13/2015

Dr. Philip J. Rosenthal, M.D.
Editor-in-Chief
American Journal of Tropical Medicine and Hygiene

Please find attached the review entitled **“CYTOTOXIC ACTIVITY IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS”** to be considered for publication in American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, as previously pre-approved through pre-submission letter.

Cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis* infection is an inflammatory disease in which, the skin ulcer development is associated with the inflammatory response mediated by cells that are important for controlling parasite growth but that may contribute to the pathogenesis. Here we review the recent advances in the study of cytotoxicity in cutaneous leishmaniasis and its contribution to the pathogenesis of the disease.

All authors have seen and approved the content and have contributed significantly to the work. We declare that this work has not been, and will not be submitted for publication elsewhere. We also declare that we had writing assistance for this manuscript.

Sincerely,

Lucas P. Carvalho, Ph.D.

Taís M. Campos

Rúbia Costa

Sara Passos