



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA

MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE PERNAMBUCO**

Recife

2020

MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE PERNAMBUCO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Orientadora: Dra. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro

Coorientadora: Dra. Valéria Pereira Hernandez

Recife

2020

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Cavalcante, Marton Kaique de Andrade

Avaliação de células natural Killer em pacientes com Leishmaniose tegumentar americana de Pernambuco / Marton Kaique de Andrade Cavalcante. – 2020.

167 f. : il.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Carolina Accioly Brelaz de Castro.

Coorientadora: Prof^ª. Dr^ª. Valéria Pereira Hernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Recife, 2020.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Leishmaniose. 2. Sistema imunológico. 3. Linfócitos. I. Castro, Maria Carolina Accioly Brelaz (Orientadora) II. Hernandes, Valéria Pereira (Coorientadora). III. Título.

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2020 - 052

MARTON KAIQUE DE ANDRADE CAVALCANTE

**AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NATURAL KILLER EM PACIENTES COM
LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA DE PERNAMBUCO**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco, para a obtenção do título de Mestre em Inovação Terapêutica.

Aprovado em: 20/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Maíra Galdino da Rocha Pitta (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Profa. Dra. Vanessa Lucília Silveira de Medeiros (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho ao meus pais, Maria e Marcos, e a todos os pacientes portadores de leishmanioses.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por sempre ter me guiado para os melhores caminhos. Mesmo diante de tantas dificuldades, Ele sempre me sustentou e me mostrou que os planos Dele sempre são e serão melhores que os meus. Sem Ele, nada teria sido possível. A Nossa Senhora de Fátima, por sempre interceder por mim.

Aos meus pais, Marcos Antonio e Maria José, por serem exemplos de determinação e humildade. Obrigado por nunca medirem esforços para que eu realizasse meus sonhos e por sempre acreditarem no meu potencial. Obrigado por tudo o que fizeram/fazem por mim. Amo vocês!

Ao meu irmão, Martins Klebesson, pelo apoio e torcida.

À minha avó, Maria Doralice, por todo amor e carinho. Obrigado por cada ligação e risada.

À minha madrinha, Neri Cleide (*in memoriam*), sei que onde estiver, está torcendo e me abençoando.

À minha orientadora, Dra. Maria Carolina Brelaz, pela oportunidade, confiança e amizade. Obrigado por cada palavra de incentivo e por ser um exemplo em minha vida. Além de uma excelente orientadora tenho também uma grande amiga! Saiba que sou seu maior fã. A minha co orientadora, Dra. Valéria Pereira, pela recepção, confiança e por cada palavra de apoio. Sou muito grato a Deus por ter colocado vocês em minha vida.

À minha grande e eterna amiga, Dra. Vitorina Rehn, pelo amor, carinho e por cada conversa. Obrigado por toda ajuda e palavras de apoio e incentivo. Aprendi e aprendo muito com sua sabedoria. São pessoas como você que o mundo precisa!

Ao Dr. Rafael Freitas por toda ajuda e pelas excelentes dicas. Obrigado por cada palavra de incentivo e me mostrar que sempre podemos ir além. Gratidão!

À todos do grupo de pesquisa, Aline Caroline, Ailton Alvaro, Áquila Alcantara, Beatriz Coutinho, Cibelle Carine, Danielle Feijó, Débora Xavier, Ester Amorim, Luan Marques e Mayara Barbalho por toda ajuda e pelo apoio nos momentos bons e ruins. Aprendo muito com vocês no dia a dia. Um agradecimento especial aos meus grandes amigos, Allana Maria, Ana Catarina, Carla Mola, Elis Dionisio, Lucas Portela e

Vanessa Nunes, obrigado pela amizade, apoio e pelas melhores risadas. Mesmo que tudo estivesse dando errado, vocês fazem meus dias ficarem melhores. Obrigado a todos por me ensinarem diariamente a fazer ciência, mesmo em tempos difíceis como o que estamos passando. Agradeço também a Allana Maria e Elis Dionísio pela ajuda na realização das IFIs.

Aos meus amigos da graduação, em especial a Laís Nascimento e Larissa Layne, obrigado por se fazerem presentes em minha vida, mesmo cada um tendo seguido um caminho diferente. Amo vocês!

À todos meus amigos, Karina Nascimento, Karina Baracho, Maria Thais, Riclécia, José Teles, Taiza Gomes, Vitória Carla, Deysiane, Paulo, Rita de Kássia, Débora Rodrigues, Islaine Lima, Mauro Cesar, por todos os momentos compartilhados e pelo apoio, mesmo que por uma mensagem via Whatsapp. Gratidão!

Às minhas grandes amigas Anne Kelly e Tais Helena, não há palavras que expressem meu amor por vocês. Mesmo de longe, se fazem presentes na minha vida diariamente. Obrigado por tudo! A minha sobrinha, Isabella Hellenna, pelo amor e carinho.

À Thiago Vinicius, meu irmão de coração, por toda ajuda, apoio e por sempre me fazer rir. Sua alegria contagia a todos que estão a sua volta. Amo você!

Aos meus amigos do pensionato, Breno Alves, Luiz Carlos, José Pedro, Luis Eduardo, Júlio Cesar e Deyvid. Um agradecimento especial aos meus amigos de quarto, Leonardo Araújo e Roberto Ferreira, obrigado por aguentarem meu estresse e minha ansiedade. Obrigado também pela torcida.

Às minhas amigas, Carmen e Graça, do IAM/FIOCRUZ - PE, pelas conversas, risadas e pelo café sempre delicioso. Obrigado também pelos pãezinhos assados sempre que eu chegava muito cedo no Aggeu. Gratidão meninas!

Aos meus professores da graduação, obrigado por sempre ensinarem a ter empatia e que antes de tudo os pacientes também são pessoas, não apenas uma doença.

Aos meus amigos do Laboratório de Parasitologia do CAV, por todo apoio e pelos bons momentos vivenciados.

À minha turma da pós-graduação, pelos bons momentos convividos e pelas ótimas figurinhas enviadas no grupo do Whatsapp. Desejo muito sucesso a todos!

À Dra. Edileuza Brito e ao Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães, pela ajuda na coleta das amostras.

Ao Instituto Aggeu Magalhães pela disponibilização dos equipamentos necessários para a realização deste estudo.

À CAPES pela concessão da bolsa. Ela foi fundamental para a realização deste sonho!

Ao programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica pela oportunidade. Um agradecimento especial a Paulo Germano, por desempenhar com excelência seu cargo.

À todos os pacientes com leishmaniose tegumentar, sem vocês, nada disso teria sido possível. Cada história me fez crescer e aumentar a vontade de estudar e poder colaborar para o entendimento da doença.

À todos que por ventura não foram citados, mas que colaboraram nessa etapa, o meu muito obrigado!

“Bem aventurado aquele que acreditou,
porque será cumprido o que o Senhor lhe
prometeu.”

-Lucas 1,45

RESUMO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma parasitose com grande impacto na saúde pública. Sabe-se que há uma grande relação entre o desenvolvimento da infecção pela *Leishmania* e o sistema imune, sendo este último o responsável pelo curso da infecção ou pelo seu controle. As células NK são umas das primeiras a começar a combater a infecção através de sua atividade citotóxica, mediante seus grânulos, granzima e perforina. Dessa maneira, o objetivo geral deste estudo foi avaliar *ex vivo* e após cultura, o percentual e o perfil das células NK em pacientes com LTA antes (AT) e após (PT) o tratamento e em indivíduos saudáveis denominados controles (CT). A imunofenotipagem e a dosagem de citocinas foram realizadas utilizando a citometria de fluxo. Após a coleta do sangue venoso, as PBMC foram isoladas e congeladas. Parte das células foi utilizada em estudo *ex vivo* e a outra parte para cultura celular. Para a marcação foi utilizado os marcadores CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD127, NKp46 e NKG2D. Os resultados deste estudo mostram que pacientes com lesão ativa tendem a ter um aumento do percentual de células NK, porém, os pacientes que finalizaram o esquema terapêutico e obtiveram cura clínica apresentam células mais ativadas e com perfil citotóxico. Já as células NKT apresentam maior percentual em pacientes AT, porém quando avaliado o os subtipos, observamos baixos percentuais de células NKT CD4⁺ e CD8⁺. Após estimulação com antígeno total, observamos um maior percentual de células NKT CD4⁺ em pacientes AT, bem como um maior percentual de ativação. Já nas células NKT CD8⁺, observamos uma maior ativação em pacientes PT. Os linfócitos T CD4⁺ apresentarão um maior percentual em pacientes AT, após estimulação com antígeno total, bem como uma maior expressão de NKp46. Entretanto, quando avaliado o perfil citotóxico dessas células, observamos que os pacientes PT apresentam um maior percentual de linfócitos T CD4⁺ citotóxico em relação aos pacientes AT e CT. Com relação aos linfócitos T CD8⁺ observamos uma diminuição no percentual de pacientes AT, após estimulação com antígeno. Além disso, observamos uma maior expressão de Nkp46 e CD127 nos pacientes AT, enquanto que nestas mesma população os pacientes PT apresentaram um maior percentual de células citotóxicas. Dessa forma, conclui-se que as células NK parecem ser cruciais para o combate da infecção, bem como, as células NKT, visto que pacientes AT apresentam um maior percentual destas células. Além disso, as células NK parecem exercer um papel de memória, uma vez que pacientes com cura clínica apresentavam altos percentuais de células ativadas e

citotóxicas. Entretanto, as células NKT parecem exercer também um papel protetivo em indivíduos saudáveis, uma vez que os mesmos apresentaram maior percentual das subpopulações desta célula.

Palavras-chave: Citometria de fluxo. Citocinas . Sistema imune. Linfócitos. Resposta imune inata.

ABSTRACT

American Cutaneous Leishmaniasis (ATL) is a parasitic disease with a major impact on public health. It is known that there is a great relationship between the development of Leishmania infection and the immune system, the latter being responsible for the course of the infection or for its control. NK cells are one of the first to start fighting infection through their cytotoxic activity, through their granules, granzyme and perforin. Thus, the general objective of this study was to evaluate ex vivo and after culture, the percentage and profile of NK cells in patients with ATL before (BT) and after (PT) treatment and in healthy individuals called controls (CT). Immunophenotyping and cytokine assay were performed using flow cytometry. After collecting venous blood, PBMC were isolated and frozen. Part of the cells was used in an ex vivo study and the other part for cell culture. For marking, the markers CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD127, Nkp46 and NKG2D were used. The results of this study show that patients with active lesion tend to have an increase in the percentage of NK cells, however, patients who completed the therapeutic scheme and obtained clinical cure have more activated cells with a cytotoxic profile. NKT cells have a higher percentage in AT patients, but when subtypes are evaluated, we observed low percentages of NKT CD4 + and CD8 + cells. After stimulation with total antigen, we observed a higher percentage of NKT CD4 + cells in AT patients, as well as a higher percentage of activation. In the CD8 + NKT cells, on the other hand, we observed greater activation in PT patients. CD4 + T lymphocytes will present a higher percentage in AT patients, after stimulation with total antigen, as well as a greater expression of Nkp46. However, when assessing the cytotoxic profile of these cells, we observed that PT patients have a higher percentage of CD4 + cytotoxic T lymphocytes compared to AT and CT patients. Regarding CD8 + T lymphocytes, we observed a decrease in the percentage of AT patients, after stimulation with antigen. In addition, we observed a greater expression of Nkp46 and CD127 in AT patients, whereas in these same population, PT patients had a higher percentage of cytotoxic cells. Thus, it is concluded that NK cells seem to be crucial to fight infection, as well as NKT cells, since AT patients have a higher percentage of these cells. In addition, NK cells seem to play a memory role, since patients with clinical cure had high percentages of activated and cytotoxic cells. However, NKT cells also seem to play a protective role in healthy individuals, since they had a higher percentage of the subpopulations of this cell.

Key words: Flow cytometry. Cytokines. Immune system. Lymphocytes. Innate immune response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Distribuição Mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar	27
Figura 2- Número de casos de Leishmaniose tegumentar americana no Brasil, no período de 2012 a 2017	28
Figura 3- Formas evolutivas da <i>Leishmania</i> spp.	30
Figura 4- Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	31
Figura 5- Formas clínicas da leishmaniose cutânea	34
Figura 6- Lesões semelhantes as provocadas pela <i>Leishmania</i> spp	35
Figura 7- Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana	38
Figura 8- Estágios de maturação das células Natural Killer	43
Figura 9- Subtipos das células Natural Killer	44
Figura 10 - Ativação das células NKT	49
Figura 11 - Gel de poliacrilamida do antígeno total de <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	53
Figura 12- Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária após separação das células únicas	58
Figura 13- Estratégia de análise das células NK	59
Figura 14- Estratégia de análise das células NKT	60
Figura 15 - Estratégia de análise dos linfócitos T CD4+	61
Figura 16 - Estratégia de análise dos linfócitos T CD8+	62
Figura 17 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK CD16-; B: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK CD16-/NKp46+; C: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK CD16-/NKG2D+ e D: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK CD16-/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	68
Figura 18 - A: Percentual de células NK CD16-; B: Percentual de células NK CD16-/NKp46+ e C: Percentual de células NK CD16-/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i>	69
Figura 19 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK; B: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK/NKp46+; C: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK/NKG2D+ e D: Percentual <i>ex vivo</i> de células NK/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do	

tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	70
Figura 20 - A: Percentual de células NK; B: Percentual de células NK/NKp46+; : Percentual de células NK/NKG2D+ e D: Percentual de células NK/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i>	71
Figura 21 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT e B: Percentual de linfócitos NKT após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i> em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	72
Figura 22 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD8+; B: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD8+/NKp46+; C: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD8+/NKG2D+ e D: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	73
Figura 23 - A: Percentual de linfócitos NKT CD8+; B: Percentual de linfócitos NKT CD8+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos NKT CD8+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos NKT CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i>	74
Figura 24 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD4+; B: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD4+/NKp46+; C: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD4+/NKG2D+ e D: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos NKT CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	75
Figura 25 - A: Percentual de linfócitos NKT CD4+; B: Percentual de linfócitos NKT CD4+/NKp46+ e C: Percentual de linfócitos NKT CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i>	76
Figura 26 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD4+; B: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD4+/NKp46+; C: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD4+/NKG2D+ e D: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores	

de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	78
Figura 27 - A: Percentual de linfócitos T CD4+; B: Percentual de linfócitos T CD4+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos T CD4+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos T CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i>	80
Figura 28 - A: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD8+; B: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD8+/NKp46+; C: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD8+/NKG2D+ e D: Percentual <i>ex vivo</i> de linfócitos T CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.	82
Figura 29 - A: Percentual de linfócitos T CD8+; B: Percentual de linfócitos T CD8+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos T CD8+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos T CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de <i>L. braziliensis</i>	83
Figura 30 - Concentração de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em sobrenadantes após cultura de PBMC com antígeno total de <i>L. braziliensis</i> de pacientes AT, PT e indivíduos CT.	84
Figura 31 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo CD56 (PE)	114
Figura 32 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo CD4 (PERCPCY 5.5)	114
Figura 33 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo CD8 (APC)	115
Figura 34 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo NKp46 (BB515)	115
Figura 35 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo CD127 (BV421)	116
Figura 36 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo NKG2D (PECF594)	116
Figura 37 - Fluorescence <i>Minus One</i> do anticorpo CD16 (PECY 7)	117

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana, principais espécies responsáveis e localização.	29
Quadro 2 - Tipos de células NK e suas funções	42
Quadro 3 - Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo.	56
Quadro 4 - Combinação dos marcadores utilizados e populações estudadas	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 5 - Principais características do grupo de estudo	65
Tabela 6 - Resultados dos testes laboratoriais realizados em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
<i>V.</i>	<i>Viannia</i>
$\gamma\delta$	Linfócitos gama-delta
AgTotal	Antígeno total de formas promastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>
APC	Fluorocromo aloficocianina
APCH7	Fluorocromo aloficocianina conjugado a H7
BB515	Brilliant blue (azul brilhante) 515nm
BV421	Brilliant violet (violeta brilhante) 421nm
CD	Cluster de diferenciação
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent assay (Ensaio imunoenzimático)
FL	Canal de leitura de fluorescência
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i> (Fluorescência Menos Um)
IDRM	Introdermorreação de Montenegro
IFI	Reação de Imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon-gama
IL	Interleucina
<i>L.</i>	<i>Leishmania</i>
LCTs CD4+	Linfócitos T CD4+ citotóxicos
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
NK	<i>Natural Killer</i> (Células Natural Killer)
NKT	<i>Natural Killer T</i> (Células Natural Killer T)
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PBS	Salina tamponada com fosfato
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Fluorocromo ficoeritina
PECF594	Fluorocromo ficoeritina conjugado com CF594
PE Cy-7	Fluorocromo ficoeritina conjugado com cianina
PERCP-CY5.5	Fluorocromo Peridinin Chlorophyll Protein Complex conjugado com Cy5.5
RPMI	Roswell Park Memorial Institute

SBF	Soro bovino fetal
SINAN	Sistema de Notificação de Agravos de Notificação
Th	<i>T helper</i> (Linfócito T auxiliar)
TNF	Fator de necrose tumoral
Treg	Linfócito T regulatório
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	23
1.1 OBJETIVOS.....	25
1.1.1 Geral	25
1.1.2 Específicos	25
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	26
2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	26
2.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	32
2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL	35
2.4 TRATAMENTO E CURA	38
2.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA	40
2.5.1 Resposta Imune Inata	40
2.5.1.1 Células Natural Killer (NK).....	41
2.5.2 Resposta Imune adaptativa	45
2.5.2.1 Células Natural Killer T (NKT)	47
3 JUSTIFICATIVA.....	50
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	51
4.2 PROCESSO DE SELEÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	51
4.3 EXAMES LABORATORIAIS DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES	51
4.4 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE <i>L. (V.) braziliensis</i>	52
4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)	53
4.6 CULTURA CELULAR	55
4.7 CITOMETRIA DE FLUXO	55
4.7.1 Marcação celular	55
4.7.2 Anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo	56
4.8 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE.....	57

4.9 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS	63
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	63
5 RESULTADOS.....	64
5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA.....	64
5.2 PERCENTUAL <i>ex vivo</i> E APÓS CULTURA DE CÉLULAS NK CD16- E NK CD16+CD56+ DE PACIENTES ANTES E APÓS TRATAMENTO.....	67
5.3 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS NKT <i>ex vivo</i> E APÓS CULTURA DE CÉLULAS DE PACIENTES ANTES E APÓS TRATAMENTO	72
5.4 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+ <i>ex vivo</i> E APÓS CULTURA DE CÉLULAS DE PACIENTES ANTES E APÓS TRATAMENTO	77
5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DOS PERFIS TH1, TH2 E TH17 APÓS CULTURA COM ANTÍGENO TOTAL DE <i>Leishmania braziliensis</i>	84
6 DISCUSSÃO.....	85
7 CONCLUSÕES.....	93
8 PERSPECTIVAS.....	96
REFERÊNCIA.....	97
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE.....	108
APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS.....	110
APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE.....	112
APÊNDICE D - <i>FLUORESCENCE MINUS ONE</i> DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO.....	114
APÊNDICE E - ARTIGO 1.....	118
APÊNDICE F – ARTIGO 2.....	148
ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA.....	165

ANEXO B – SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	166
---	------------

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma antroponose, considerada um problema de saúde pública. É mais encontrada acometendo os mais pobres e em regiões subdesenvolvidas, como a África Oriental, Sudeste da Ásia e na América Latina, (KEDZIERSKI; EVANS, 2014). A leishmaniose é a terceira doença que mais causa morbidade no mundo, perdendo apenas para a esquistossomose e para a malária, principalmente em adolescentes (SAVOIA, 2015). Estima-se que haverá cerca de 900.000 a 1,5 milhões novos casos em todo o planeta, dos quais cerca de 20.000 a 30.000 dos pacientes vão a óbito (WHO, 2016).

Essa é uma parasitose causada por protozoário do gênero *Leishmania* spp, pertencente à família Trypanosomatidae (BRASIL, 2017; SAVOIA, 2015). Atualmente, sabe-se que existem 22 espécies de *Leishmania* que podem infectar o homem e que estão divididas em dois Subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019), sendo as principais espécies envolvidas com a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) a *L. (V.) braziliensis*, a *L. (V.) guyanensis* e a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2017b). Quanto a parasitose, essa pode apresentar-se em duas formas clínicas: a forma cutânea e a forma visceral, conhecido também como Calazar. A forma cutânea, ou tegumentar, pode ainda ser classificada em: localizada, difusa, disseminadas ou mucocutânea (AL-QADHI; MUSA; AL-MULLA HUMMADI, 2015; BRASIL, 2017a; TIUMAN et al., 2011).

O diagnóstico da LTA apresenta dificuldades, uma vez que se assemelha às de outras doenças como tuberculose cutânea, hanseníase virchowiana e infecções micóticas, entre outras. Pelo fato da LTA, apresentar diversas manifestações clínicas, é necessário que o diagnóstico seja baseado na tríade: aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais (BASANO; CAMARGO, 2004; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). O diagnóstico clínico baseia-se principalmente na avaliação das lesões e suas características, além da avaliação dos dados epidemiológicos da doença. Ambos os diagnósticos podem ser somados a testes laboratoriais positivos. Os testes laboratoriais envolvem, principalmente, a Pesquisa Direta (PD), Reação da Cadeia em Polimerase (PCR), além de testes sorológicos como imunofluorescência indireta (IFI), ELISA, biópsia, exame histopatológico e Western Blot (BRASIL, 2017a; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

Atualmente, o tratamento da leishmaniose é feito com quimioterápicos sendo os mais comuns o antimonial pentavalente como o estiboglocunato de sódio e antimoniato de meglumina (BRASIL, 2017a). Existe também a segunda linha de escolha que são as diamidinas aromáticas e anfotericina B, porém estes medicamentos apresentam indicações específicas como casos de alergia ao estiboglocunato e em casos de complicações renais, tendo em vista que apresentam um alto custo. Outra possibilidade de tratamento seria a vacina, porém essa ainda não existe. Uma vacina eficaz ainda é um desafio para os cientistas, tendo em vista que ainda não se sabe ao certo como a imunidade adaptativa do paciente se apresenta diante da parasitose (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; TIUMAN et al., 2011).

O sistema imunológico pode expressar sua resposta à infecção por *Leishmania* através de mecanismos da imunidade inata e imunidade adaptativa. Após a inoculação do parasita na pele do hospedeiro, o mesmo irá interagir com os macrófagos teciduais, os quais irão fagocitá-los (KEDZIERSKI; EVANS, 2014), além de desencadear a ativação do sistema complemento (SANTOS-MATEUS et al., 2016). Dentre as diversas células que constituem a imunidade inata destacam-se as células Natural Killer (NK).

As células NK fazem parte da imunidade inata e correspondem a cerca de 5 - 20% dos linfócitos circulantes. São conhecidas pela sua capacidade de matar rapidamente células infectadas, modificadas ou autorreativas através do mecanismo de exocitose, onde libera seus grânulos interno denominados granzima e perforina (JOBIM; JOBIM, 2009; NARNI-MANCINELLI; VIVIER, 2012; VIVIER et al., 2008, 2011). Além disso, as células NK são grandes produtoras de citocinas como IFN-gama e TNF atuando, desta forma, no recrutamento e ativação de outras células imunológicas para o combate a infecção (ZHANG; TIAN, 2017).

Estas células são reconhecidas por expressar em sua superfície os marcadores CD16+ e CD56+ e pela ausência do marcador CD3. As células NK podem ser divididas em 2 subtipos de acordo com a intensidade dos seus marcadores de superfície: CD3-CD56^{bright} e CD3-CD56^{dim}. A primeira, apresenta uma alta expressão do marcador CD56, e tem como função principal a produção de citocinas e quimiocinas, já a segunda, apresenta uma baixa expressão do marcador CD56, tem função efetora, matando através de seus grânulos, perforina e granzima, as células infectadas (CAMPOS et al., 2017; CROUSE et al., 2015; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Além disso, cerca de 5% do número total das NKs expressam em sua superfície, além do marcador CD56, o marcador CD3, tornando-as assim em células Natural Killer T (NKT) (CAMPBELL; HASEGAWA, 2013; COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001).

Devido a importância das células NK na LTA, nesse trabalho avaliamos as células NK e dos seus subtipos celulares, além da expressão dos marcadores de citotoxicidade, em pacientes com LTA em dois momentos clínicos: antes do tratamento e após o tratamento medicamentoso. Foram realizadas uma comparação entre os dados dos pacientes com dados de indivíduos saudáveis, residentes de áreas não endêmicas para a LTA, denominados grupo controle. As amostras foram avaliadas através da citometria de fluxo, *ex vivo* e a outra parte após estimulação com antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Geral

Avaliar o percentual e o perfil de células *natural killer* em pacientes com leishmaniose tegumentar americana de Pernambuco.

1.1.2 Específicos

- a) Identificar em células mononucleadas do sangue periférico dos pacientes com LTA e após cura clínica, as células NK e T e seus marcadores de citotoxicidade;
- b) Mensurar em pacientes com LTA ativa e controles as citocinas IFN- γ , TNF, IL-4, IL-6, IL-10 e IL-17;
- c) Avaliar no tratamento com Glucantime® a alteração de marcadores imunológicos dos pacientes;

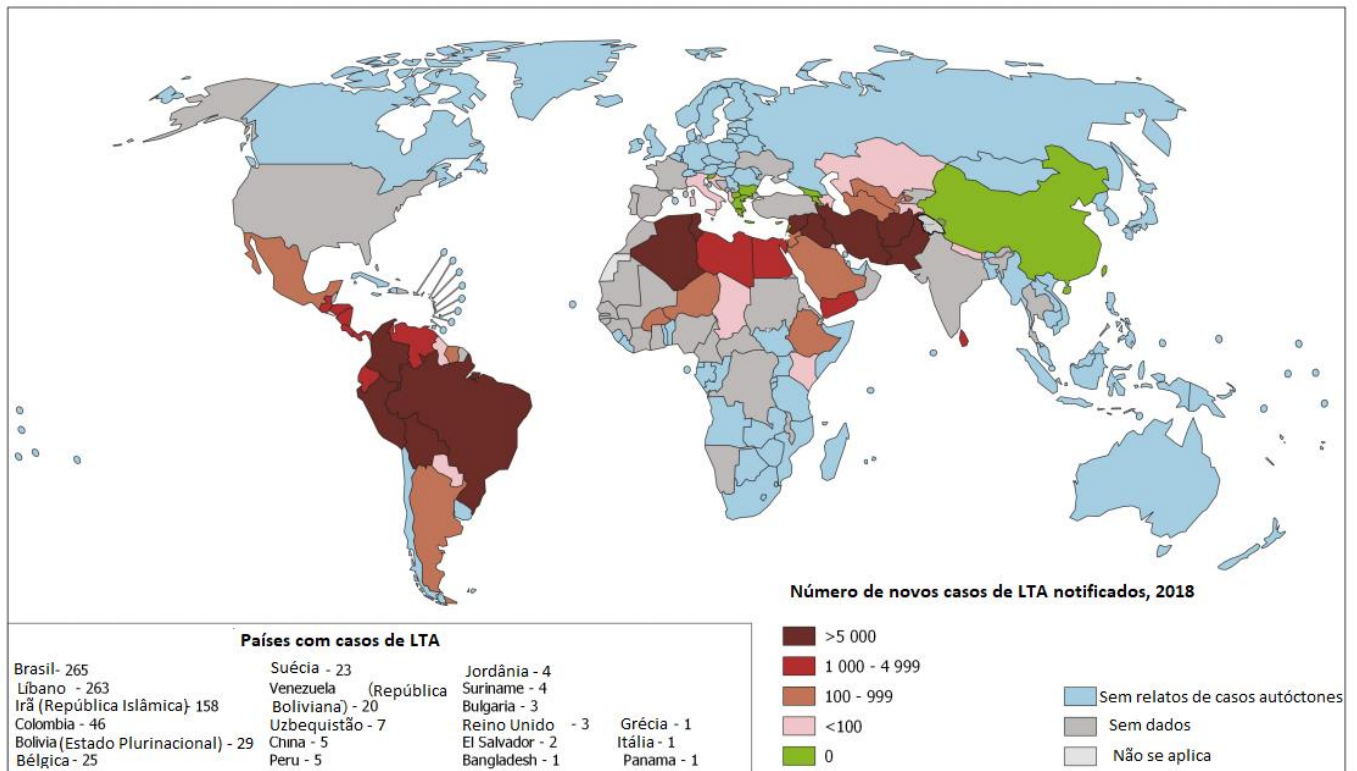
2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ASPECTOS GERAIS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, ligada principalmente a baixo status socioeconômico (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; SAVOIA, 2015). As leishmanioses estão espalhadas em cinco continentes acometendo em torno de 105 países (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019). O número de indivíduos infectados pelo parasito vem aumentando com o passar dos anos, o que pode ser atribuído não apenas aos avanços no diagnóstico e notificação, mas também ao desmatamento, urbanização e migração, guerras, que provocam modificações ecológicas e consequentemente, mudanças no habitat do vetor (BELLO, 2014; GONÇALVES et al., 2019; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; RODRIGUES et al., 2019).

Atualmente, estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam sujeitas a contrair as leishmanioses. São estimados 1,3 milhões de novos casos por ano, dos quais cerca de 20 a 30 mil irão a óbito por consequência da doença (WHO, 2016; RUAGNI, 2015; SANTOS-MATEUS et al., 2016). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) corresponde a cerca de 50% dos novos casos, Cerca de 95% dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Desse total, cerca de dois terços dos novos casos ocorrem principalmente em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e República Árabe Síria (FIGURA 1) (ANVERSA et al., 2018).

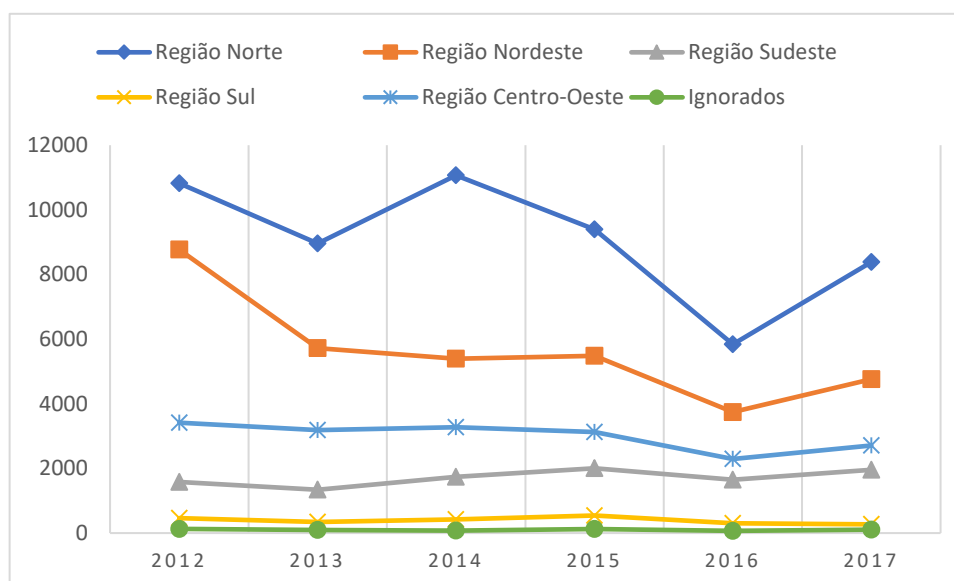
Figura 1 - Distribuição Mundial de casos de Leishmaniose Tegumentar



FONTE: adaptado de WHO, 2018.

Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação – SINAN (2019), no período entre 2012 e 2017, foram registrados 119.576 casos de leishmaniose tegumentar americana (LTA) no Brasil (FIGURA 2). A região Norte do país apresentou o maior número de casos (54.468), seguida da região Nordeste (33.871). A região Sul, destaca-se pelo menor número de casos, sendo registrados 2.358 casos. Do total de casos registrados em 2017, 5.987 pacientes viviam em municípios de extrema penúria, o que corrobora com o pensamento de alguns pesquisadores que associam a LTA como uma doença ligada a pobreza (SINAN, 2019).

Figura 2 - Número de casos de leishmaniose tegumentar americana no Brasil, no período de 2012 a 2017



Fonte: DATASUS, 2019.

Em Pernambuco, no período de 2010 a 2017, foram registrados 2.810 casos de LTA em todo o estado. Em um estudo realizado por De Brito e colaboradores (2012) observou que 60% dos casos estão localizados na Zona da Mata. Embora a doença esteja localizada principalmente nesta região, ela vem se espalhando lentamente no Estado. As pessoas mais afetadas são as que moram em locais pobres e/ou zona rural, já que estas permanecem constantemente expostas aos fatores de risco, principalmente em razão das atividades ocupacionais (DE BRITO et al., 2012).

A *Leishmania* pertence à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Leishmania* e dois Subgêneros *Leishmania* ou *Viannia* (NEVES, 2016). Atualmente, mais de 20 espécies desse parasito são responsáveis pela doença em humanos (Quadro 1) (AL-QADHI; MUSA; AL-MULLA HUMMADI, 2015; ANVERSA et al., 2018). Geograficamente, as leishmanias podem ser divididas em dois grupos: as que estão localizadas no Novo Mundo, como a *Leishmania braziliensis* e *Leishmania mexicana*, e as que estão presentes no Velho Mundo, como a *Leishmania tropica* e a *Leishmania major* (Quadro 1) (PISCOPO; MALLIA, 2006). No Brasil, 7 espécies têm sido implicadas como agentes causadores da LTA: *Leishmania* (*Viannia*) *guyanensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni*, *Leishmania* (*Viannia*)

naiffi, *Leishmania* (*Viannia*) *shawi*, *Leishmania* (*Viannia*) *lindenberg* e *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* (BASSANO; CAMARGO, 2004; DE BRITO et al, 2012). Em Pernambuco, cepas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* e de *Leishmania* (*Viannia*) *shawi* foram isoladas, sendo a *L. (V.) braziliensis* de maior incidência no Estado (DANTAS-TORRES et al., 2017; DE BRITO et al., 2012).

Quadro 1 - Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar Americana, principais espécies responsáveis e localização.

Doença clínica	Espécies de <i>Leishmania</i>	Posição geográfica
Leishmaniose cutânea	Complexo <i>L. tropica</i>: <i>L. (L.) tropica</i> ; <i>L. (L.) aethiopica</i> ; <i>L. (L.) major</i> .	Velho mundo
	Complexo <i>L. donovani</i>: <i>L. (L.) donovani</i> ; <i>L. (L.) infantum chagasi</i> .	Velho mundo
	Complexo <i>L. mexicana</i>: <i>L. (L.) mexicana</i> ; <i>L. (L.) braziliensis</i> ; <i>L. (L.) amazonensis*</i> ; <i>L. (L.) venezuelensis</i> .	Novo mundo
	Complexo <i>L. braziliensis</i>: <i>L. (V.) peruviana</i> ; <i>L. (V.) braziliensis*</i> ; <i>L. (V.) guyanensis*</i> ; <i>L. (V.) panamensis</i> ; <i>L. (V.) lainsoni*</i> ; <i>L. (V.) naiffi*</i> ; <i>L. (V.) shawi*</i> ; <i>L. (V.) colombiensis</i> .	Novo mundo
Leishmaniose Mucosa	<i>L. (V.) braziliensis*</i> ; <i>L. (L.) guyanensis*</i> ; <i>L. (V.) panamensis</i> ; <i>L. (L.) amazonenses*</i> .	Novo mundo
Leishmaniose difusa	<i>L. (L.) amazonensis*</i> ; <i>L. (L.) pifanoi</i> ; <i>L. (L.) aethiopica</i> .	Novo mundo Velho mundo

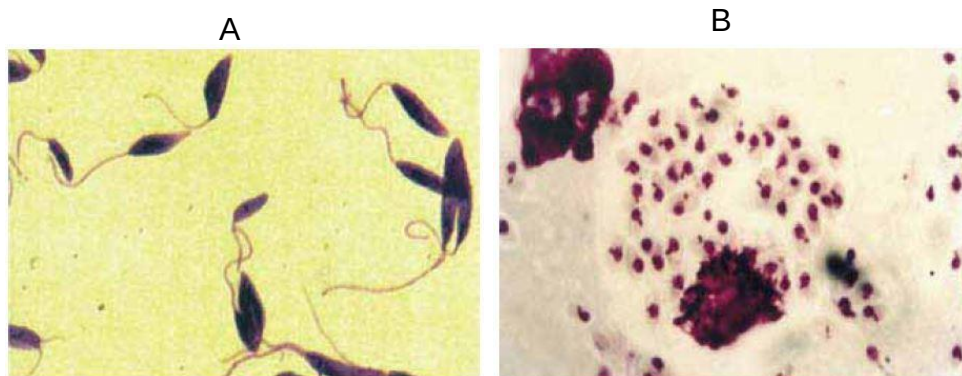
Fonte: adaptado de (PISCOPO; MALLIA, 2006).

Nota: *Espécies encontradas parasitando o homem no Brasil.

A *Leishmania* spp. apresenta duas formas evolutivas: a amastigota, forma intracelular obrigatória e dessa forma encontrada dentro do hospedeiro vertebrado, e a forma promastigota, encontrada no hospedeiro invertebrado (FIGURA 3). A forma amastigota é arredondada, não possui flagelo e sua característica principal está na sua permanência obrigatório no interior de fagossomos de monócitos, histiócitos e macrófagos. Segundo SANTOS-MATEUS et al. (2016) pode-se encontrar amastigotas também no interior de células dendríticas (DC) e de neutrófilos. A forma promastigota é alongada, com flagelo longo e livre. É encontrada no tubo digestivo do

hospedeiro invertebrado. Tanto a amastigota, quanto a promastigota apresentam no seu interior uma estrutura denominada cinestoplasto, o qual consiste de material de DNA mitocondrial e que é de grande utilidade para testes diagnósticos (BASANO, 2004; NEVES, 2016).

Figura 3 - Formas evolutivas da *Leishmania* spp.

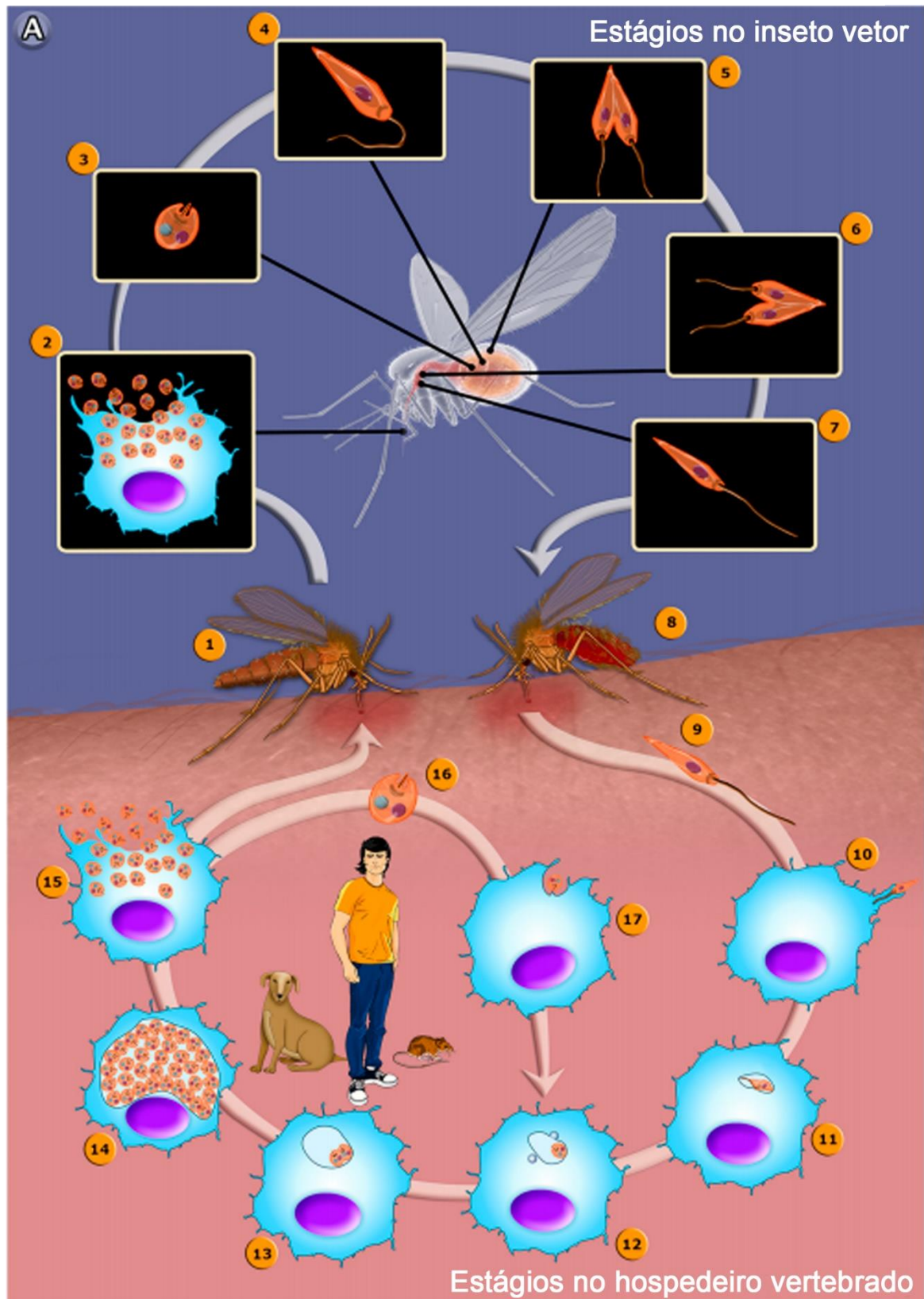


Legenda: A: Forma evolutiva promastigota da *Leishmania* spp; B: Forma evolutiva amastigota da *Leishmania* spp.

FONTE: BRASIL, 2016.

A transmissão da doença tanto para o homem quanto para outros vertebrados, como cães, por exemplo, se dá pela picada do flebotomíneo fêmea infectada. Esta, ao realizar a hematofagia para se alimentar, inocula na derme do hospedeiro as formas promastigotas. Após a inoculação de promastigotas, células fagocitárias irão internalizá-las (fagocitose), as quais dentro dos fagossomos irão se transformar em amastigotas. Essa forma, por sua vez, irá se replicar, a ponto de provocar o rompimento da célula, ficando livre no meio extracelular até serem fagocitadas novamente. O ciclo continua quando um flebotomíneo fêmea realiza o repasto sanguíneo e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos parasitados. Esses macrófagos irão se romper no trato digestivo do vetor, liberando as amastigotas que irão se transformar em promastigotas. Essas por sua vez, em um período de 8 a 20 dias, irão se transformar em promastigotas metacíclicas. O ciclo se reiniciará, assim que o flebotomíneo for realizar uma nova hematofagia (FIGURA 4) (BRASIL, 2017; DANTAS et al, 2014; MACHADO, 2014; NEVES, 2016).

Figura 4 - Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



FONTE: adaptado de (TEIXEIRA et al., 2013)

- Legenda: 1- Ao realizar a hematofagia, o mosquito fêmea do flebotomia, juntamente com as hemácias ingere células imunes, como macrófagos e neutrófilos, infectados pela forma amastigota da *Leishmania* spp.;
- 2- Ao chegar no intestino do inseto, as células imunes vão se romper e liberar a forma amastigota;
- 3- A forma amastigota é liberada e inicia-se o seu processo de transformação;
- 4- Rapidamente, a forma amastigota transforma-se em promastigota;
- 5 e 6- A promastigota começa a se multiplicar por divisão binária;
- 7- A forma promastigota descola-se para o aparelho picador-sugador do inseto e transforma-se em promastigota metacíclicas;
- 8- Ao realizar novamente a hematofagia, o inseto vetor inocula na pele do hospedeiro vertebrado a forma promastigota metacíclica;
- 9- A forma promastigota metacíclica é inoculada na pele do hospedeiro invertebrado;
- 10- A promastigota é capturada por células fagocíticas, como os macrófagos;
- 11- Após a fagocitose, a promastigota é detida num vacúolo chamado fagossomo;
- 12 e 13- A promastigota transforma-se na forma de amastigota e inicia o processo de multiplicação por divisão binária;
- 14- Começa a crescer o número de amastigota dentro da célula;
- 15- A célula fagocítica não suporta a quantidade de amastigotas no seu interior, se rompe e libera a amastigota na corrente sanguínea, a qual pode seguir dois destinos;
- 16- A amastigota pode ser fagocitada novamente por uma nova célula imune ou;
- 17- Pode ser ingerida por um inseto vetor no momento da hematofagia.

2.2 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

As manifestações clínicas da LTA são variáveis e depende principalmente das características do parasito, do vetor e do hospedeiro. Dentre as características destacam-se a dose e a rota de inoculação das *Leishmanias*, interação entre o sistema imune inato e adaptativo do hospedeiro, estado nutricional do hospedeiro, além dos seus fatores genéticos (DESJEUX, 2004). A doença pode-se apresentar desde a forma assintomática até a cutânea ou mucocutânea, sendo esta última a forma mais agressiva da doença. As lesões, na maioria das vezes, localizam-se nas áreas expostas do corpo como rosto, braços e pernas (AL-QUADHI; MUSA; HUMMADI, 2015; BRASIL, 2017).

A forma cutânea é a forma mais comum e pode apresentar desde uma lesão até várias, tendo origem no local de inoculação das promastigotas. As lesões cutâneas podem, inicialmente, aparecer na forma de pápulas e posteriormente evoluir para um maior comprometimento ao paciente. Nesses casos, pode atingir as mucosas, provocando uma grave incapacidade ao paciente e gerando estigma social. As lesões cutâneas podem se apresentar de 3 formas: localizada, disseminada e difusa. A forma cutânea localizada apresenta lesões únicas ou em pequeno número, possuem bordas ovais ou arredondadas, elevada e indolor. Ao contrário da forma localizada, a forma disseminada apresenta numerosas lesões de vários tamanhos e formatos. O número de lesões pode variar de dezenas a centenas, localizadas em partes do corpo

contínuas ou não. A forma cutânea difusa, também conhecida como forma anérgica da doença, apresenta lesões nodulares não ulceradas, que são encontradas por todo o corpo. Essa é a forma mais rara da doença (FIGURA 5) (BRASIL, 2017; DÍAZ; ZERPA; TAPIA, 2013; MACHADO, 2014).

A forma mais agressiva e mutilante da doença é a forma mucocutânea, que pode destruir desde a cavidade nasal até a laringe, podendo atingir as conjuntivas oculares ou até mesmo a mucosa genital e ânus. Essa destruição se dá devido a uma resposta imunológica exagerada. As lesões dessa forma possuem aspecto infiltrativos, com ulcerações e grande destruição tecidual (FIGURA 5) (DESJEUX, 2004; NEVES, 2016).

Figura 5 - Formas clínicas da leishmaniose cutânea



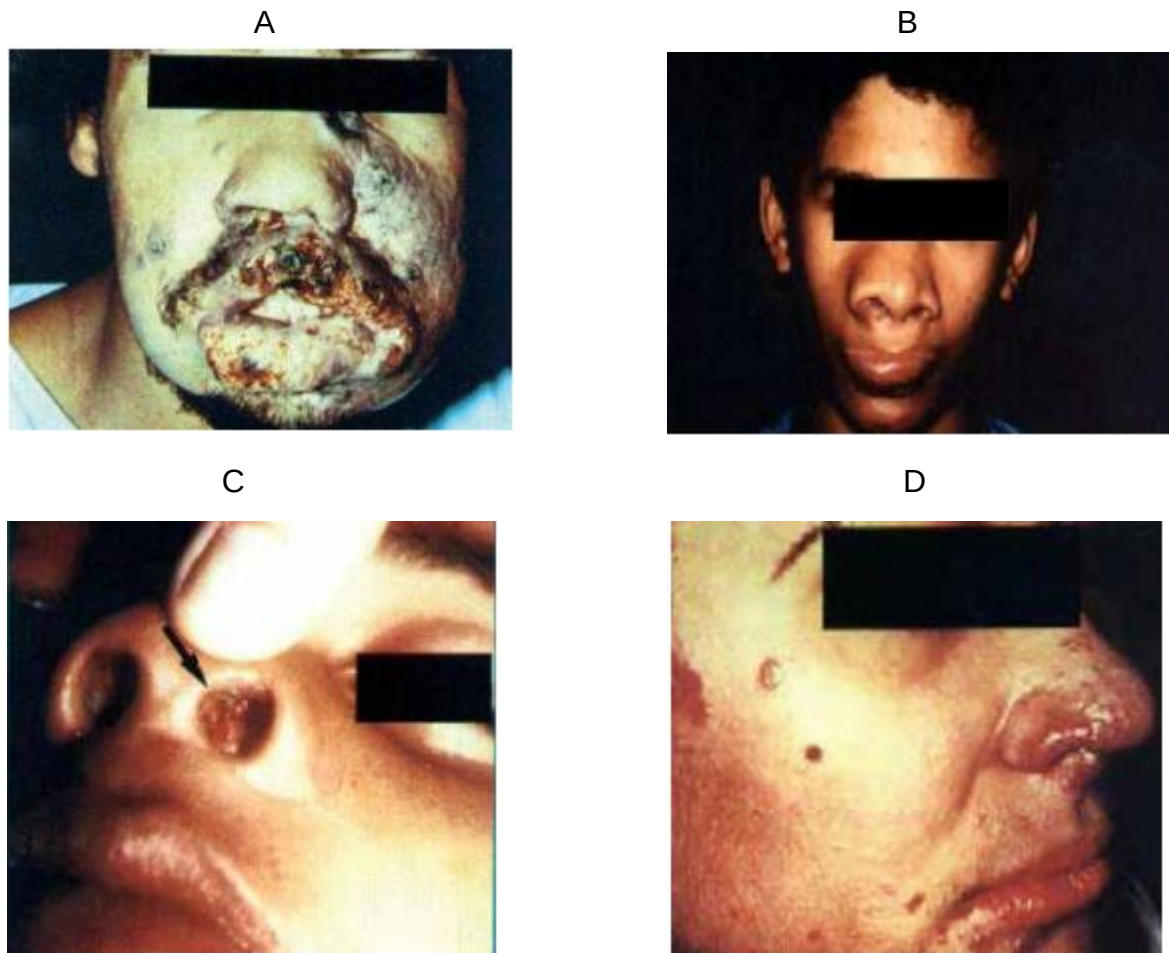
Legenda: A: forma localizada em estágio inicial; B: forma localizada com lesão formada C: forma disseminada; D: forma difusa; E e F: forma mucocutânea.

FONTE: BRASIL, 2017.

2.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da LTA consiste em uma tríade que é composta por aspectos epidemiológicos, clínicos e laboratoriais. Isso porque, até o presente momento, ainda não se tem uma ferramenta que permita detectar a *Leishmania* de maneira rápida e simples. Além disso, as lesões da LTA assemelham-se a lesões de outras doenças como micobacterioses atípicas, entomoftromicose rinofacial, paracoccidioidomicose, histoplasmose, lobomicose, esporotricose, cromoblastomicose, piodermites, rinoscleroma, granuloma facial de linha média, entre outras (FIGURA 6) (BASANO; CAMARGO, 2004; BENTES et al., 2015; BRASIL, 2017; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

Figura 6 - Lesões semelhantes as provocadas pela *Leishmania* spp



Legenda: A: Paracoccidioidomicose; B: Entomoftromicose rinofacial; C: Rinosporidiose e D: Sarcoidose.

FONTE: (BRASIL, 2017a)

A suspeita clínica é feita a partir da associação entre os achados na anamnese/exame físico com os dados epidemiológicos. Entretanto, os exames laboratoriais são de fundamental importância, uma vez que os mesmos permitem realizar um diagnóstico diferencial de outras doenças (BRASIL, 2017a; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

Dentre os métodos laboratoriais, a pesquisa direta é considerada o padrão ouro desde que se iniciaram estudos com *Leishmania*. As chances de encontrar o parasito na lesão vai diminuindo com o tempo de evolução, dessa forma, nos primeiros meses de evolução a sensibilidade está em torno de 100%, já com 6 meses de infecção a sensibilidade cai para 75%. O material a ser analisado pode ser obtido através da realização de uma escarificação, punção aspirativa e/ou biópsia da borda da lesão, sendo realizada a impressão desta biópsia por aposição em lâmina de vidro. Em seguida, pesquisa do parasita é realizada através de esfregaços corados por Giemsa, exame histopatológico, cultura in vitro e/ou inóculo em animais de laboratório (BASANO; CAMARGO, 2004; NEVES, 2016).

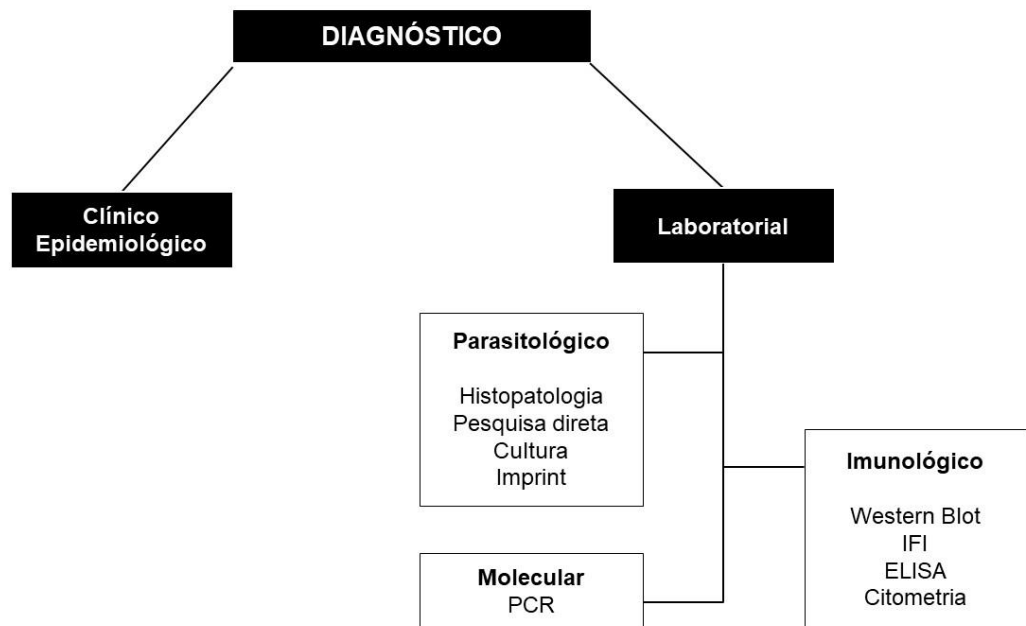
A intradermoreação de Montenegro (IDRM) é utilizada para a avaliação da imunidade mediada por células. Considera-se IDRM positiva quando se observa uma endurecimento local maior ou igual a 5 mm após 48-72 horas de inoculação do antígeno de *Leishmania* no antebraço do paciente. Essa ferramenta apresenta uma alta sensibilidade, que pode chegar a mais de 90%, estando a positividade relacionada diretamente com o tempo de evolução da doença. Já a especificidade, que varia de acordo com o antígeno utilizado, é considerada relativamente baixa, em torno de 75%, uma vez que pode-se haver reatividade cruzada com algumas doenças como a Tripanossomíase Americana, Micose subcutânea, Tuberculose e Hanseníase (BASANO; CAMARGO, 2004; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES et al., 2014; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; SRIVASTAVA et al., 2011).

A citometria de fluxo, uma técnica recente, mas que apresenta uma especificidade de 77% e sensibilidade de 86%, tem sido utilizada como uma ferramenta de diagnóstico para a doença (DE OLIVEIRA et al., 2013). Dentre suas vantagens destacam-se a rapidez e a objetividade nas análises das amostras, além de que esta técnica permite realizar a quantificação de células/ partículas em suspensão (OLIVEIRA et al., 2016). Um estudo realizado por Oliveira e colaboradores

(2013) comparou a citometria de fluxo com a técnica de Imunofluorescência Indireta, o grupo observou que a citometria apresenta um maior desempenho na detecção de pacientes com doença ativa, além de permitir se realizar o monitoramento destes pacientes no término do tratamento. Dessa forma, nota-se que a citometria de fluxo apresenta um papel dual no que diz respeito a estudos com LTA, possibilita o diagnóstico do paciente, bem como pode ser utilizado como ferramenta para critério de cura (OLIVEIRA et al., 2013). Outro estudo realizado por Pereira e colaboradores (2019) utilizou a titulação de IgG através da técnica de citometria de fluxo visando a realização de diagnóstico para a LTA. O grupo conseguiu observar positividade em pacientes com a forma ativa da infecção, demonstrando dessa forma, a eficácia da técnica neste aspecto (PEREIRA et al., 2019). Mendes e colaboradores (2019) avaliou a aplicação da citometria de fluxo como ferramenta para o diagnóstico da LTA e observou que a utilização do IgG1 apresenta excelentes resultados em pacientes com lesão ativa, além disso, o estudo mostrou que a citometria de fluxo apresenta melhor desempenho quando comparado com o ELISA (MENDES et al., 2019).

Além dessas ferramentas, ainda se conta com métodos imunológicos como ensaio imunoenzimático (ELISA), que apresenta especificidade de 100% e sensibilidade de 96%, e Western Blot (sensibilidade podendo chegar a 100%), ou ainda métodos moleculares como a reação em cadeia de polimerase (PCR), que apresenta especificidade variando entre 61,82-100% e sensibilidade variando entre 53,7-97,78% sendo considerada outra opção para diagnóstico laboratorial (BASANO; CAMARGO, 2004; DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; DESJEUX, 2004; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003; PIETRZAKI CERUTTI et al., 2017).

Figura 7 - Diagnóstico da Leishmaniose Tegumentar Americana



FONTE: elaborado pelo autor, 2020.

2.4 TRATAMENTO E CURA

Os antimoniais pentavalentes, drogas de primeira escolha para o tratamento de todas as formas da leishmaniose, são utilizados no Brasil desde a década de 40 (CARVALHO et al., 2019) e podem ser encontrados em duas formulações: stibogluconato de sódio e antimoniato de n-metilglucamina. Com o nome comercial Glucantime®, o n-metilglucamina é o fármaco de primeira escolha. Porém, apresenta uma alta taxa de toxicidade e efeitos colaterais, dentre eles mialgia, artralgia, anorexia, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, entre outros (BRASIL, 2017a; BRITO et al., 2015; TIUMAN et al., 2011).

A administração do Glucantime® é realizado por via intramuscular ou endovenosa, com posologia que pode variar entre 10 a 20 mg Sb+5/kg/dia, durante vinte ou trinta dias. O mecanismo de ação dessa classe de medicamento ainda não está totalmente elucidado, sabe-se apenas que o medicamento interfere na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania* (BRASIL, 2017a).

A administração do quimioterápico Glucantime® obrigatoriamente deve ser feita a nível ambulatorial, o que muitas vezes leva a uma baixa adesão ao tratamento. Isso ocorre porque há uma necessidade de deslocamento dos pacientes até os

ambulatoriais, causando incomodo àqueles que moram em locais distantes, além de também prejudicar a atividade profissional diária (GONÇALVES, 2014).

Recentemente o Ministério da Saúde brasileiro acrescentou Ao Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar uma nova modalidade de tratamento, a via intralesional. A técnica consiste na aplicação do Glucantime® diretamente na lesão. Entretanto, está técnica se restringe a casos específicos como a forma clínica localizada e recidiva cútis, quando a lesão é inferior a 3 cm e em locais com exceção da cabeça e locais periarticulares. Mesmo se tratando de uma técnica bastante invasiva e dolorosa, é notório os benefícios quando comparado com a administração intravenosa, pois necessita de um número reduzido de ampolas. No entanto, vale ressaltar que podem ocorrer os mesmo efeitos colaterais da administração por via endovenosa, entretanto, com grau leve ou moderado (BRASIL, 2017).

Como segunda opções de tratamento temos a Anfotericina B e Pentamidina, que são indicados quando as formas não são responsivas ao tratamento convencional ou quando seu uso é impossibilitado, como em pacientes que apresentam hipersensibilidade ao antimoniato de meglumina, pacientes com insuficiência renal, cardíaca ou hepática. Porém, tais drogas necessitam de um maior tempo de administração parenteral para que seja atingida a curar. Outras drogas têm sido utilizadas para o tratamento da LTA, como a Miltefosina, medicamento que foi desenvolvido inicialmente para o tratamento do câncer, mas que apresenta um relativo sucesso no tratamento tanto da LTA quanto da Leishmaniose Visceral (LV) canina. Este foi o primeiro medicamento oral aprovado em alguns países (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; TIUMAN et al., 2011).

O Ministério da Saúde (2017) estabelece que o critério de cura seja clínico, sendo recomendado o acompanhamento regular durante 12 meses após o tratamento do paciente. A cura é compreendida como a epitelização das lesões ulceradas, regressão total da infiltração e eritema, em um período de até 3 meses após o término do esquema terapêutico (BRASIL, 2017a).

Para o controle da LTA se faz necessário diversas estratégias como vigilância epidemiológica, identificação precoce dos casos e o seu tratamento, incluindo nos casos de coinfeção com HIV; medidas de atuação na cadeia de transmissão, identificando o agente etiológico e vetor predominantes e impedindo a infecção de

vetores e hospedeiros; medidas educativas, incluindo a utilização de proteção individual e distanciamento das construções em relação à mata; medidas administrativas, como saneamento e melhorias das condições habitacionais, além de melhor capacitação dos profissionais de saúde; e o desenvolvimento de uma vacina eficiente e operacional, atual desafio dos pesquisadores da área (BRASIL, 2017a; DESJEUX, 2004).

2.5 RESPOSTA IMUNE NA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA

2.5.1 Resposta Imune Inata

O organismo através do sistema imunológico pode se defender de duas formas contra a infecção pela LTA: através da imunidade inata e pela imunidade adaptativa. A primeira começa a combater poucas horas depois da infecção e se perdura até se iniciar as ações da imunidade adaptativa. Após serem inoculadas na derme, as promastigotas provocam a ativação do sistema complemento por qualquer uma das três vias (alternativa, clássica e lectina). Essas promastigotas ficam opsonizadas para serem fagocitadas pelas células imunes fagocitárias. Dentre essas células fagocitárias, temos os macrófagos, os neutrófilos e as células dendríticas (MACHADO, 2014).

Os neutrófilos são as primeiras células a chegarem ao local da infecção, sendo atraídos por proteínas do complemento, citocinas e quimiocinas. No entanto, essas células não tem o papel de destruir o parasito, uma vez que eles não produzem enzimas proteolíticas adequadas para o combate a infecção. Além disso, pelo fato de serem fagócitos de vida curta, acabam por propiciar a entrada de promastigotas de forma silenciosa no macrófago. Sendo assim, os neutrófilos servem como uma espécie de “cavalo de tróia”, pois esses neutrófilos infectados serão posteriormente fagocitados pelos macrófagos. Entretanto, este também atua na produção de citocinas, que vai atuar na ativação de outras células imunológicas (HURRELL et al, 2015; SANTOS-MATEUS et al, 2016).

Os macrófagos são o destino das *Leishmanias* spp. Ao fagocitar a *Leishmania*, estas ficam presas em vesículas denominados de fagossomos que, em seguida, funde-se com uma vesícula chamada de lisossomos, quem contém enzimas proteolíticas em seu interior. Após a fusão, passa a ser uma única vesícula denominada fagolisossomo. A partir daí ocorrem diversos processos celulares como o estresse oxidativo e a produção de óxido nítrico (NO), ficando assim o fagolisossomo

bastante ácido e hidrolítico. As promastigotas, que são sensíveis a ambientes ácidos e hidrolíticos, começam a serem eliminadas. Todavia, como estratégia de sobrevivência, as promastigotas começam a se transformar na forma de amastigotas, uma vez que estas são mais resistentes (MACHADO, 2014).

Os macrófagos infectados estimulam a produção de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas, que também atuam com o objetivo de provocar a morte do parasito. Dentre as quimiocinas produzidas pelos macrófagos encontra-se a CCL4, que é uma quimiocina inflamatória responsável por recrutar linfócitos T CD4+. Ao mesmo tempo em que a resposta imune inata age, começa a sinalização para a resposta imune adaptativa. Nesta resposta, irão atuar os linfócitos T, atuando na morte do parasita, e os linfócitos B envolvidos na produção de anticorpos (DÍAZ; ZERPA; TAPIA, 2014).

2.5.1.1 Células Natural Killer (NK)

As células NK correspondem de 5–20% dos linfócitos circulantes no sangue e fazem parte do grupo de células pertencentes a imunidade inata (CAMPBELL; HASEGAWA, 2013; COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; LOPEZ-VERGÉS et al., 2016). Essas células podem ser encontradas em diversos locais do corpo como fígado, medula óssea e timo (WU; TIAN; WEI, 2017) e são conhecidas pela sua função em matar células que estão modificadas ou que estão infectadas, além de sua função produtora de citocinas (BOGDAN, 2012; CAMPBELL; HASEGAWA, 2013).

Fenotipicamente, as NK são conhecidas pela ausência do marcador CD3, marcador próprio dos linfócitos T, e pela presença do marcador CD56 e CD16 (Quadro 2). Entretanto, uma subpopulação rara destas células apresenta em sua superfície os marcadores CD3 e CD56, tornando-a assim uma célula Natural Killer T (NKT) (Quadro 2) (CICHOCKI; SITNICKA; BRYCESON, 2014; PAPAMICHAIL et al., 2004; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020).

Quadro 2 - Tipos de células NK e suas funções

Marcadores	População celular	Função
CD3-CD16+CD56 ^{brigh}	Células NK	Produtora de citocinas
CD3-CD16+CD56 ^{dim}	Células NK	Função efetora
CD3+CD16+CD56+	Células NKT	Função efetora

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Há décadas sabe-se que o desenvolvimento das células NK estão relacionadas com a medula óssea (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001). Entretanto, as células NKs são produzidas no fígado durante o ciclo de vida fetal e, só após o nascimento, esta função fica sob responsabilidade da medula óssea.

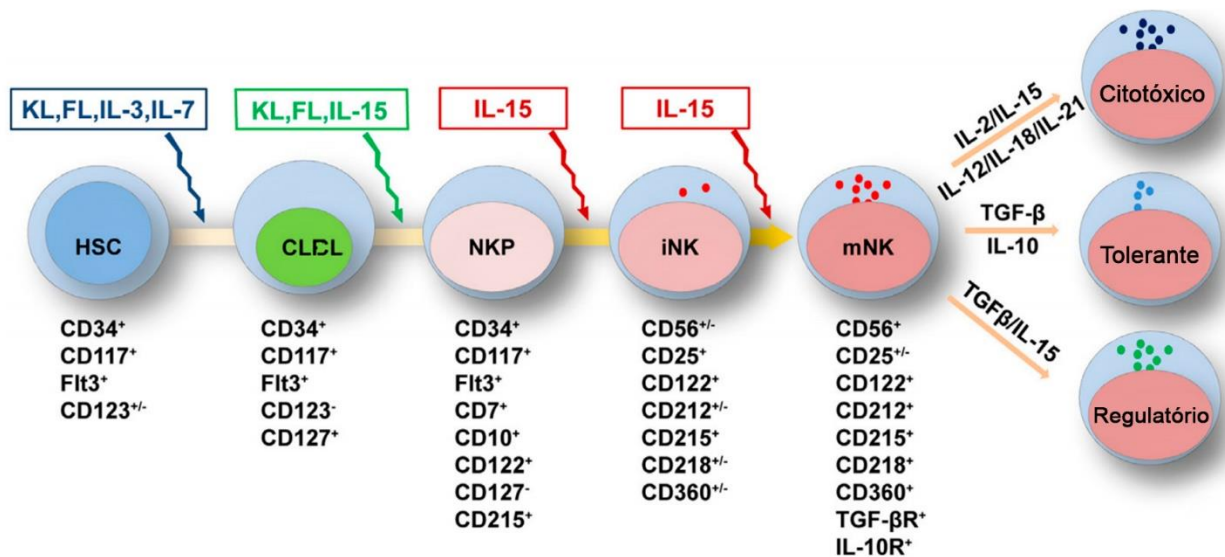
O desenvolvimento das células NK organiza-se em hierarquias e atualmente é tida como um processo linear, a qual conta com múltiplos estágios de desenvolvimento. Este desenvolvimento é regulado por sinais intrínsecos e extrínsecos. Dentre os fatores intrínsecos, temos a atuação dos fatores de transcrição, dentre eles T-bet, Eomes e GATA3, estando estes fatores relacionados com a diferenciação e maturação celular das NKs. Considerando os fatores extrínsecos, está bem estabelecido a ação das citocinas, as quais sua atuação encontra-se bem elucidada (GEIGER; SUN, 2016; MANDAL; VISWANATHAN, 2015; MONTALDO et al., 2014).

O ciclo do desenvolvimento se inicia a partir de células tronco hematopoiéticas (HSCs), as quais sofrem ação de citocina como tirosina quinase 3 (FL), kit ligante (KL) e IL-3, que atuam na proliferação e na sobrevivência das mesmas (MANDAL; VISWANATHAN, 2015). As HSCs dão origem a células linfoides progenitoras (CLPs), que são responsáveis por originar a diversas células linfoides, dentre elas a NK. As células linfoides progenitoras são caracterizadas por expressarem marcadores como CD117+, CD127+ e CD135+, mas não possuem marcadores de superfície que definam grupos de células como CD3, CD4, CD8, CD19 e NK1.1 (FIGURA 8). Destas células, originam-se as células precursoras de NK (NKP) marcada pela expressão de CD122, receptor das citocina IL-15, mas ainda com a ausência dos marcadores considerados definidores celulares (CD3, CD4, CD8, CD19 e NK1.1). Estas células ainda não apresentam marcadores funcionais e imunofenotípicos de células NK maduras, como os marcadores CD16 e CD56. Sabe-se que, o desenvolvimento das células NK está diretamente relacionadas com a ação da IL-15 tanto em humanos

quanto em modelos murinos (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; MROZEK; ANDERSON; CALIGIURI, 1996; WILLIAMS et al., 1998).

Em resposta ao estímulo gerado pela IL-15 as NKPs dão origem as células NK imaturas (iNK) e posteriormente as NK maduras (mNK). Estas diferenciam-se das demais por apresentarem em sua superfície os marcadores como CD56⁺ CD25⁺, CD122⁺ no caso das iNK, e CD56⁺, CD122⁺ e CD16⁺ quando se refere as células mNK, podendo esta última já atuar no combate a tumores ou infecções (WU; TIAN; WEI, 2017).

Figura 8 - Estágios de maturação das células Natural Killer

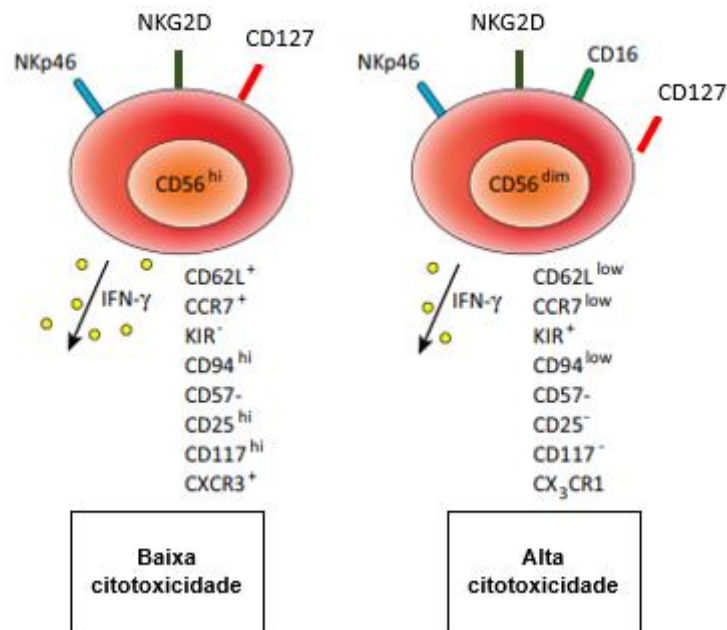


FONTE: adaptado de (WU; TIAN; WEI, 2017)

Nos humanos pode-se encontrar dois subtipos das células NK: CD3-CD56^{dim} e CD3-CD56^{bright} (FIGURA 9). As células CD56^{dim}, 90% do total de NK, correspondem as células maduras. Esse subtipo celular apresenta uma baixa expressão de CD56 e uma elevada expressão do receptor de baixa afinidade para imunoglobulinas G, o CD16. Dessa forma, são as responsáveis pela ação efetora de morte, uma vez que possui uma atividade mais citotóxica. Já o subtipo CD56^{bright}, correspondente a 10%, estão na forma imatura, uma vez que apresentam uma alta expressão do marcador

CD56 e baixa expressão de CD16, ou até mesmo nenhuma expressão deste último, sendo as principais responsáveis pela produção de citocinas como IFN- γ , IL-10 e TNF (COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001; PAPAMICHAIL et al., 2004; VOKURKOVÁ et al., 2010).

Figura 9 - Subtipos das células Natural Killer



Fonte: adaptado de (CROME et al., 2013)

Além disso, elas podem expressar diversos marcadores como NKG2D, NKp46 e CD127. NKG2D é um marcador de ativação, encontrando nas células NK, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como em células $\gamma\delta$, localizado na superfície celular (OBEIDY; SHARLAND, 2009). Esta molécula é conhecida pela sua capacidade de reconhecer quando uma célula passou por episódio de estresse, através do NKG2D ligante (LANIER, 2015). O NKp46, é um marcador de ativação de células NK, o qual está envolvida com a extermínio de células-alvo (HADAD et al., 2015). Sivori e colaboradores (1999) relata que o NKp46 é o principal receptor responsável pela citotoxicidade das células NK humanas (SIVORI et al., 1999). O CD127 é o receptor da IL-7, citocina responsável pelo aumento da sobrevivência, bem como da expansão dos linfócitos. Além de que, A IL-7 atua no melhoramento do desenvolvimento de linfócitos T a nível de medula óssea e timo (DUNHAM et al., 2008; FRY; MACKALL, 2002).

Quadro 3 - Marcadores expressos pelas células NK

Marcadores	População celular
CD3-CD16-CD56+	Células NK
CD3-CD16+CD56+	Células NK
CD3-CD16+CD56+NKp46+	Células NK ativadas
CD3-CD16+CD56+NKG2D+	Células NK citotóxicas
CD3-CD16+CD56+CD127+	Células NK de memória

FONTE: elaborado pelo autor, 2020.

A ativação das NKs se dá através da comunicação com outras células, bem como pela estimulação via citocinas (BOGDAN, 2012). Estudos demonstraram em modelos murinos que para uma ativação eficiente são necessárias cinco etapas: a produção e liberação de IL-2 por linfócitos T CD4⁺; IL-12 oriundo de célula dendríticas (DC); IFN- γ e β que são expressos por macrófagos; receptor de tirosina quinase e por fim, fator de transcrição IRF-2 (BIHL et al., 2010). Uma vez ativadas, essas células irão atuar contra a infecção, seja na produção de citocinas que irão ativar outras células, seja na ação citotóxica através da liberação dos seus grânulos.

2.5.2 Resposta Imune adaptativa

A resposta imune adaptativa tem sido alvo de estudos nos últimos anos, uma vez que os linfócitos T são cruciais na determinação do tipo de resposta imune, além de estarem envolvidos com o dano tecidual induzido pela infecção (NYLÉN; EIDSMO, 2012). A imunidade adaptativa conta com a atuação dos linfócitos B, responsáveis pela resposta humoral, e os linfócitos T, responsáveis pela resposta celular, os quais juntamente com anticorpos específicos, quimiocinas e citocinas são deliberam se haverá ou não o controle/progressão da doença (CARVALHO et al., 2012; DUTHIE et al., 2012).

Dentro dos linfócitos T CD4⁺, existem diversos perfis imunológicos, como o perfil Th1 e perfil Th2. Estes perfis estão associados com a cura e progressão da doença, respectivamente. O perfil Th1 caracteriza-se pela produção de diversas citocinas, sendo os destaques o IFN- γ e TNF. Dentre as outras citocinas produzidas por esse perfil temos a IL-12, linfotóxica, e fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Este perfil é importante para uma resposta imune a patógenos intracelular, ou seja, ele é fundamental para o combate as leishmanias. No entanto, este mesmo perfil que é tido como fundamental para o extermínio das leishmanias, está associado com a patogenia da Leishmaniose Mucocutânea, uma

vez que o excesso de TNF está associado com esse dano. (MARTINS et al, 2014; MENDES et al, 2013; RAPHAEL et al, 2015; SANTOS-MATEUS et al, 2016).

O perfil Th2 caracteriza-se pela produção das citocinas IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- β . Estas citocinas colaboram com a progressão da doença. A IL-4 é responsável pela diminuição da produção de IFN- γ , além de promover a diferenciação de células T naive, ou seja, células que ainda não estão em nenhum dos tipos de perfis, em células efetoras Th2-like, que irão secretar IL-4 e IL-5. Já a IL-10, impede a apresentação de antígenos, além de inibir a produção de IL-2 e IFN- γ , IL-12, IL-1, IL-16 e TNF. A IL-13 promove a proliferação dos linfócitos B, possuindo ação imunossupressora sobre os macrófagos, provocando uma diminuição na liberação de IL-12, IL-1 β e IL-8. O TGF- β , tem sua ação na supressão da atividade leishmanicida que os macrófagos possuem, essa citocina tem a capacidade de diminuir a imunidade mediada por células, suprimindo desta forma a ação do IFN- γ (MACHADO, 2014; MARTINS et al, 2014; RAPHAEL et al, 2015).

Existe ainda o perfil Th17, que se caracteriza pela produção de citocinas como IL-6, IL-17 e IL-22. Entretanto, o papel destas citocinas frente a infecção pela *Leishmania* ainda não está totalmente elucidado. Em um estudo realizado por Pitta e colaboradores (2009) se observou que tanto a IL-17 quanto a IL-22 apresentaram papel protetor na leishmaniose visceral (PITTA et al., 2009). Na LTA, acredita-se que esse perfil esteja envolvido com a progressão e patogênese da doença (BACELLAR et al., 2009). Entretanto, Nascimento e colaboradores (2015) sugerem que estas células atuem na produção de IL-17a, a qual tem capacidade de potencializar a resposta do tipo Th1 e prevenir, dessa forma, a expansão de células Treg e linfócitos produtores de IL-10 (NASCIMENTO et al., 2014). As células Th17 são capazes de preencher a lacuna entre a imunidade inata e adaptativa, além de atrair outras células para o local da infecção em estágios mais avançados da inflamação (BETTELLI et al., 2008), entretanto, ainda se faz necessário mais estudos para uma compreensão mais concisa e detalhada da atuação destas células na LTA.

Os linfócitos T CD8⁺, denominados células citotóxicas, atuam na morte de células infectadas através de liberação de grânulos, semelhante as células NK. As perforina atuam formando complexos de poros na membrana da célula alvo, facilitando dessa forma a entrada das granzimas, que por sua vez irão induzir a morte celular programada por meio da fragmentação do DNA (PIPKIN; LIEBERMAN, 2007;

RUIZ; BECKER, 2007; TRAPANI; SMYTH, 2002). Embora os linfócitos T CD8⁺ desempenhando atividade visando o controle da infecção, Santos e colaboradores (2013) afirmam que a citotoxicidade destas células não é capaz de controlar a infecção por *L. braziliensis* (SANTOS et al., 2013). Brelaz-de-Castro e colaboradores (2012) observaram uma diminuição dessas células em pacientes com LTA que haviam obtido cura clínica (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012).

Mesmo apresentando uma eficiente atividade, os linfócitos T CD8⁺ têm sido associados com a evolução clínica da infecção, sendo uma das prováveis causas dos surgimentos das lesões. Faria e colaboradores (2009) associaram a presença dos linfócitos T CD8⁺ com a presença de lesões, uma vez que o grupo observou um maior número dessas células em pacientes que já apresentavam lesões ulceradas do que em pacientes que estavam na fase inicial da infecção (FARIA et al., 2009).

Até pouco tempo, apenas as células NK e linfócitos T CD8⁺ eram tidas como citotóxicas no universo da imunologia. Entretanto, estudos têm observado que os linfócitos T CD4⁺, até então auxiliar, também atuam com atividade citotóxica. Os LTCs CD4⁺, caracterizam-se pela atividade lítica direta, através da exocitose granular de granzima e perforina (APPAY, 2004; APPAY et al., 2002; CHUN et al., 2007; QUEZADA et al., 2010; VAN DE BERG et al., 2008; XIE et al., 2010; YASUKAWA et al., 2000). Estudos identificaram a atuação destas células em infecções virais, como HIV, Citomegalovírus, Vírus da Hepatite B e C (APPAY, 2004; ASLAN et al., 2006; VAN DE BERG et al., 2008; VAN LEEUWEN et al., 2004; ZAUNDERS et al., 2004), além de doenças autoimunes, como artrite reumatoide (NAMEKAWA et al., 1998) e em tumores, como na leucemia linfocítica crônica (PORAKISHVILI et al., 2001, 2004). Entretanto, ainda se faz necessário mais estudos para um melhor entendimento da atuação e gênese dessas células na LTA.

2.5.2.1 Células Natural Killer T (NKT)

As células NKT são linfócitos T que possuem características tanto destas células quanto de células NK, somando assim função destes dois tipos celulares. Estas células são responsáveis por fazer uma ponte entre as respostas inata e adaptativa e correspondem a cerca de 0,1-0,5% dos leucócitos do sangue periférico. Dentre as características de uma célula NKT destacam-se a presença de receptores de células T (TCR), expressão de CD1d, além da alta produção de citocinas, principalmente IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13 (EXLEY; KOZIEL, 2004; GODFREY et

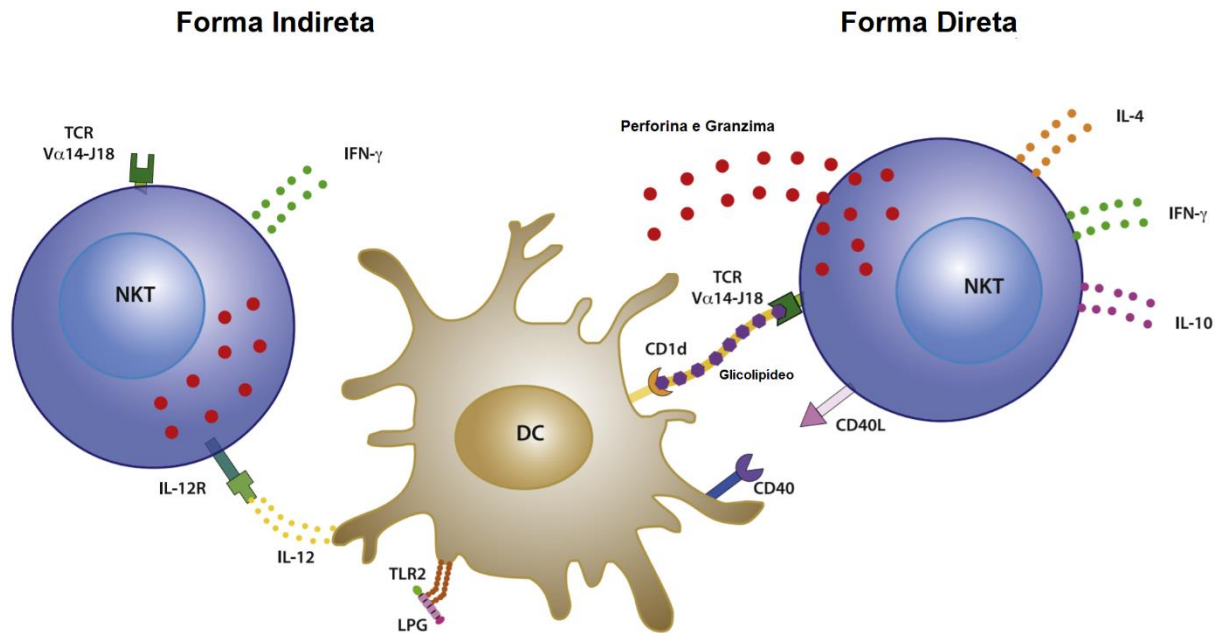
al., 2000; SLAUENWHITE; JOHNSTON, 2015; ZAMORA-CHIMAL et al., 2017; ZAMORA-CHIMAL; HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2017).

O surgimento das NKT ainda não está bem elucidado. Ainda há muita controvérsia quando a sua verdadeira origem, entretanto, a teoria mais aceita é que estas células surjam no timo. Estudos murinos demonstraram uma ligação timo-dependente destas células, onde ratos neonatos timectomizados não apresentaram o desenvolvimento destas células (GODFREY et al., 2000; HAMMOND et al., 1998).

As NKT podem ser classificadas em dois subtipos de acordo com polimorfismo da cadeia alfa da TCR: Tipo I ou Invariante (iNKT) e Tipo II ou variante (NKT). As células iNKT apresentam um baixo grau de polimorfismo na cadeia alfa (V α 24-J α 18/V β 11), e representam 70% das células NKT (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007).

As células NKT podem ser ativadas por duas vias (FIGURA 10): de forma direta através da ligação do TCR com o CD1d e de forma indireta através de citocinas, oriundas de células APC, como IL-12 e IL-18 (NAGARAJAN; KRONENBERG, 2007; ZAJONC; GIRARDI, 2015). Na primeira via glicolipídios do antígeno são apresentados pela CD1d de células APC, como as DC, as NKT, gerando assim uma produção de citocinas como IFN e IL-4, aumentando também a citotoxicidade através das granzima e perforinas. Na segunda via de ativação (via indireta), os glicolipídios estimulam os receptores toll-like do tipo 2 (TLR2) das DC, a produzirem e liberarem IL-12, que vai atuar ativando as células NKT. Entretanto, esta via é restrita, fazendo com que a NKT atue apenas produzindo IFN- γ (ZAMORA-CHIMAL; HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2017).

Figura 10 - Ativação das células NKT



FONTE: adaptado de (ZAMORA-CHIMAL; HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2017)

Ainda são escassos estudos sobre a função da NKT na infecção pela *Leishmania* (ZAMORA-CHIMAL; HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2017). Um estudo realizado por Campos-Martín et al (2006) observou que as células dendríticas infectadas por *Leishmania infantum* aumentam a expressão de CD1d, fazendo que com as células NKT reconheçam essas células. Além disso, os pesquisadores observaram que o percentual das células NKT que produziam IFN-γ eram duas vezes maiores que as células produtoras de IL-4. Dessa forma, pode-se observar que as células NKT podem atuar tanto na produção de citocinas para a ativação de outras células imunológicas, como os linfócitos T, bem como atuam de forma citotóxica em células infectadas que não podem ser lisadas por células NK convencionais (CAMPOS-MARTÍN et al., 2006).

3 JUSTIFICATIVA

A LTA constitui um grande problema de saúde pública no Brasil (GOTO; LINDOSO, 2010), principalmente nas regiões norte e nordeste. O número de casos desta doença ainda é elevado, relacionando-se principalmente com o desmatamento florestal, fazendo com que o vetor se desloque para o centro urbano. Atualmente, sabe-se que o curso da infecção pela *Leishmania* spp. está ligado a fatores como carga parasitária, nutrição do hospedeiro e, principalmente, pela resposta imune que o mesmo apresenta (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012). O controle e a cura dessa doença ainda dependem essencialmente de progressos científicos (DESJEUX, 2004). Embora haja uma rica literatura com modelos animais sobre a resposta imune na LTA, ainda há pouca uniformidade acerca das respostas imunes protetora e patogênica em humanos, principalmente no que condiz a utilização de amostras de biópsias, correlacionando assim com células sanguíneas circulantes (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; NYLÉN; AKUFFO, 2009; SANTOS-MATEUS et al., 2015). Dessa forma, é importante estudos com materiais humanos, como por exemplo as PBMC, a fim de se caracterizar com maior precisão a atuação do sistema imune frente a infecção pela *Leishmania* spp. (LUCA; MACEDO, 2016; OLIVEIRA et al., 2014). Sabe-se que as respostas mais eficientes estão ligadas com a resposta imune celular (SANTOS-MATEUS et al., 2015).

As células NK fazem parte da resposta imune inata e são conhecidas pela sua habilidade de matar células infectadas, bem como de produzir citocinas que atua na ativação de outras células imunológicas. Há algum tempo, estudos tem se dedicado a entender a atuação das células NK na LTA, bem como suas contribuições na cura ou progressão da doença. Alguns autores sugerem que estas células atuam no combate da infecção devido a sua ação citotóxica, entretanto, outros autores sugerem que estas células são responsáveis pelo surgimento e exacerbação das lesões (ARANHA et al., 2005). Até o presente momento, não se há um consenso de qual a verdadeira função das células NK na LTA. Sendo assim, faz-se necessário novas e constantes pesquisas acerca dessas células e do desenvolvimento da resposta imune frente à infecção por *Leishmania* spp., com o objetivo de se entender e chegar a conclusões que possibilitem o desenvolvimento de novos tratamentos, diagnósticos e vacinas para o combate eficaz a LTA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

Trata-se de um estudo do tipo experimental ou ensaio clínico não randomizado. No estudo foram realizadas comparações entre pacientes com LTA apresentando lesão ativa e pacientes com cura clínica, sendo que esta foi alcançada após tratamento com Glucantime®. Ainda temos um grupo formado por sujeitos sem história prévia de LTA, denominado controle. Todos foram escolhidos a partir de critérios de disponibilidade ou conveniência (ROUQUAYROL; GURGEL, 2013). O estudo foi realizado em regiões endêmicas para a LTA, como os municípios de Igarassu, Ipojuca e Moreno. As coletas foram realizadas no período de agosto de 2018 a dezembro de 2019.

4.2 PROCESSO DE SELEÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

Os pacientes foram procedentes de áreas endêmicas para LTA em Pernambuco, como as cidades de Igarassu, Ipojuca e Moreno, e selecionados através do Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães (IAM). Todos os pacientes foram atendidos por médico dermatologista para confirmação do diagnóstico. Os pacientes foram esclarecidos do objetivo do estudo e acompanhados para realização de coleta de sangue antes (AT) (N=22) e após (PT) (N=12) a cicatrização de sua(s) lesão (ões) por utilização de tratamento quimioterápico com Glucantime® (antimoniato de N-metilglucamina), sob orientação médica. O grupo controle (CT) (N=17) foi constituído por indivíduos considerados saudáveis, sem apresentação clínica da doença ou sua cicatriz característica, residentes em área não endêmica e que não receberam transfusão sanguínea. Os procedimentos para coleta de sangue só foram realizados após todos os indivíduos concordarem em assinar o “Termo de Consentimento Livre e Esclarecido” (APÊNDICES A, B e C).

4.3 EXAMES LABORATORIAIS DE AVALIAÇÃO DOS PACIENTES

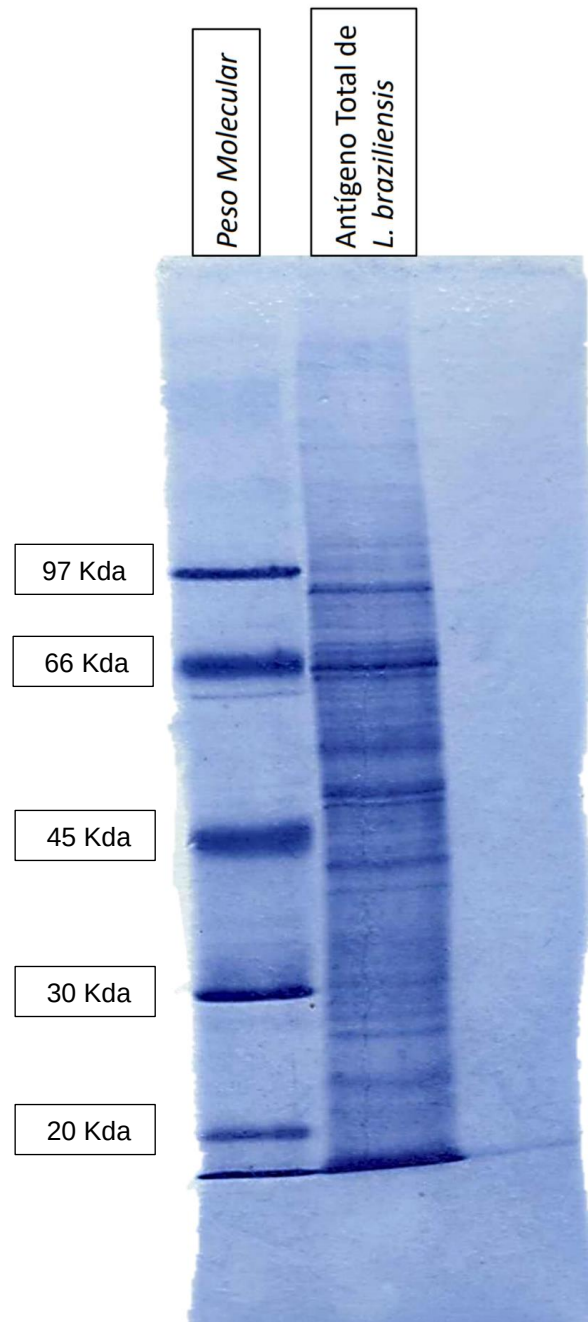
Além da avaliação clínica e epidemiológica, os pacientes foram submetidos a alguns procedimentos laboratoriais para confirmação da doença em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmaniose do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães (CPqAM-FIOCRUZ) e com a prefeitura de Vitória de Santo Antão. Os exames incluíram a) pesquisa direta realizada em material obtido através de escarificação da borda da lesão, utilizando lâmina de bisturi estéril; b) punção aspirativa realizada com seringa descartável contendo 0,3ml de solução salina estéril, aplicada na borda da

lesão e posterior aspirado do conteúdo para inoculação em hamster; c) biópsia executada com punch medindo 4-6 mm de diâmetros e parte dos fragmentos retirados da borda da lesão ativa destinada ao isolamento do parasito e realização da extração para obtenção do DNA; d) imunofluorescência indireta (IFI) e e) reação em cadeia de polimerase (PCR).

4.4 OBTENÇÃO DO ANTÍGENO DE *L. (V.) braziliensis*

Formas promastigotas (cepa MHOM/BR/75/M2903), cultivadas *in vitro*, foram expandidas em meio de cultura Schneider's (Sigma, St. Louis, MO) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SBF; Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO) até a fase de crescimento exponencial. A massa parasitária foi então submetida a três lavagens com salina tamponada (PBS – pH 7,2) através de centrifugações a 2500x rpm, por 10 minutos, a 4°C. Posteriormente o pellet celular foi ressuspensionado em 750 µl de tampão de lise branda, e 250µl de inibidor de protease. A suspensão foi colocada em tubos eppendorf, congelada e descongelada sete vezes em nitrogênio líquido e banho-maria até as células estarem completamente lisadas. A suspensão foi então centrifugada a 4°C, 15.000 x rpm por 15 min. O sobrenadante foi coletado e guardado. Em seguida, foi submetido a uma dosagem protéica segundo o método de Bradford (1976) modificado por Read & Northcote (1981), além de eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) segundo Laemmli (1970). Após esses procedimentos, as frações antigênicas foram armazenadas a –80°C até a utilização nos ensaios de cultura celular.

Figura 11 - Gel de poliacrilamida do antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis*



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMC)

Vinte mililitros (20ml) de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo. O sangue foi diluído em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia). Após centrifugação (400xG, 35') foi obtida uma camada

de PBMC. As células foram lavadas duas vezes com 10 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e submetidas a nova centrifugação (300xG, 10'). Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspensionado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular (10µl) foi então removida, diluída em azul de trypan (90µl) (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer.

Após a separação e contagem das PBMCs, foi adicionado as células 900µl de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 100µl de DMSO. A amostra foi então homogeneizada e armazenada em um tubo vial de 2 ml. O vial foi levado para o Mr Frosty (Nalgene) e armazenado no Deep Freezer – 80°C e, no dia seguinte, foi transferido para um recipiente contendo nitrogênio líquido.

Para utilização, as amostras foram retiradas no nitrogênio, colocadas em gelo e rapidamente foram transferidas para banho maria (37°C), onde permaneceram até restar pequenas quantidades de cristais de gelo. Rapidamente, as amostras foram levadas para o fluxo, depositadas por gotejamento (durante 30 segundos) em um tubo falcon de 15 ml, e ressuspensionadas inicialmente com 1 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO), adicionado por gotejamento (durante 30 segundos) e em seguida foi completado o volume para 5 ml, ainda por gotejamento e posteriormente completado para o volume final de 10 ml (adicionado lentamente pela parede do tubo). As células foram então centrifugadas (300 G x 6 minutos), foi descartado o sobrenadante e ressuspensionadas novamente com 10 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). As amostras foram levadas para estufa à 37°C / 5% de CO₂ durante 24h (RAMACHANDRAN et al., 2012). Passado o tempo de descanso, as células foram centrifugadas (300 G x 6 minutos), ressuspensionadas em 1 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular (10µl) foi

então removida, diluída em azul de trypan (90µl) (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer. Após contagem, foram realizados cálculos para ajustar a concentração de células ($0,5 \times 10^6$ células/ml). Parte das células foram usadas para marcação *ex vivo* e a outra parte para cultura com antígeno total de *Leishmania braziliensis* (obtido segundo o item 5.4).

4.6 CULTURA CELULAR

As PBMC foram cultivadas em tubos de polipropileno de 15 ml (BD Falcon™), na concentração de $0,5 \times 10^6$ células/ tubo. O cultivo foi realizado em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). As células foram estimuladas com antígeno total de antígeno total de *Leishmania (Viannia) braziliensis* (10 µg/ml). Células mantidas apenas em meio de cultura foram utilizadas como controle. Os tubos foram mantidos em estufa à 37°C / 5% de CO₂ durante 72 horas.

Passado o tempo de incubação, as células foram centrifugadas (300 G x 10 minutos), e os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20°C para futuras análises de citocinas. O pellet de células foi ressuscitado em 1 ml de PBS-Wash para posterior marcação para análise por citometria de fluxo.

4.7 CITOMETRIA DE FLUXO

4.7.1 Marcação celular

PBMCs após descongelamento ($0,5 \times 10^6$) ou cultura celular (após 72h) foram colocadas em tubos de poliestireno, suspensas em 1 ml de PBS-Wash e centrifugadas a 300 G por 10 minutos. O sobrenadante foi então desprezado e foi acrescentado 100 µL de PBS-Wash. As células foram então incubadas com anticorpos de superfície (anti- CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, NKp46 e NKG2D) durante 30 minutos a 8°C ao abrigo da luz. Passando esse tempo, foi adicionado 1 ml de PBS-Wash ao tubo e foi feita a centrifugação (300 G x 10 minutos). As células foram então ressuscitadas em 300 µL de PBS-Wash. As amostras foram analisadas (100.000 eventos/tubo) no citômetro de fluxo (BD FACS ARIA III).

4.7.2 Anticorpos monoclonais utilizados na citometria de fluxo

Os anticorpos que foram utilizados neste estudo foram adquiridos da empresa BD Pharmingen (San Jose, CA) e Immunotools (Friesoythe, Germany), conforme listados na tabela abaixo (Quadro 4).

Quadro 4 - Lista de anticorpos utilizados na citometria de fluxo.

Anticorpo anti-	Fluorocromo	Clone	Isotipo	Fabricante
CD3	APC-H7	SK7	IgG1k de rato	BD
CD4	PerCP-Cy 5.5	RPA-T4	IgG1k de rato	BD
CD8	APC	RPA-T8	IgG1k de rato	BD
CD16	PE-CY7	3G8	IgG1k de rato	BD
CD56	PE	B-A19	IgG1 de rato	Imunotools
CD127	BV421	HIL-7R-M21	IgG1k de rato	BD
NKp46	BB515	9E2/NKp46	IgG1k de rato	BD
NKG2D	PE-CF594	1D11	IgG1k de rato	BD

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

As populações celulares foram avaliadas utilizando a combinação dos marcadores descritos no quadro 5.

Quadro 5 - Combinação dos marcadores utilizados e populações estudadas

Marcadores	População celular
CD3+CD4+	Linfócitos T CD4
CD3+CD4+NKp46+	Linfócitos T CD4 citotóxico
CD3+CD4+NKG2D+	Linfócitos T CD4 citotóxico
CD3+CD4+CD127+	Linfócitos T CD4 de memória
CD3+CD8+	Linfócitos T CD8
CD3+CD8+NKp46+	Linfócitos T CD8 citotóxico
CD3+CD8+NKG2D+	Linfócitos T CD8 citotóxico
CD3+CD8+CD127+	Linfócitos T CD8 de memória
CD3-CD16-CD56+	Células NK
CD3-CD16+CD56+	Células NK
CD3-CD16+CD56+NKp46+	Células NK ativadas
CD3-CD16+CD56+NKG2D+	Células NK citotóxicas
CD3-CD16+CD56+CD127+	Células NK de memória
CD3+CD16+CD56+	Células NKT
CD3+CD16+CD56+CD4+	Células NKT CD4+
CD3+CD16+CD56+CD4+NKp46+	Células NKT CD4+ ativadas
CD3+CD16+CD56+CD4+NKG2D+	Células NKT CD4+ citotóxicas
CD3+CD16+CD56+CD4+CD127+	Células NKT CD4+ de memória
CD3+CD16+CD56+CD8+	Células NKT CD8+

Quadro 6 - Combinação dos marcadores utilizados e populações estudadas (Continuação)

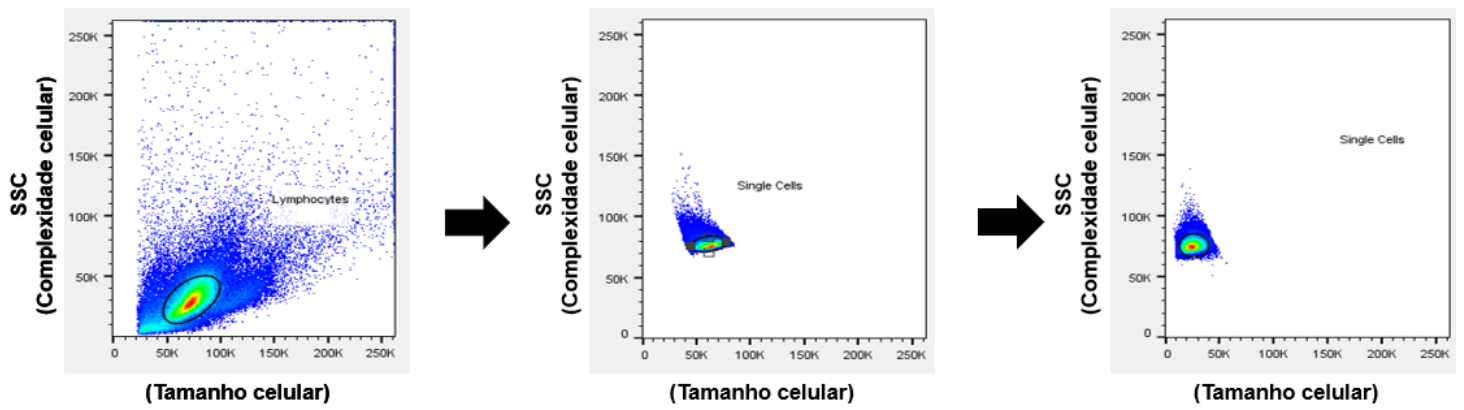
CD3+CD16+CD56+CD8+NKp46+	Células NKT CD8+ ativadas
CD3+CD16+CD56+CD8+NKG2D+	Células NKT CD8+ citotóxicas
CD3+CD16+CD56+CD8+CD127+	Células NKT CD8+ de memória

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

4.8 ESTRATÉGIA DE ANÁLISE

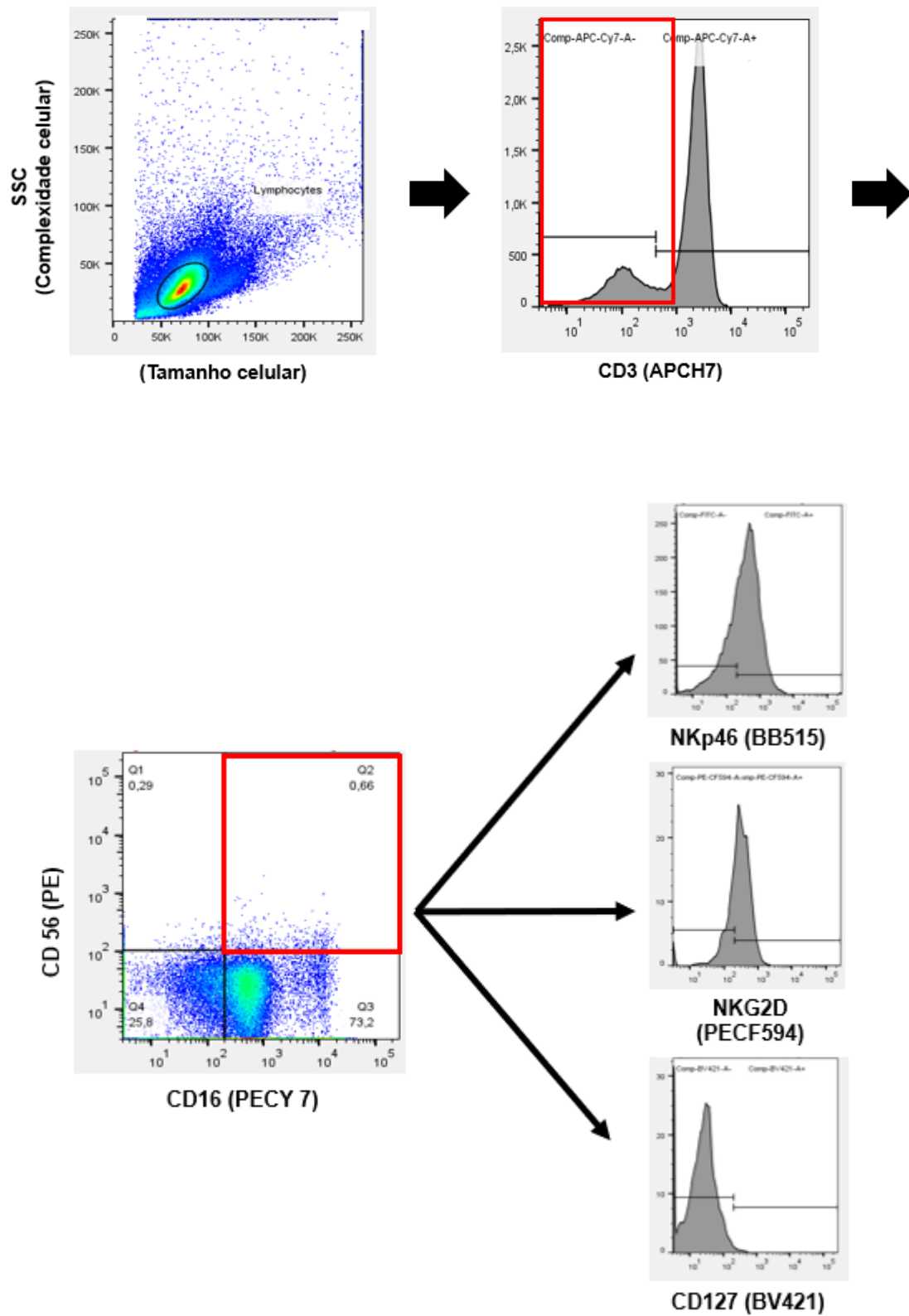
Inicialmente, foram realizadas delimitação da região linfocitária no gráfico de Dispersão Frontal (FSC) versus Dispersão lateral (SSC) (FIGURA 12). A partir dessa região foram construídos gráficos de fluorescência e seus respectivos histogramas, delimitando-se os quadrantes/ regiões de análise. Os limites dos quadrantes foram baseados na população negativa, titulações dos anticorpos, bem como em controles utilizando todos os anticorpos menos um (Fluorescência menos um do inglês *Fluorescence Minus One* - FMO) (APÊNDICE D), sendo esta última utilizada principalmente em populações raras, como as NKTs. Os valores considerados para análise da fluorescência foram os do percentual da região linfocitária para cada quadrante e/ou histograma. Para as células NK, primeiro foi delimitada a região linfocitária, em seguida, seguido da verificação das células que expressavam o marcador CD3, através do histograma (FIGURA 13) para definir de maneira mais precisa as células NK (CD3-), foram identificadas as células que expressavam de forma duplo positiva os marcadores de superfície CD16 e CD56 (FIGURA 13), e a partir destas, verificou-se o percentual das células que também expressavam o marcador NKG2D, NKp46 e CD127 (FIGURA 13). Foi feita uma análise mais específica das células NKT, delimitado a região linfocitária, seguido da verificação das células que expressavam o marcador CD3, através do histograma (FIGURA 14) para definir de maneira mais precisa as células NKT (CD3+). A partir desta população, pode-se diferenciar as células positivas e negativas, e dentro dessas as que expressavam os marcadores CD16 e CD56 (FIGURA 14). As células NKT foram avaliadas quanto a expressão de CD4, CD8, NKG2D, NKp46 e CD127 (FIGURA 14). Além destas populações, também foram avaliados os linfócitos T CD4+ (FIGURA 15) e os linfócitos T CD8+ (FIGURA 16).

Figura 12 - Exemplo de gráfico de FSCxSSC em PBMC com delimitação na região linfocitária após separação das células únicas



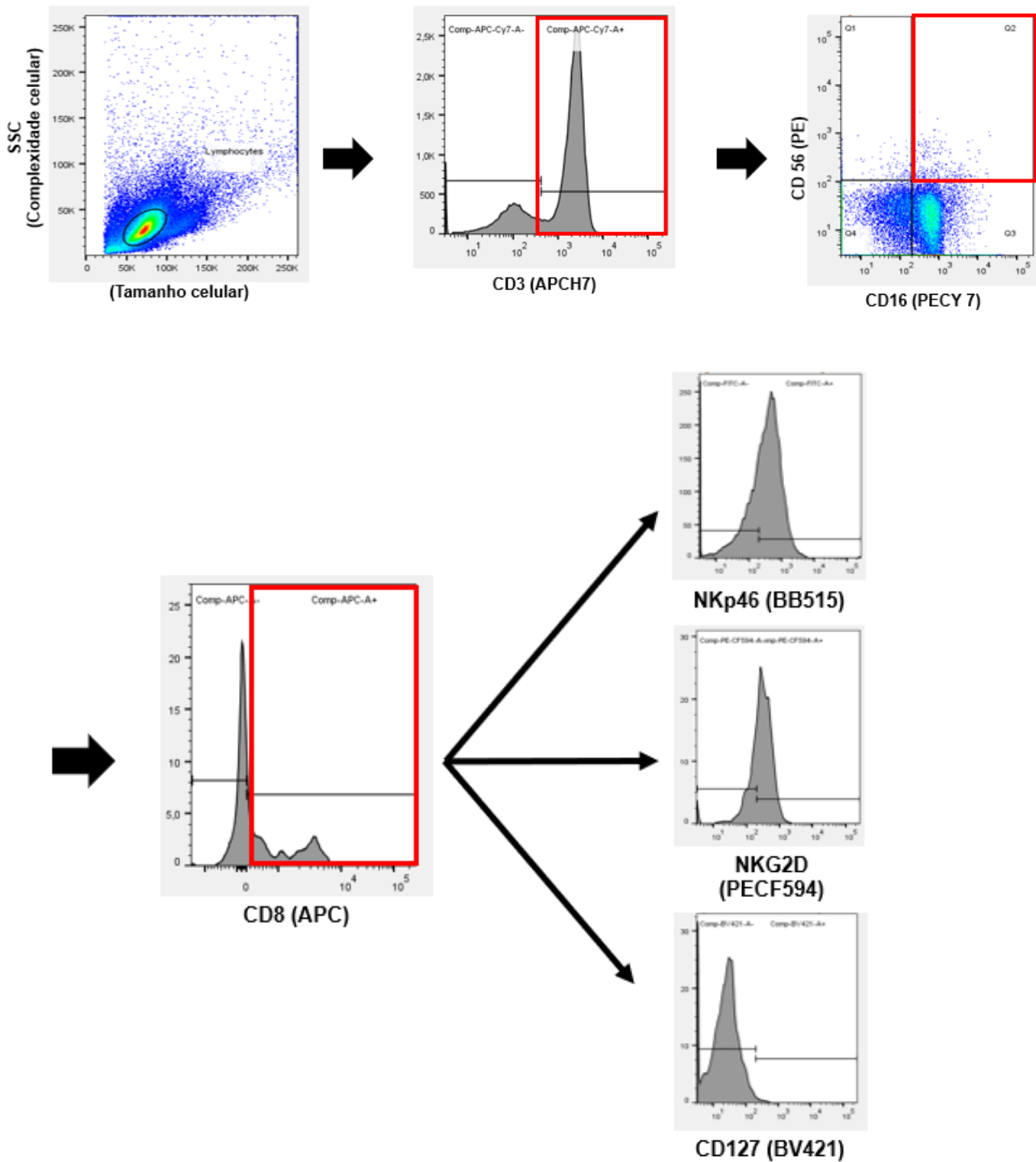
FONTE: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

Figura 13 - Estratégia de análise das células NK



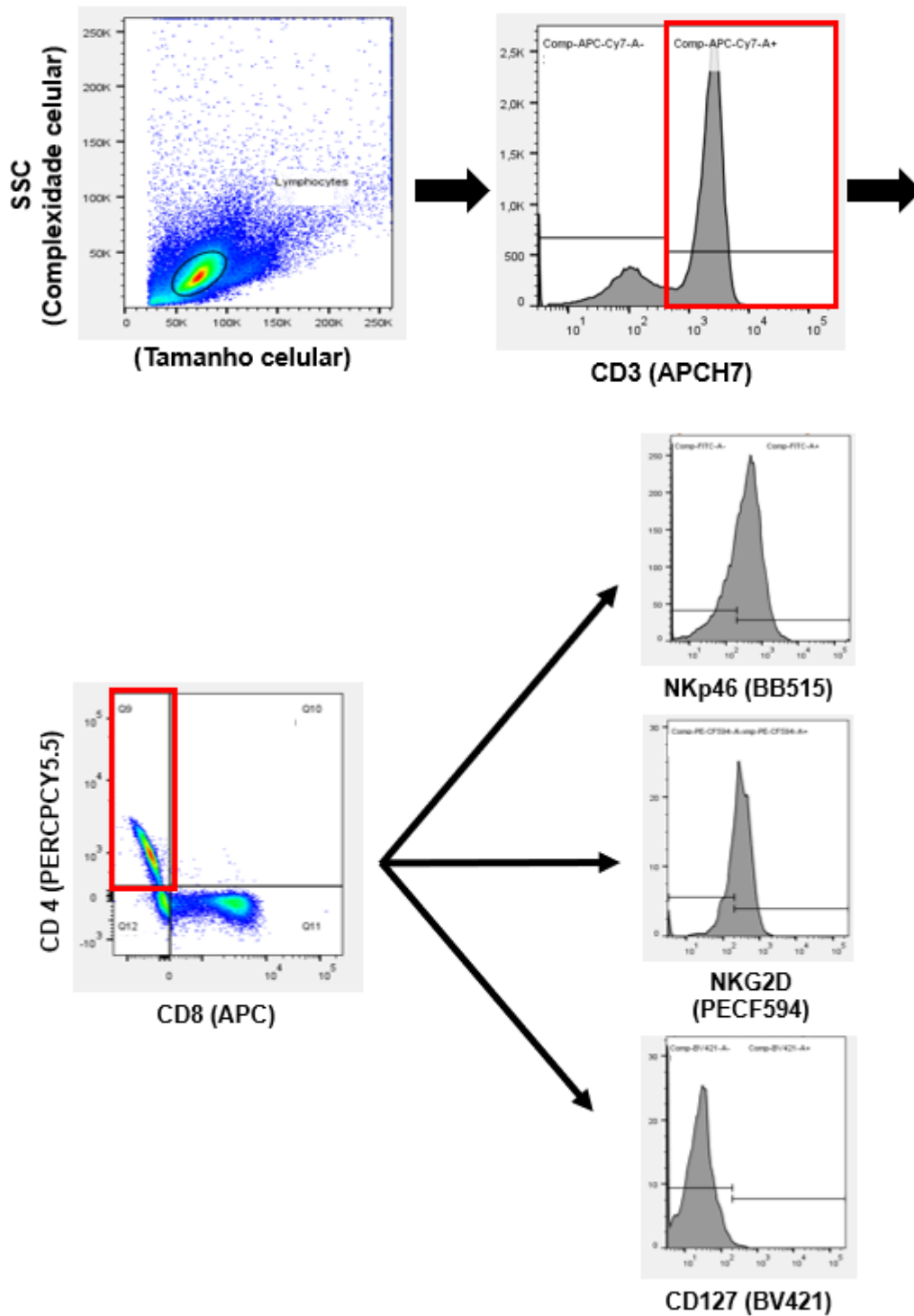
Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

Figura 14- Estratégia de análise das células NKT



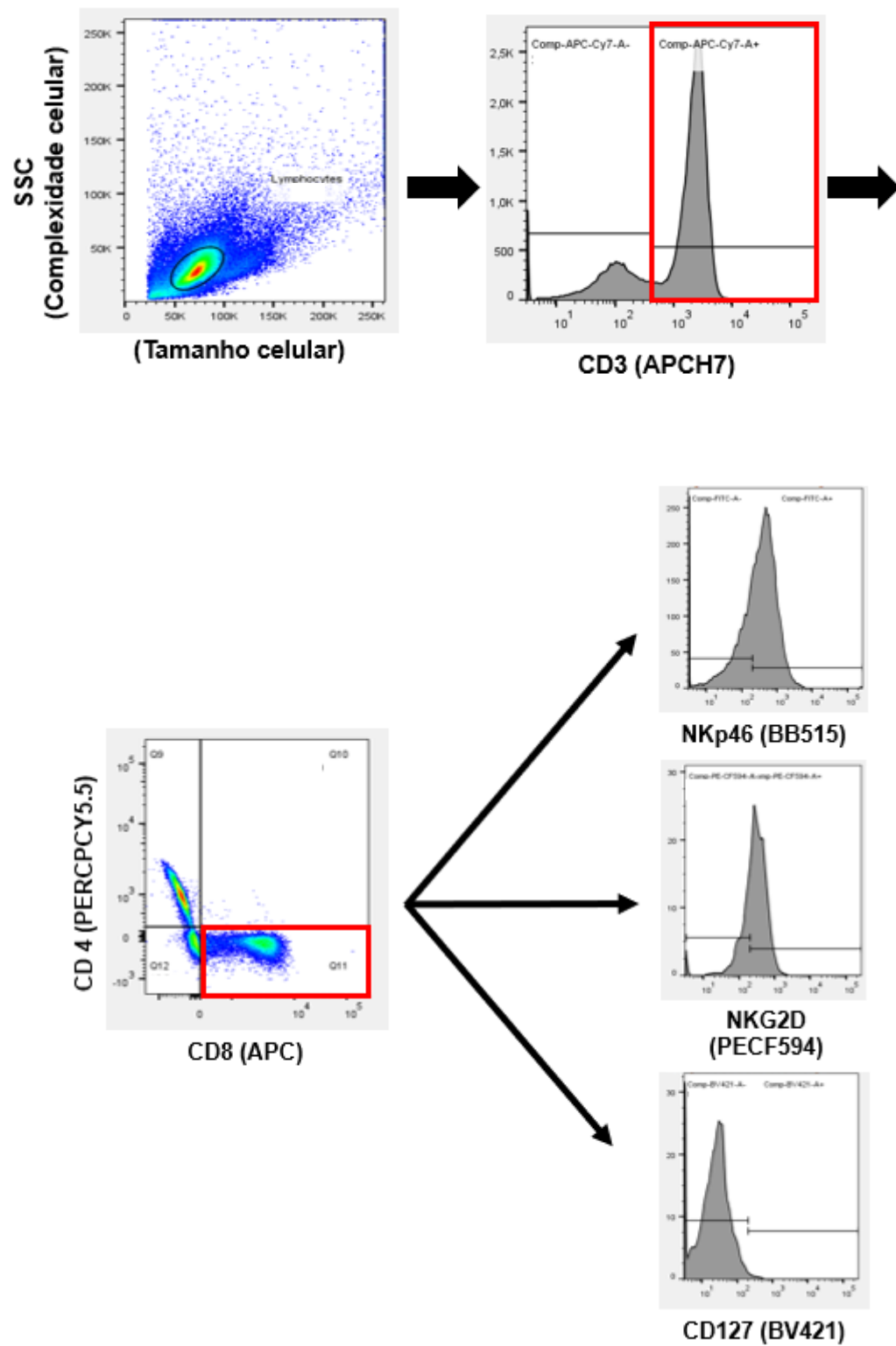
Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

Figura 15 - Estratégia de análise dos linfócitos T CD4+



Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

Figura 16 - Estratégia de análise dos linfócitos T CD8+



Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

4.9 QUANTIFICAÇÃO DAS CITOCINAS

As citocinas IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ , IL-17A foram mensuradas em sobrenadantes de cultura de pacientes e dos controles. Foi utilizado o kit CBA humano Th1/Th2/Th17 (BD™ Cytometric Bead Array CBA, Catálogo #560484, BD Bioscience, San Jose, CA) conforme orientações do fabricante.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada através do software GraphPad Prism 7. Foi realizado o teste de Shapiro-Wilk para verificação de normalidade. Quando observado normalidade, foi empregado o teste T student, quando não, foi aplicado o teste U de Mann-Whitney. Todas as conclusões foram tomadas ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$ = estatisticamente significativos).

4.11 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Todo procedimento foi realizado após o consentimento e assinatura dos pacientes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A e B). O grupo controle foi composto por voluntários saudáveis, residentes em áreas não endêmicas para a leishmaniose tegumentar, e que concordaram em participar da pesquisa e assinaram o TCLE (APÊNDICE C). O projeto passou por apreciação pelo Comitê de Ética do IAM/FIOCRUZ recebendo aprovação (CAEE: 11083812.7.0000.5190) (ANEXO A).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO ESTUDADA

O grupo de pacientes antes do tratamento (AT), foi composto por vinte e dois indivíduos que apresentavam lesão ativa e que ainda não haviam iniciado o esquema terapêutico. Do total de pacientes dezoito foram utilizados para estudos ex vivo e onze em estudos com cultura. Os mesmos foram incluídos obedecendo-se os critérios de inclusão e exclusão. Foram observadas características como idade, sexo, forma clínica, número de lesões, localização das lesões e tempo de evolução da doença (Tabela 1). A idade dos pacientes variou entre 12 e 76 anos, com média de $40,04 \pm 18,66$. Os pacientes apresentaram de 1 a 5 lesões distribuídas por todo corpo, sendo a maioria das lesões localizadas nos membros inferiores, seguido dos membros superiores. Todos os pacientes foram tratados com Glucantime[®], recebendo 15 ml por dia, durante 20 dias consecutivos.

No grupo pós-tratamento (PT), foram selecionados doze pacientes, que já haviam finalizado o esquema terapêutico, obtido cura clínica e que receberam alta médica. A idade destes pacientes variou entre 7 e 71, com média de idade $39,66 \pm 20,43$ (Tabela 1).

O grupo controle (CT), foi representado por dezessete indivíduos sadios, residentes de áreas não endêmicas, sem histórico da doença e de transfusão sanguínea com idade entre 22 e 32. A média de idade dos controles foi de $29,47 \pm 10,94$ (Tabela 1).

Tabela 1 - Principais características do grupo de estudo

Características	Grupo de Estudo		
	AT	PT	CT
Número	22	12	17
Idade	40,04 (12-76)	39,66 (7-71)	29,47 (23-59)
Razão H/M*	11/11	8/4	7/10
Duração média da doença/Período pós-tratamento	2,59 meses (0,26-5 meses)	6,5 meses (2-21 meses)	-
No. médio de lesões/cicatrices	1,65 (1-5)	10,2 (1-80)	-
Local das lesões/cicatrices	Face (22,73%) MMSS (27,28%) MMII (54,55%)	Face (8,33%) MMSS (41,66%) MMII (66,66%)	-
Município de residência	Aldeia (3) Amaraji (1) CIMNC (2) Igarassu (7) Moreno (6) São Lourenço da Mata (1)	Ipojuca (3) Jaboatão dos Guararapes (1) Moreno (8)	

Tabela 5 - Principais características do grupo de estudo (Continuação)

Ocupação	Administrador	Agricultor
	(1)	(2)
	Agricultor	Cobrador
	(7)	(1)
	Aposentado	Do lar
	(1)	(4)
	Cobrador	Estudante
	(1)	(2)
	Do lar	Motorista
	(5)	(1)
	Engenheiro	Operador de máquinas
	(1)	(1)
	Estudante	Porteiro
	(2)	(1)
	Jardineiro	
	(1)	
	Merendeira	
	(1)	
	Militar	
	(2)	

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle; MMII: Membros inferiores; MMSS: Membros superiores

De acordo com os parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, todos os pacientes participantes do estudo foram diagnosticados com LTA em parceria com o Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz-PE. Foram realizados biópsia, IFI, PCR e pesquisa direta, sendo os pacientes incluídos no estudo quando apresentado pelo menos um dos exames positivo (Tabela 2).

A IFI foi realizada em 18 pacientes, sendo positiva em 9 pacientes. Já a PCR foi realizada em todos os pacientes e observamos positividade em 15 pacientes

do total. A pesquisa direta também foi realizada em todos os pacientes, sendo positiva para 10 pacientes. Por questões operacionais, nem todos os pacientes foram submetidos a biópsia, esta técnica foi realizada em 3 pacientes e observamos positividade em todos.

Tabela 2 - Resultados dos testes laboratoriais realizados em pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana

Pacientes	Biop.	IFI	PCR	Pesquisa direta
Total	3/3	9/18	15/22	10/22

Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

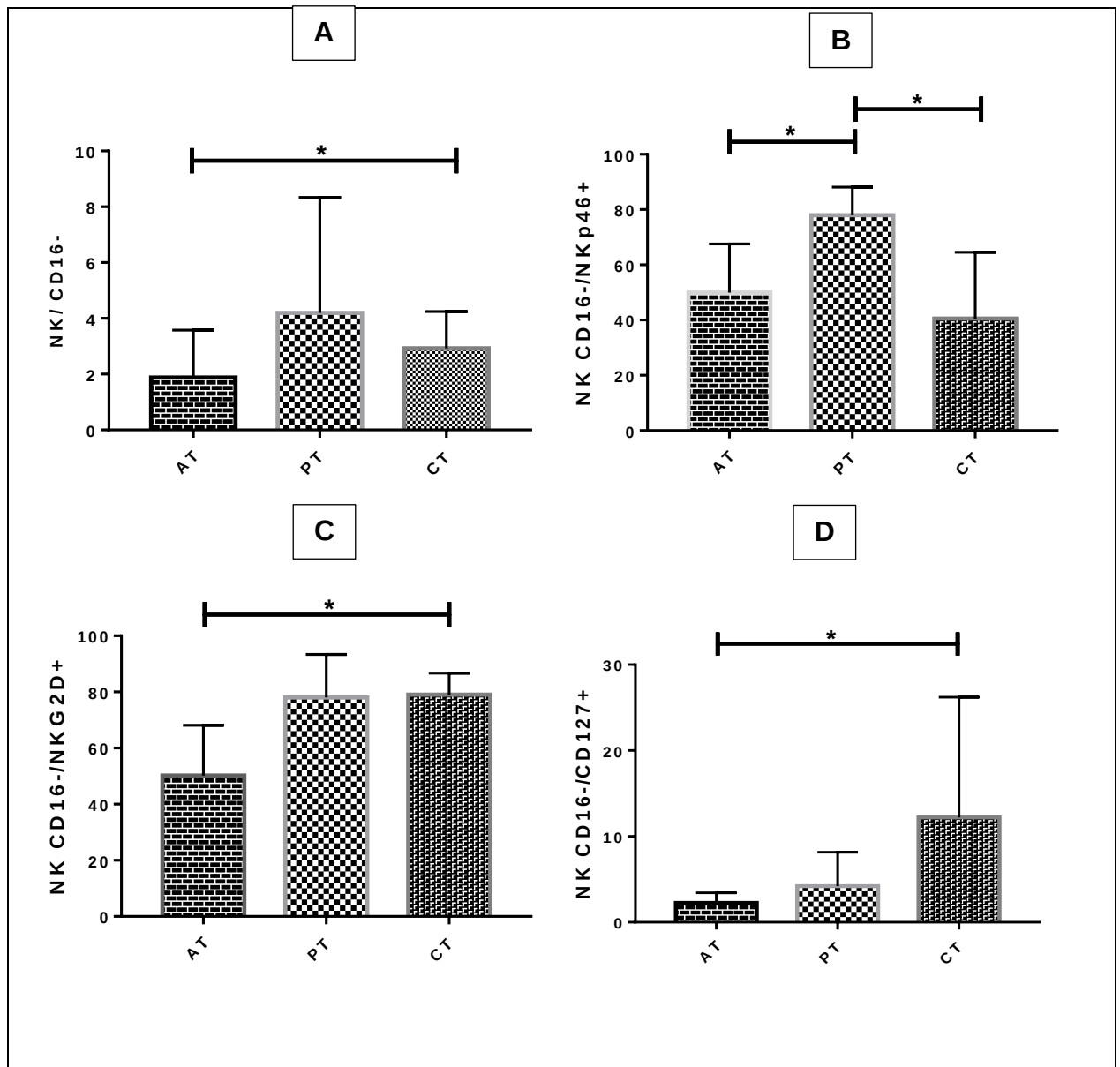
Legenda: Biop.; Biópsia; IFI: Imunofluorescência Indireta; PCR: Reação em cadeia da polimerase.

5.2 PERCENTUAL *ex vivo* E APÓS CULTURA DE CÉLULAS NK CD16⁻ E NK CD16⁺CD56⁺ DE PACIENTES ANTES E APÓS TRATAMENTO

Ao avaliarmos *ex vivo* o percentual de células NK que não expressam o marcador CD16, observamos um menor percentual destas células em pacientes com lesão ativa, quando comparado com o grupo controle ($p=0,0091$) (FIGURA 17A). Quando avaliado a expressão de NKp46 por estas células, observamos uma maior expressão por pacientes PT quando comparado aos grupos AT ($p=0,0016$) e CT ($p=0,0003$) (FIGURA 17 B).

Ao considerar a expressão dos marcadores NKG2D, observamos sua diminuição nos grupos AT, quando comparado com o grupo CT ($p=0,0003$) (FIGURA 17 C). Além disso, observamos uma menor expressão do marcador CD127 nos pacientes AT quando comparado com o grupo controle ($p=0,0115$) (FIGURA 17 D).

Figura 17 - A: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-; B: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-/NKp46+; C: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

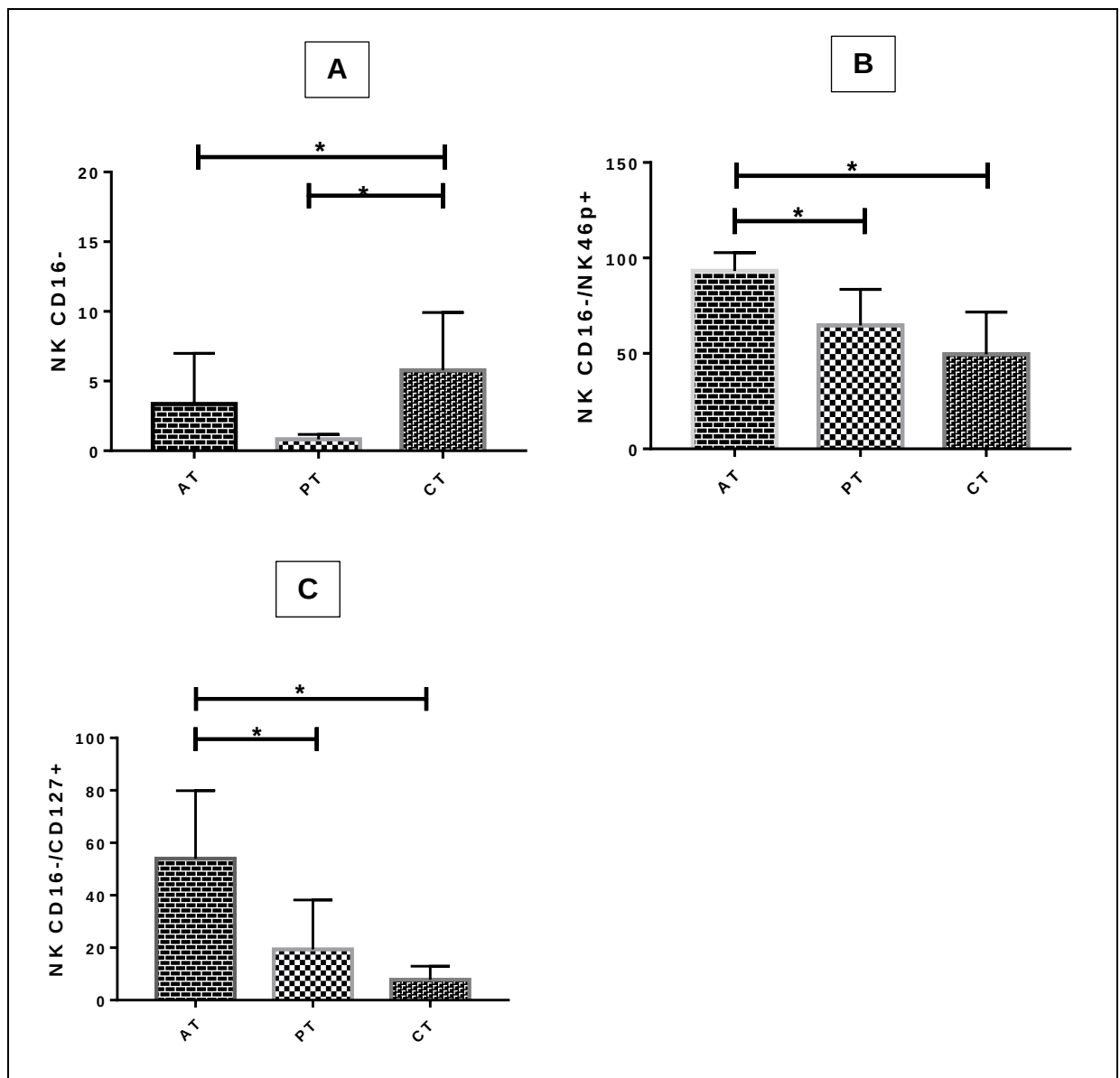
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Quando avaliado o percentual de células NK CD16- após cultura com antígeno total, observamos um menor percentual destas células em pacientes com lesão ativa (AT) ($p=0,0294$) e no grupo PT ($p=0,0002$) em relação ao grupo e CT (FIGURA 18 A). Além disso, observamos uma maior expressão do marcador NKp46 por estas células

em pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0032$) e CT ($p<0,0001$) (FIGURA 18 B). O marcador CD127 também se mostrou elevado em pacientes AT, em relação aos pacientes que já haviam finalizado o esquema terapêutico (PT) ($p=0,0311$) e ao grupo CT ($p<0,0001$) (FIGURA 18 C).

Figura 18 - A: Percentual de células NK CD16-; B: Percentual de células NK CD16-/NKp46+ e C: Percentual de células NK CD16-/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*.



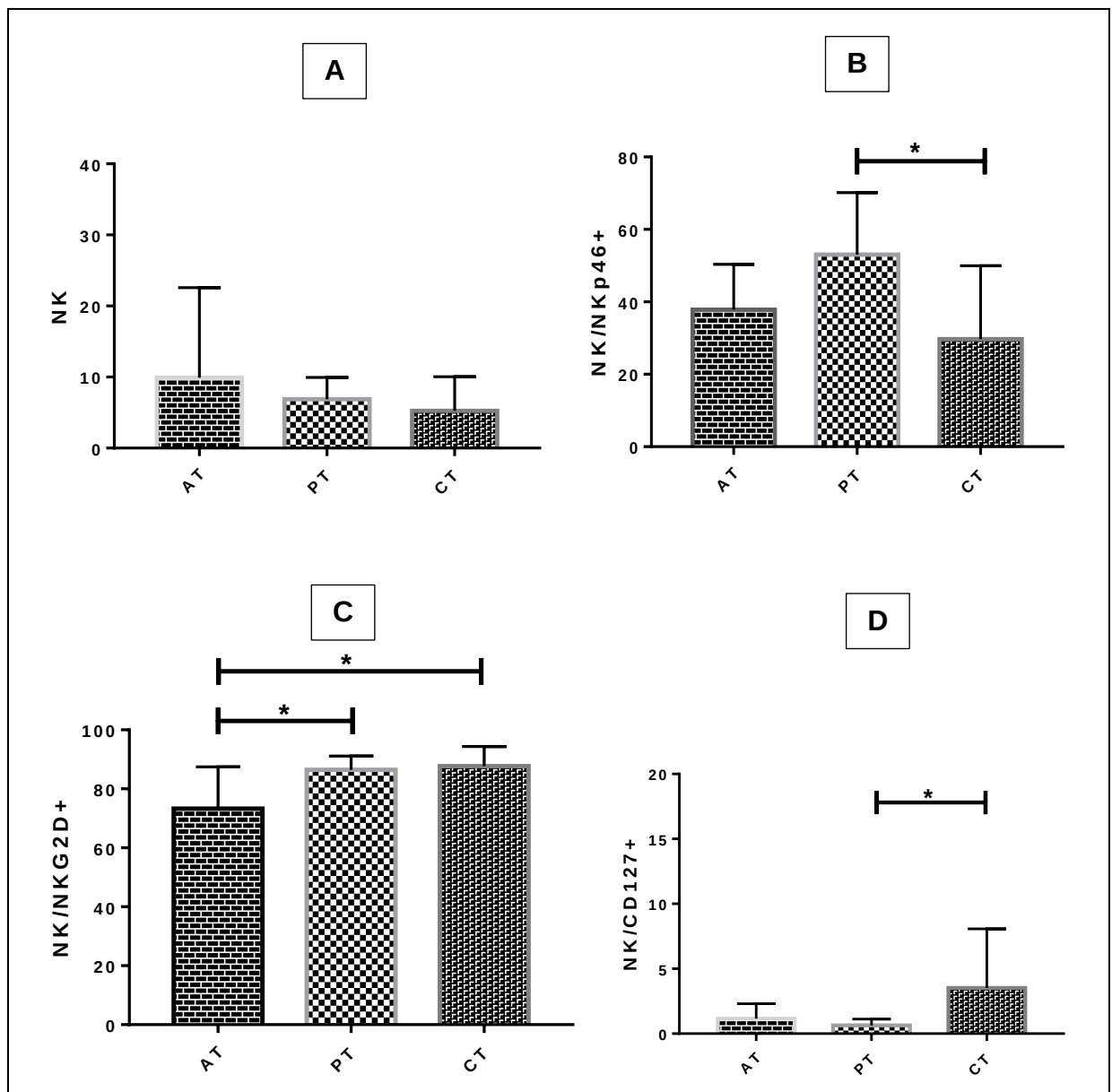
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Já as células NK (CD16+CD56+) não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados (FIGURA 19 A). O marcador NKp46 apresentou uma maior expressão do marcador NKp46 em pacientes pós-tratamento (PT) em relação ao grupo CT ($p=0,0116$) (FIGURA 19 B). Com relação a expressão do marcador NKG2G, observamos uma menor expressão nas células NK de pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0420$) e CT ($p=0,0101$) (FIGURA 19 C). Além disso, também observamos uma menor expressão do marcador CD127 no grupo PT, quando comparado ao grupo CT ($p=0,0222$) (FIGURA 19 D).

Figura 19 - A: Percentual *ex vivo* de células NK; B: Percentual *ex vivo* de células NK/NKp46+; C: Percentual *ex vivo* de células NK/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de células NK/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



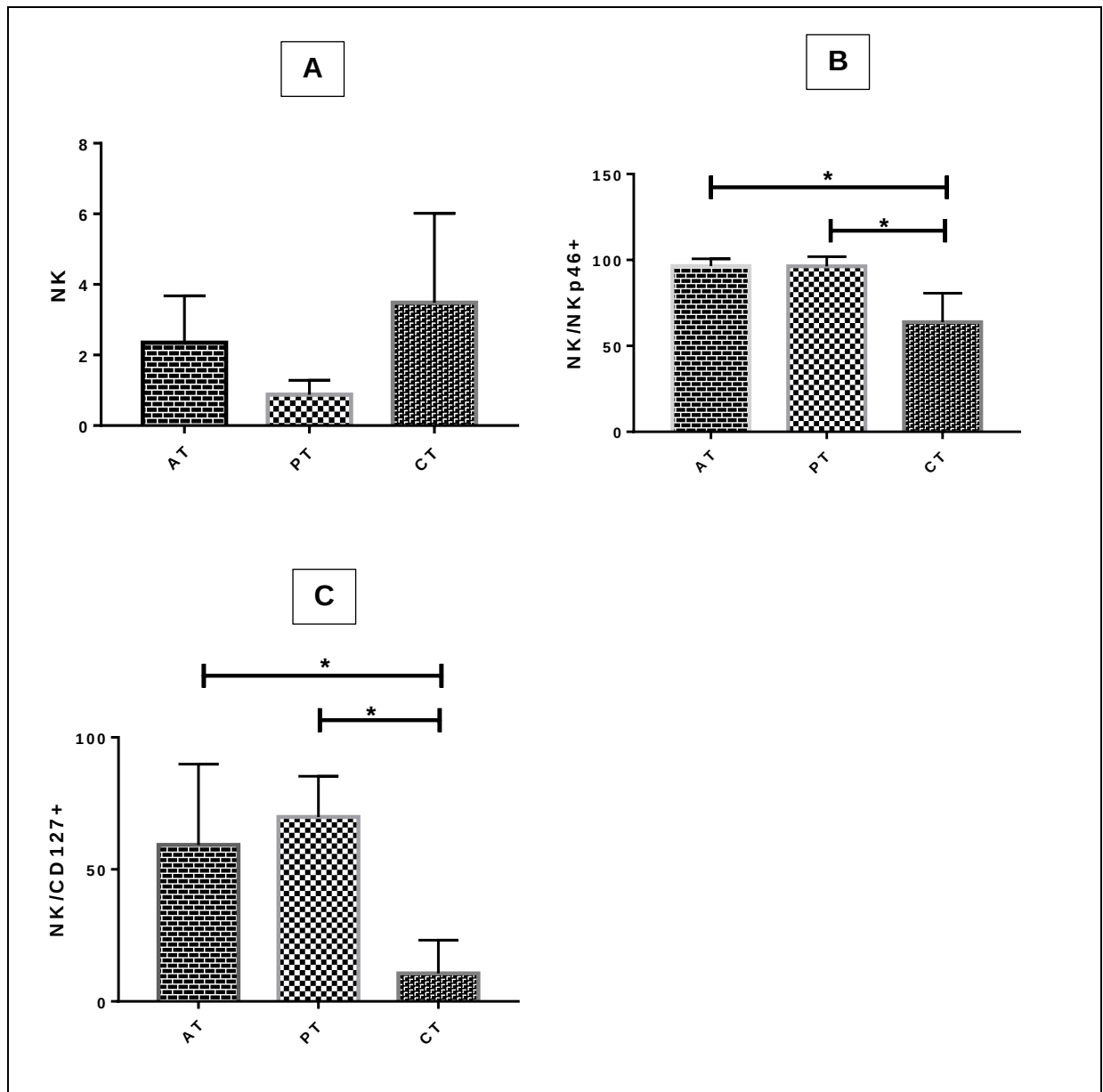
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Após a cultura celular, não foi observado significância estatística quanto ao percentual de células NK nos grupos estudados (FIGURA 20 A). Observamos uma maior expressão do marcador NKp46 nos grupos AT ($p < 0,0001$) e PT ($p = 0,0002$), quando comparado com o grupo saudável (CT) (FIGURA 20 B). Também observamos uma maior expressão do marcador CD127 por parte dos grupos AT ($p < 0,0001$) e PT ($p = 0,0008$) em relação ao grupo CT (FIGURA 20 C).

Figura 20 - A: Percentual de células NK; B: Percentual de células NK/NKp46+; C: Percentual de células NK/NKG2D+ e D: Percentual de células NK/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

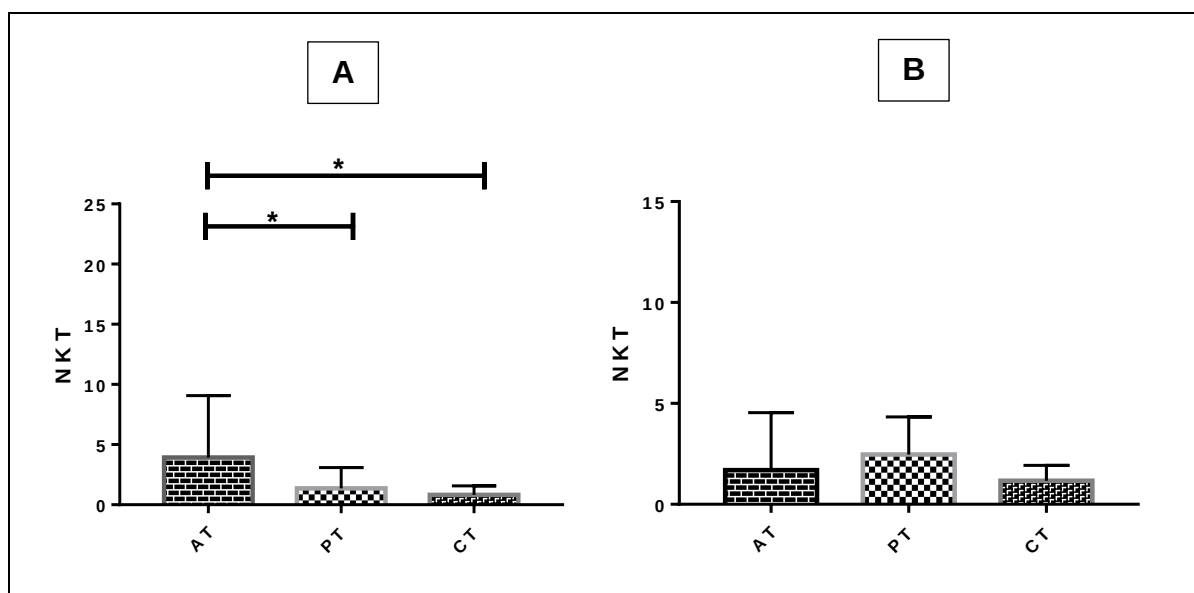
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

5.3 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS NKT *ex vivo* E APÓS CULTURA DE CÉLULAS DE PACIENTES ANTES E APÓS TRATAMENTO

Observamos um aumento estatisticamente significativo de células NKT (CD3+CD16+CD56+) no grupo AT, quando comparado com aos grupos PT ($p=0,0153$) e CT ($p=0,0013$) *ex vivo* (FIGURA 21 A). No entanto, não se observou significância estatística nesta população celular após cultura com antígeno total de *L. braziliensis* (FIGURA 21 B).

Figura 21 - A: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT e B: Percentual de linfócitos NKT após cultura com antígeno total de *L. braziliensis* em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

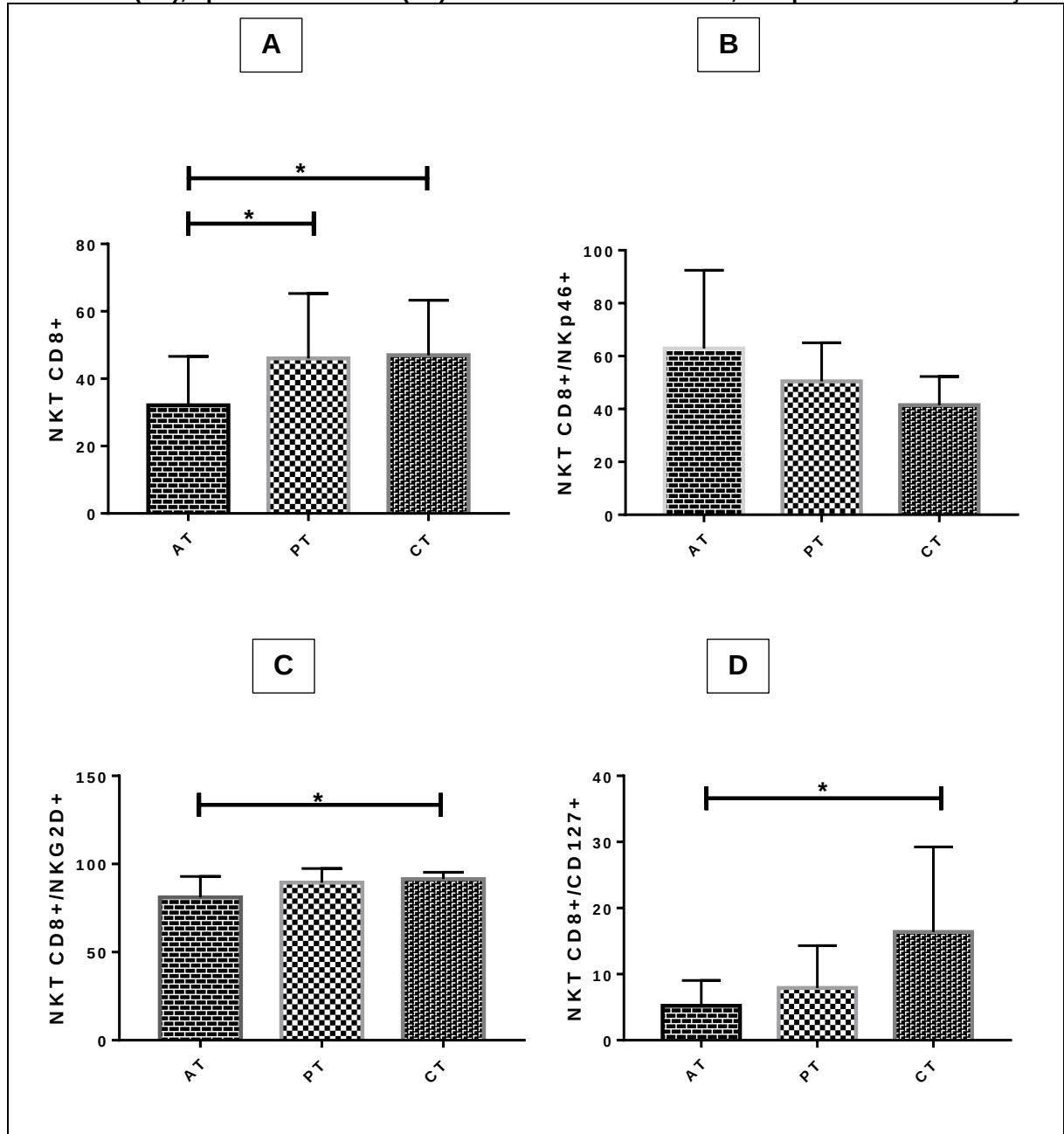
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Quando avaliado a expressão do marcador CD8 por parte das células NKT, observamos um menor percentual dessa população no grupo AT em relação ao grupo PT ($p=0,0457$), bem como quando comparado com o grupo controle ($p=0,0197$) (FIGURA 22 A). Não se observou significância estatística com relação a expressão de Nkp46 por estas células (FIGURA 22 B). Quando avaliado a expressão do marcador NKG2D nas células NKT CD8+, observamos uma menor expressão no grupo AT, quando comparado com o grupo CT ($p=0,0101$) (FIGURA 22 C). Da mesma forma,

observamos uma menor expressão do marcador CD127 no grupo AT, em relação ao grupo controle ($p=0,0094$) (FIGURA 22 D).

Figura 22 - A: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD8+; B: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD8+/NKp46+; C: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD8+/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

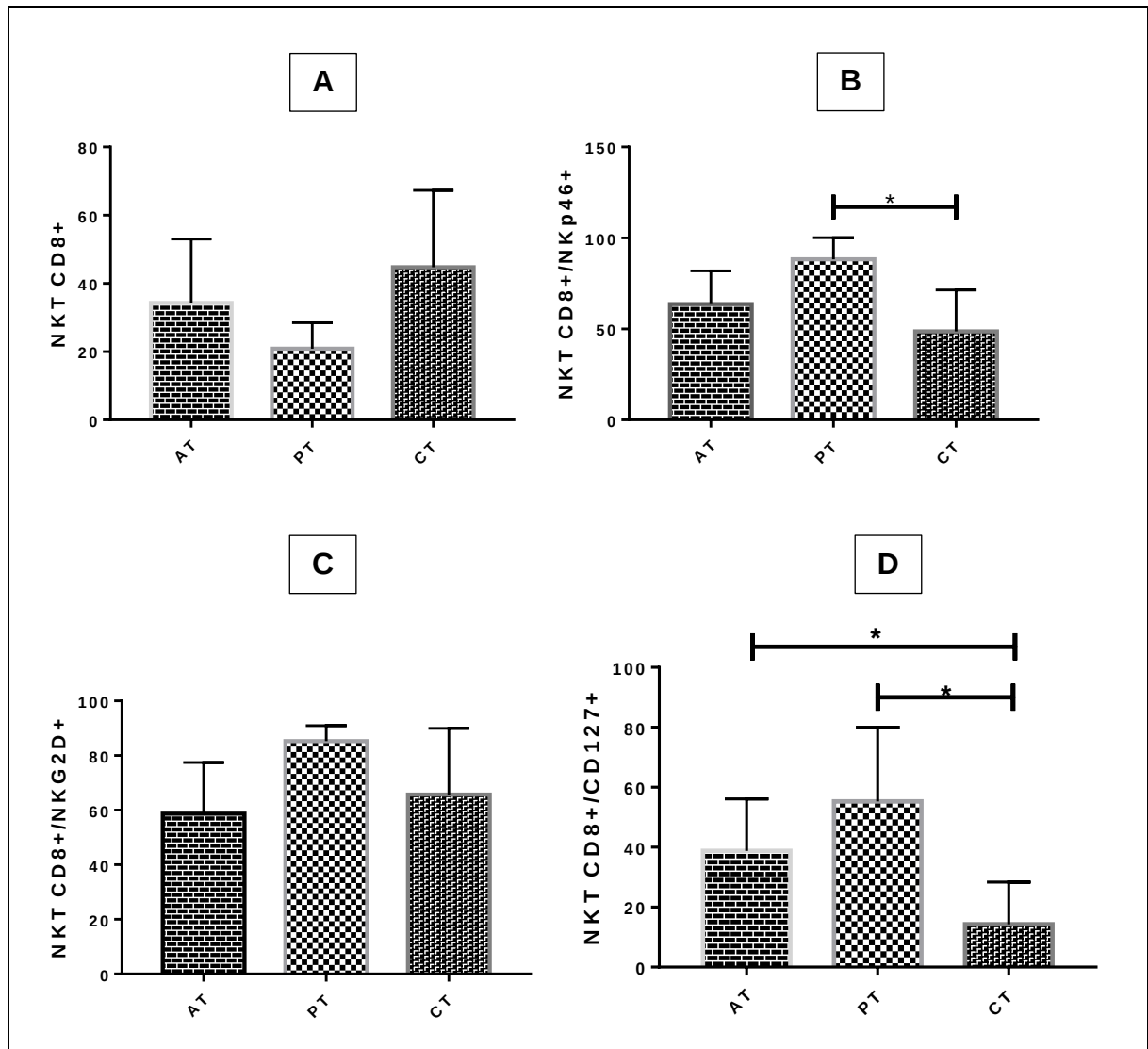
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Realizada a cultura com antígeno total, observamos uma maior expressão do marcador NKp46 pelos pacientes PT, quando comparado ao grupo CT ($p=0,0059$)

(FIGURA 23 A). Além disso, observamos uma diminuição do marcador CD127 em pacientes AT ($p=0,0016$) e um aumento nos pacientes PT ($p=0,0034$), em relação ao grupo CT (FIGURA 23 D). Não observamos significância estatística com relação ao percentual de linfócitos NKT CD8+ e NKG2D (FIGURA 23 A e 23 C, respectivamente).

Figura 23 - A: Percentual de linfócitos NKT CD8+; B: Percentual de linfócitos NKT CD8+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos NKT CD8+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos NKT CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

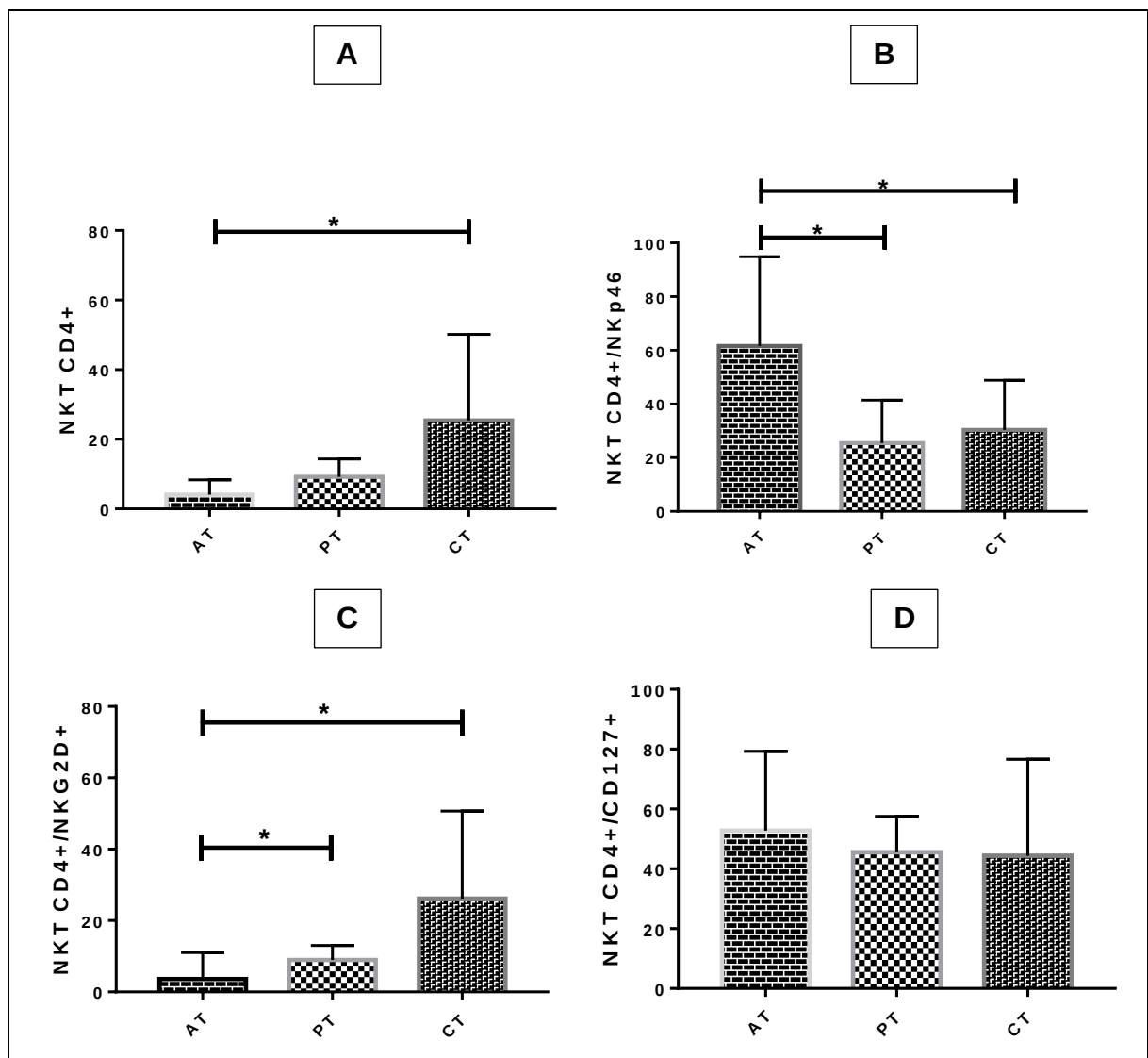
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Com relação as células NKT que expressão o marcador CD4, observamos um menor percentual destas células em pacientes com lesão ativa (AT), quando

comparado ao grupo CT ($p=0,0035$) (FIGURA 24 A). Observamos uma maior expressão do marcador Nkp46 em pacientes AT, em relação aos grupos PT ($p=0,0212$) e CT ($p=0,0082$) (FIGURA 24 B). Entretanto, quando avaliado o marcador NKG2D, observamos um baixo percentual deste em pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0020$) e CT ($p=0,0001$) (FIGURA 24 C). Não observamos significância estatística com relação a expressão do marcador CD127 pelos linfócitos NKT CD4+ (FIGURA 24 D).

Figura 24 - A: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD4+; B: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD4+/Nkp46+; C: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD4+/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



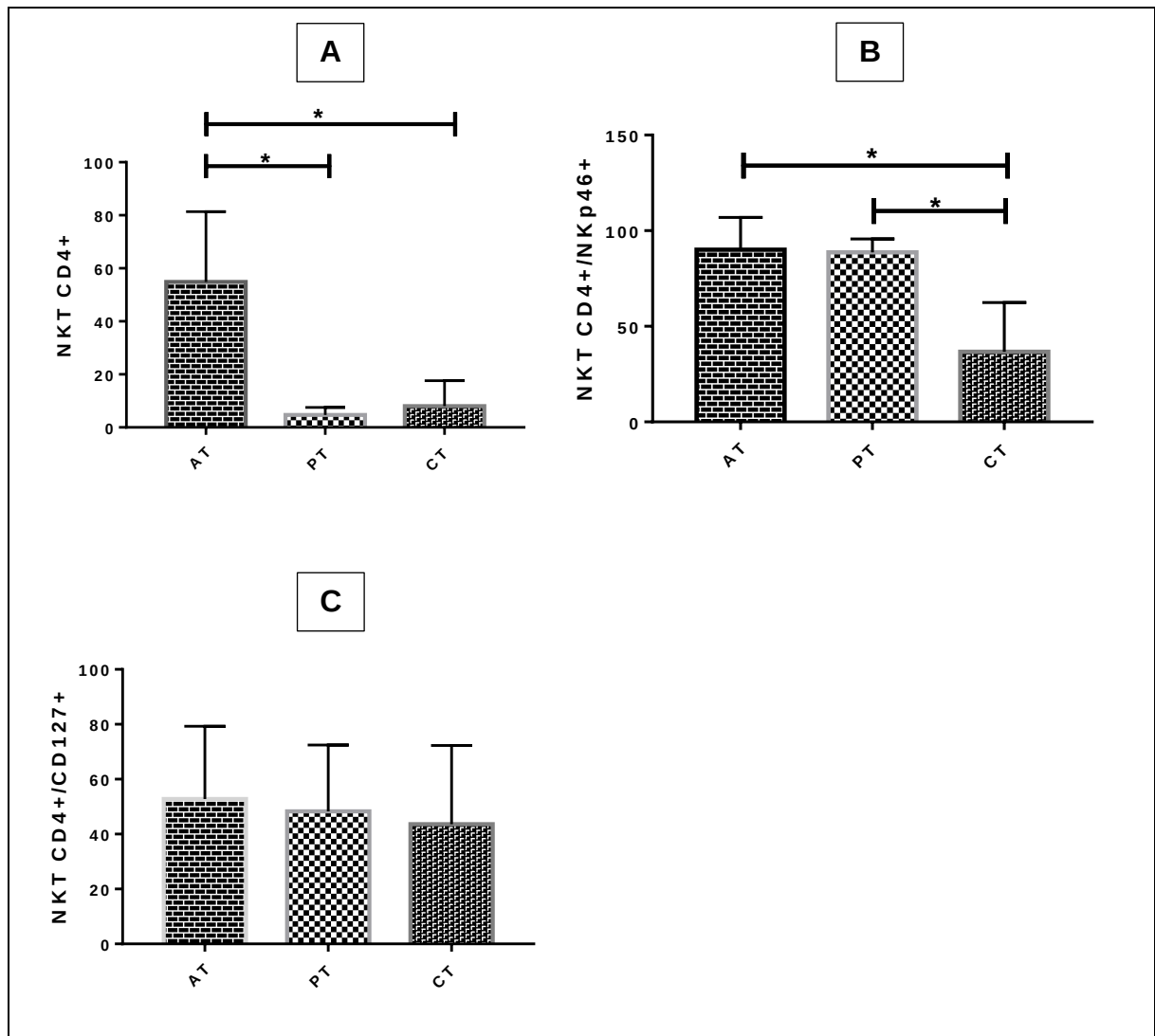
Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Após a cultura celular, observamos um maior percentual de linfócitos NKT CD4+ por parte dos pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0087$) e CT ($p=0,0003$) (FIGURA 25 A). Quando avaliado a expressão do marcador NKp46 por estas células, observamos um aumento na expressão por parte dos grupos AT ($p<0,0001$) e PT ($p=0,0005$), em relação com grupo CT (FIGURA 25 B). Não observamos significância estatística com relação a expressão do marcador CD127 por estas células (FIGURA 25 C).

Figura 25 - A: Percentual de linfócitos NKT CD4+; B: Percentual de linfócitos NKT CD4+/NKp46+ e C: Percentual de linfócitos NKT CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

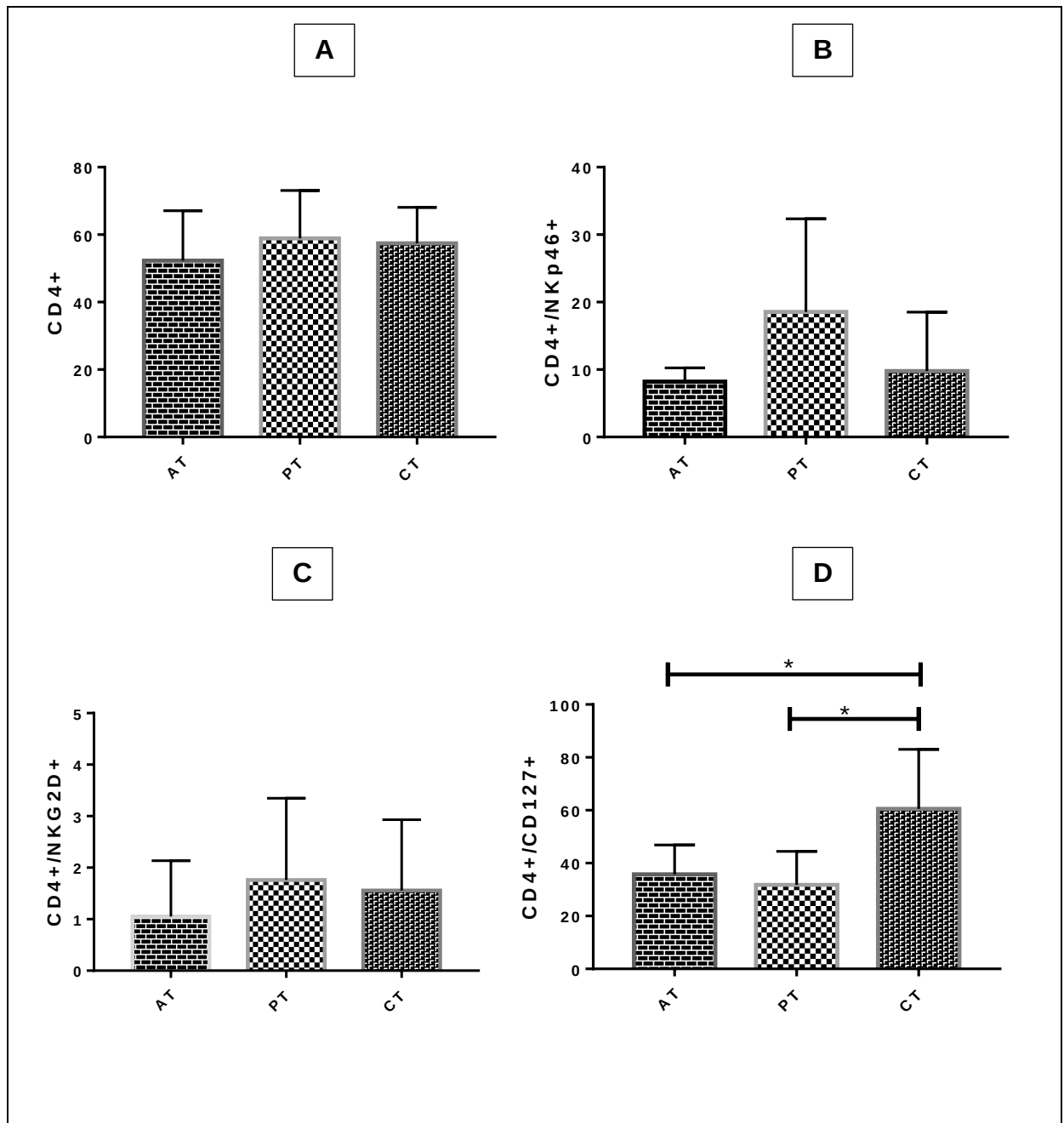
Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

5.4 PERCENTUAL DE LINFÓCITOS T CD4+ E CD8+ *ex vivo* E APÓS CULTURA DE CÉLULAS DE PACIENTES ANTES E APÓS TRATAMENTO

Ao avaliarmos o percentual de linfócitos T CD4+, não observamos nenhuma significância estatística (FIGURA 26 A). Embora, seja visível um leve aumento destas células no grupo PT. Ao avaliarmos as células CD4+ que expressavam o marcador CD127, observamos que os pacientes dos grupos AT ($p=0,0005$) e PT ($p=0,0031$) apresentaram um menor percentual quando comparado com o grupo CT (FIGURA 26 D).

Não foram observadas significâncias estatísticas com relação a expressão dos marcadores NKp46 e NKG2D por parte dos linfócitos T CD4 (FIGURAS 26 B e 26 C, respectivamente).

Figura 26 - A: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD4+; B: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD4+/NKp46+; C: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD4+/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

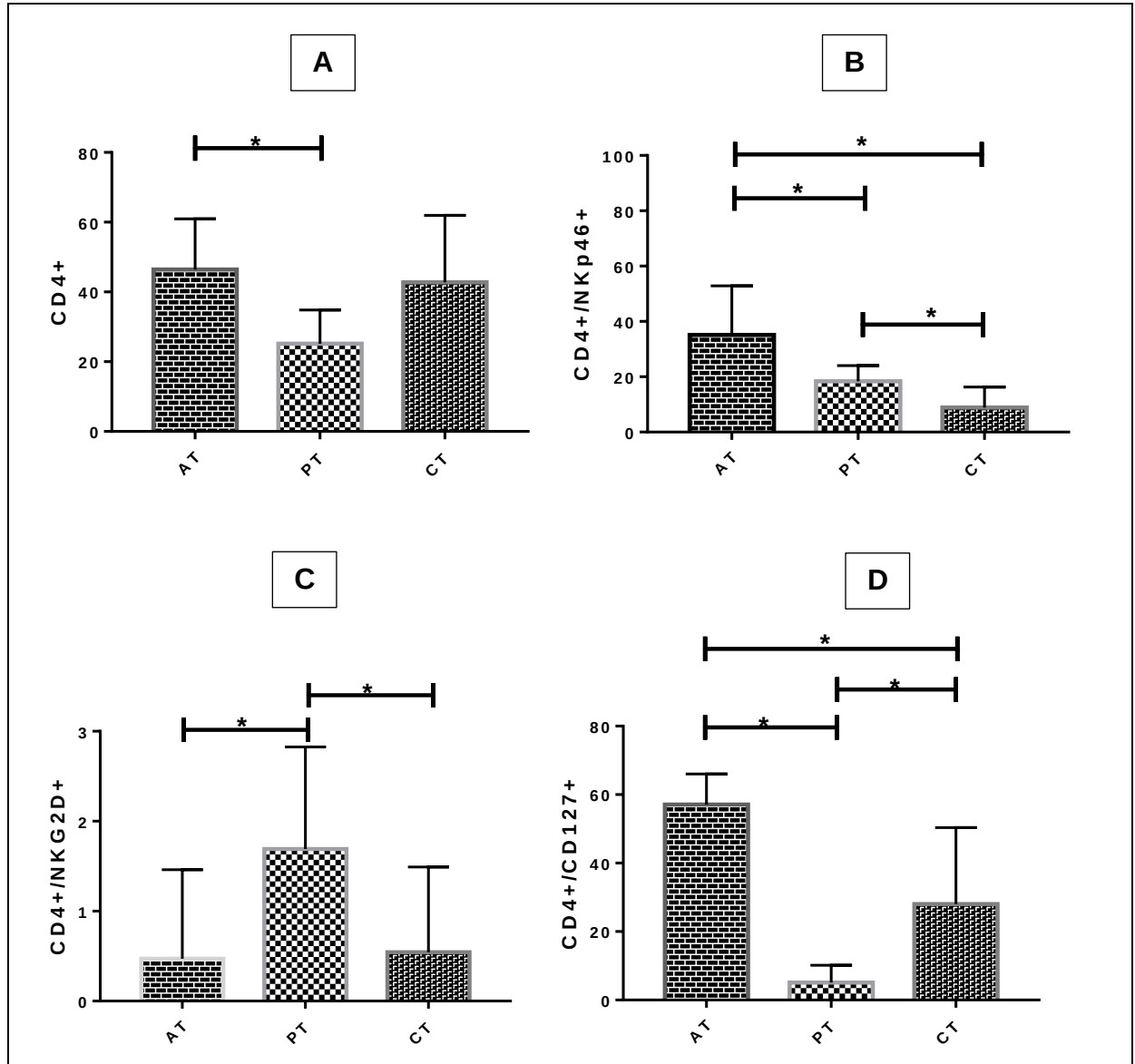
Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Entretanto, após cultura celular, observamos um alto percentual de linfócitos CD4+ em pacientes com lesão ativa (AT), quando comparado com o grupo PT ($p=0,0103$) (FIGURA 27 A). Com relação a expressão do marcador NKp46,

observamos um maior percentual no grupo AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0275$) e CT ($p<0,0001$), bem como uma maior expressão nos pacientes PT, em relação ao grupo CT ($p=0,0350$) (FIGURA 27 B).

Quando avaliado a expressão do marcador NKG2D por estas células, observamos um maior percentual em pacientes com cura clínica (PT) em relação aos grupos AT ($p=0,0254$) e CT ($p=0,0193$) (FIGURA 27 C). Já o marcador CD127, foi mais expresso nos pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p<0,0001$) e CT ($p=0,0009$), além disso, observamos uma menor expressão deste marcador nos pacientes PT, quando comparado ao grupo CT ($p=0,0396$) (FIGURA 27 D).

Figura 27 - A: Percentual de linfócitos T CD4+; B: Percentual de linfócitos T CD4+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos T CD4+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos T CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

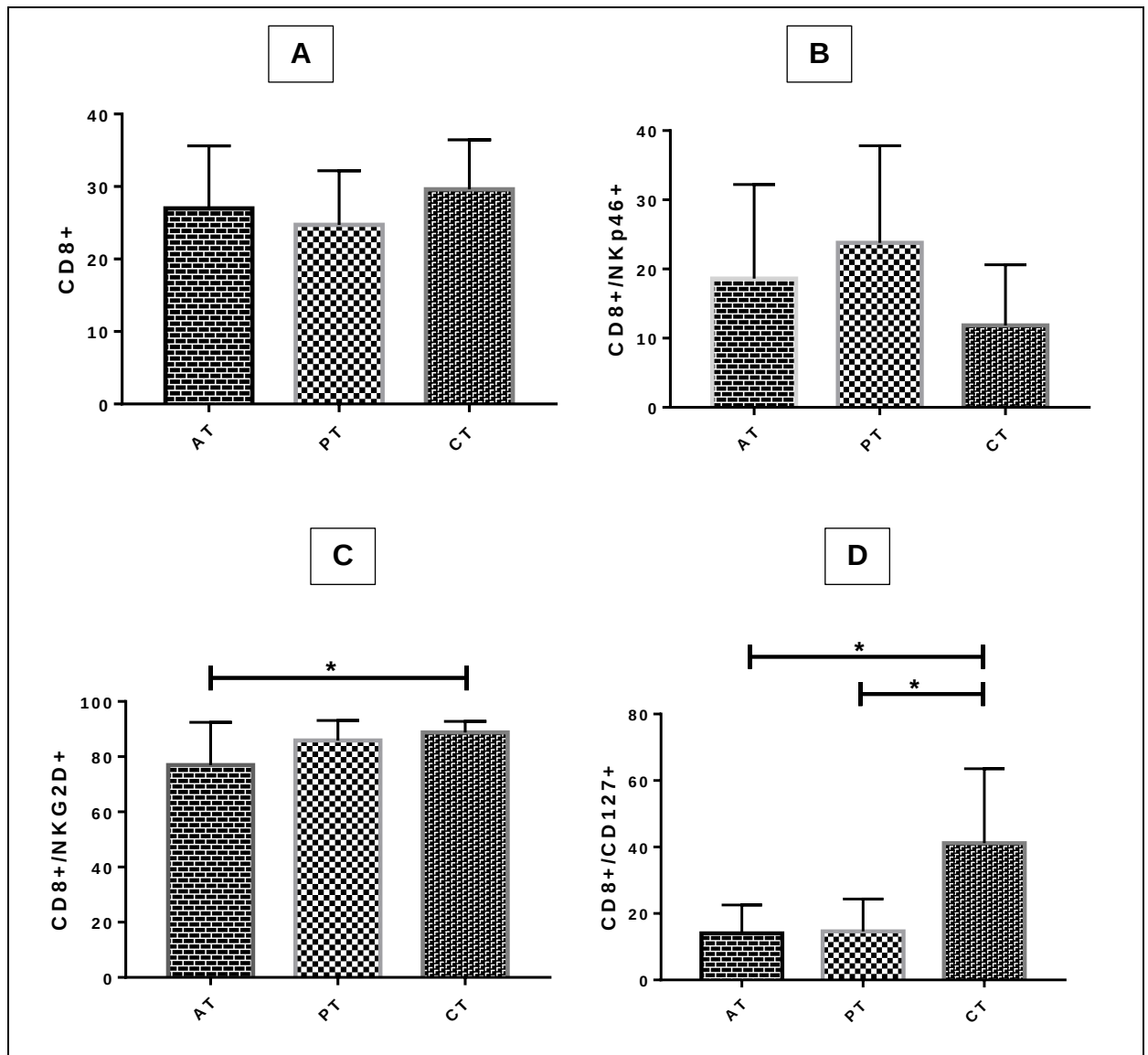
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Quando avaliado o marcador NKG2D pelos linfócitos CD8+, observamos uma menor expressão no grupo AT quando comparado com o grupo CT ($p=0,0220$) (FIGURA 28 B). Observamos uma menor expressão do marcador CD127 nos grupos AT ($p=0,0001$) e PT ($p=0,0068$), quando comparado ao grupo CT (FIGURA 28 D).

Não observamos significância estatística com relação ao percentual dos linfócitos CD8+, embora seja visível um aumento destas células em pacientes com infecção ativa (FIGURA 28 A). Também não foi vista significância estatística com relação a expressão do marcador NKP46 (FIGURA 28 B).

Figura 28 - A: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD8+; B: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD8+/NKp46+; C: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD8+/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de linfócitos T CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

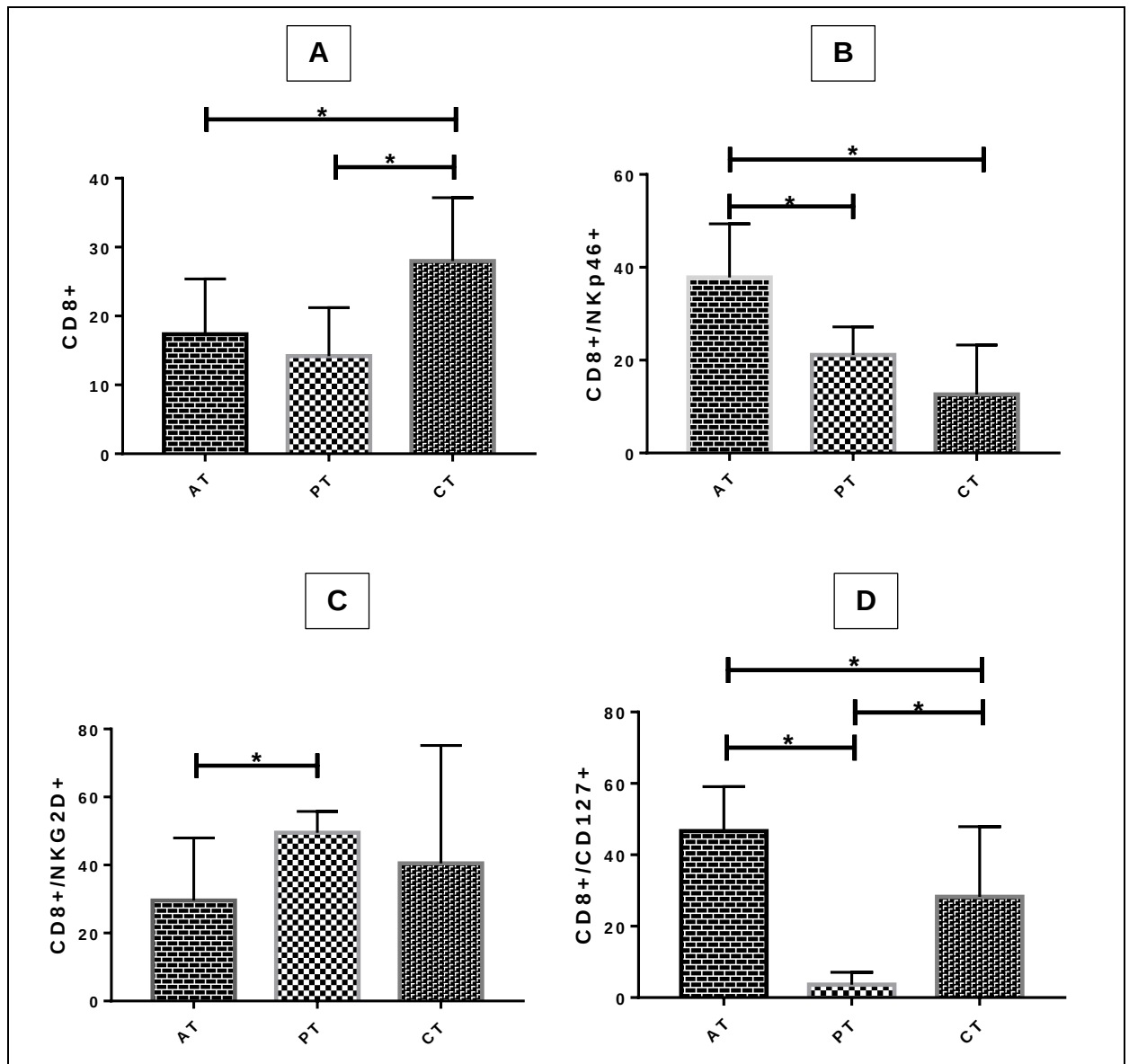
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quando os valores de "p" foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo "*".

Entretanto, quando avaliado o percentual de linfócitos CD8+ após cultura celular, observamos um menor percentual desta célula nos pacientes AT ($p=0,0069$) e PT ($p=0,0152$), quando comparado ao grupo CT (FIGURA 29 A). Além disso, também observamos um aumento na expressão do marcador NKp46 por parte dos pacientes AT, com relação aos grupos PT ($p=0,0050$) e CT ($p<0,0001$) (FIGURA 29 B).

Observamos uma menor expressão do marcador NKG2D em pacientes com lesão ativa, quando comparado ao grupo PT ($p=0,0340$) (FIGURA 29 C). Quando avaliado a expressão de CD127 por estas células, notamos um aumento nos pacientes AT, em relação aos grupos PT ($p=0,0246$) e CT ($p=0,0186$), bem como uma diminuição nos pacientes PT quando comparado ao grupo CT ($p<0,0001$) (FIGURA 29 D).

Figura 29 - A: Percentual de linfócitos T CD8+; B: Percentual de linfócitos T CD8+/NKP46+; C: Percentual de linfócitos T CD8+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos T CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

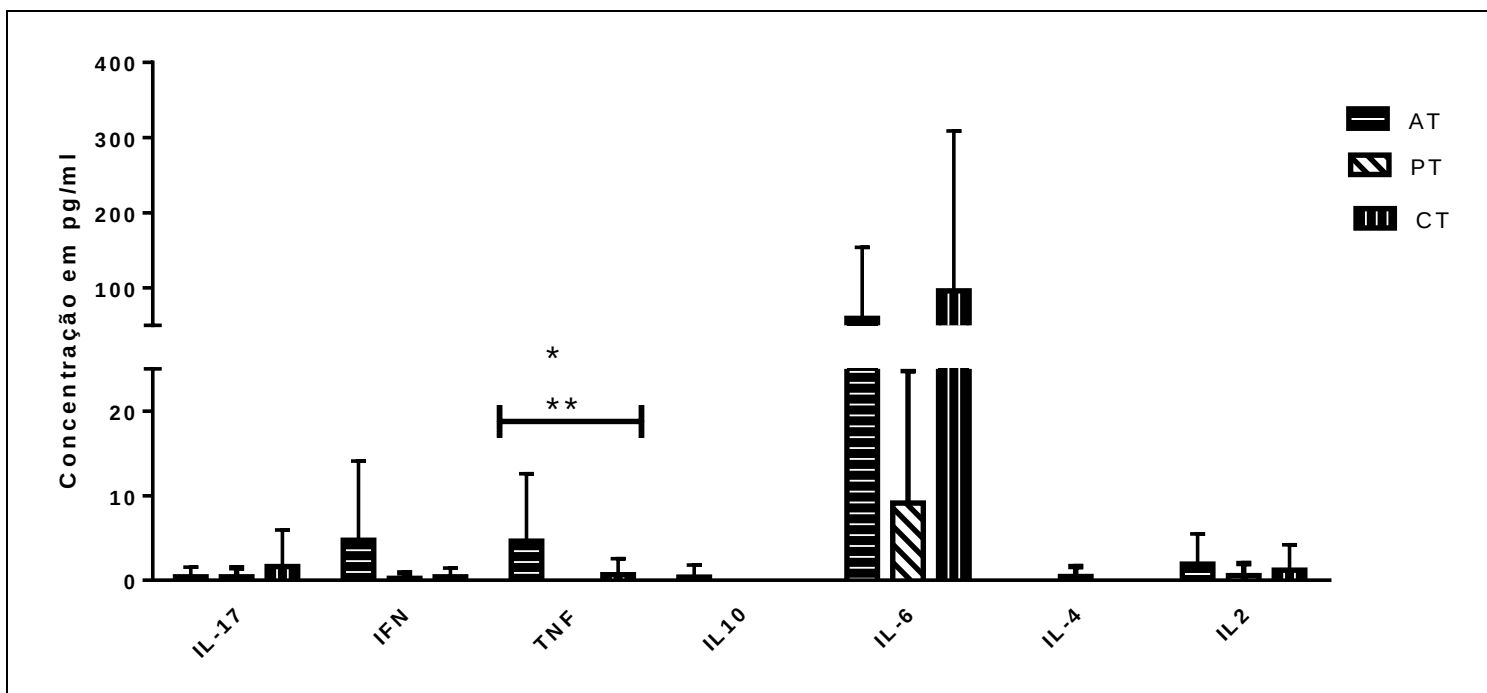
Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: Os resultados estão expressos como médias $\pm$ SEM. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*”.

5.5 AVALIAÇÃO DA PRODUÇÃO DE CITOCINAS DOS PERFIS TH1, TH2 E TH17 APÓS CULTURA COM ANTÍGENO TOTAL DE *Leishmania braziliensis*

A dosagem das citocinas IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF, IFN- γ e IL-17A nos sobrenadantes da cultura, foi realizada com o uso do kit CBA humano Th1/Th2/Th17. Observamos uma maior concentração de TNF no sobrenadante de pacientes AT e PT quando comparado com o grupo CT. Não observamos significância estatística nas demais citocinas (FIGURA 30).

Figura 30 - Concentração de citocinas do perfil Th1, Th2 e Th17 em sobrenadantes após cultura de PBMC com antígeno total de *L. braziliensis* de pacientes AT, PT e indivíduos CT.



Fonte: elaborado pelo autor, 2020.

Legenda: AT: Antes tratamento; PT: Pós-tratamento; CT: Controle.

Nota: *= significância estatística entre os grupos AT e PT; **= significância estatística entre os grupos AT e CT. Diferenças entre os grupos foram consideradas significativas quanto os valores de “p” foram menores que 0,05 e estão representadas pelo símbolo “*”.

6 DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, ligada principalmente a baixa condições socioeconômica (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; SAVOIA, 2015). O registro do número de indivíduos infectados pelo parasito vem aumentando com o passar dos anos, o que pode ser atribuído não apenas aos avanços no diagnóstico e notificação, mas também ao desmatamento, urbanização, migração e guerras, que provocam modificações ecológicas e consequentemente, mudanças no habitat do vetor (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Todos os pacientes incluídos no estudo foram provenientes de áreas endêmicas para a doença. Os vinte e dois pacientes AT foram diagnosticados como portadores de LTA ativa, pois se encaixaram na tríade de diagnóstico clínico-epidemiológico-laboratorial. Os pacientes em sua totalidade apresentaram lesões ulceradas, com bordas elevadas e geralmente em áreas descobertas do corpo, como os membros inferiores e superiores.

Observamos uma predominância de indivíduos do sexo masculino, adultos jovens e com atividades profissionais que estão relacionadas com matas, como por exemplo agricultura e carreira militar. Isso explica também o grande percentual de lesões em áreas descobertas do corpo, como membros superiores e inferiores. No Brasil, a LTA acomete ambos os sexos e em todas as faixas etárias, predominando em pacientes acima dos 10 anos de idade e no sexo masculino (BRASIL, 2017a).

Ainda não existe uma técnica padrão-ouro para a LTA, atualmente as técnicas utilizadas no diagnóstico são: IFI, PCR, e Pesquisa Direta, somando ainda com os diagnósticos clínico e epidemiológico (GONTIJO; DE CARVALHO, 2003). Todos os pacientes participantes deste estudo foram atendidos por um médico dermatologista, o qual fez avaliação clínica e epidemiológica e, além disso, foram realizados exames de diagnóstico em colaboração com o Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães / FIOCRUZ-PE. Por motivos operacionais, alguns pacientes não puderam ser diagnosticados por todos os métodos citados.

A Imunofluorescência Indireta (IFI) foi realizada em 18 pacientes, sendo positiva para 9 paciente. Esta técnica consiste na busca de anticorpos anti-*Leishmania*. Normalmente, é utilizado um antígeno primário, o qual consiste na forma promastigota fixada em uma lâmina específica para o teste, e em seguida e colocado

o anticorpo secundário, anticorpos anti-imunoglobulinas, o qual está conjugado com um fluorocromo, responsável pela fluorescência das *Leishmanias*. A IFI é considerada uma técnica sensível, no entanto limitada, uma vez que a mesma possibilita reações cruzadas, principalmente com a doença de Chagas e Leishmaniose Visceral. Apresenta uma sensibilidade de 71% nas formas cutâneas da doença (DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; GOMES et al., 2014; GONTIJO; DE CARVALHO, 2003).

A PCR foi realizada em 22 amostras, sendo positiva para 15 e negativa para 7. É uma técnica de alta sensibilidade e especificidade, a qual permite que através do DNA seja realizado um sequenciamento do mesmo, com o intuito de identificar e caracterizar o genoma das espécies de *Leishmania*. Embora esta técnica exiba uma alta sensibilidade e especificidade, a mesma requer uma atenção sofisticada, exigindo dessa forma uma mão de obra qualificada, além de possuir um alto custo (DE PAIVA-CAVALCANTI et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2016; REITHINGER et al., 2007).

Do total de pacientes, 22 realizaram a Pesquisa Direta, sendo positiva para 10 pacientes. A pesquisa direta é considerada o padrão ouro desde que se iniciaram estudos com *Leishmania*. O material a ser analisado pode ser obtido através da realização de uma escarificação, punção aspirativa e/ou biópsia da borda da lesão. Em seguida, pesquisa do parasita é realizada através de esfregaços corados por Giemsa, exame histopatológico, cultura in vitro e/ou inóculo em animais de laboratório. As chances de encontrar o parasito na lesão vai diminuindo com o tempo de evolução, dessa forma, nos primeiros meses de evolução a sensibilidade está em torno de 100%, já com 6 meses de infecção a sensibilidade cai para 75%. Nota-se que as chances de se deparar com o parasito é inversamente proporcional com o período de duração da lesão (BENSOUSSAN et al., 2006; GOTO; LINDOSO, 2010; VEGA-LÓPEZ, 2003).

A LTA exhibe uma patogênese aspectos clínicos, que podem variar de lesões localizadas a múltiplas lesões espalhadas pelo corpo, e que está estritamente relacionada com as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro, bem como com outros fatores como nutricionais e genética (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; BRELAZ et al., 2012; REIS et al., 2009). Entretanto, mesmo com os avanços das pesquisas na área da imunologia, ainda se tem muitas lacunas a serem preenchidas, visando um melhor entendimento dos aspectos imunológicos.

As células NK são conhecidas fenotipicamente pela ausência do marcador CD3 e pela expressão dos marcadores CD16 e CD56. Entretanto, outros marcadores podem ser observados nestas células como os marcadores CD127, NKG2D e NKp46. Estes marcadores auxiliam na avaliação da expansão dos linfócitos, ativação de células NK e atividade citotóxica, respectivamente (DUNHAM et al., 2008; HADAD et al., 2015; LANIER, 2015; OBEIDY; SHARLAND, 2009; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020; SIVORI et al., 1999). Estas células fazem parte da reposta imune inata, atuando indução da apoptose de células infectadas por meio da sua ação citotóxica (SMYTH et al., 2005; TOPHAM; HEWITT, 2009).

Em nosso estudo, observamos *ex vivo* que os pacientes com lesão ativa (AT) tendem a ter um aumento do percentual de células NK, embora não foi observado significância estatística. Além disso, observamos que estes mesmos pacientes apresentam um menor percentual de células NK CD16-. O mesmo foi observado por Cunha (2013) em seu estudo, que observou altos níveis de células NK (CD16+56+) em pacientes com leishmaniose tegumentar antes, durante e após o tratamento (CUNHA, 2013). Entretanto, Lieke e colaboradores (2008, 2011) observaram uma diminuição da proliferação destas células em modelos usando *L. (L.) major* e *L. (L.) aeothipica*, uma vez que a forma promastigota da *Leishmania* inibi sua proliferação (LIEKE et al., 2008, 2011). Talvez nosso resultado diferente seja devido a outra espécie de *Leishmania* que circula na nossa região. Nessas células NK, observamos ainda uma diminuição significativa da expressão do marcador NKG2D pelos pacientes AT. Sugerindo assim que, neste grupo, as células NK encontravam pouco ativadas, ou ainda, sugerindo que as células mais ativadas estejam no sitio de infecção. Este marcador, juntamente com o NKp46, podem estimular a atividade citotóxica das células NK, mesmo que em repouso (BRYCESON et al., 2006). Além disso, observamos uma menor expressão do marcador CD127, porém ao realizar cultura com antígeno de *Leishmania*, observamos um aumento da expressão desse marcador. Concluindo-se que, nos pacientes que AT, há uma tendência de expansão das células NK, entretanto, com o estímulo estas células tendem a ter uma alta ativação e, por conseguinte, atuar no combate a infecção.

Além disso, observamos que após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*, há um aumento no percentual de células NK CD16- nos pacientes AT, no entanto ainda inferior aos controles. O mesmo que foi observado por Campos e colaboradores

(2019) que ao avaliar o percentual de células NK após estimulação com antígeno solúvel de *Leishmania*, observando altos percentual de células NK em pacientes com leishmaniose tegumentar (CAMPOS et al., 2019).

Nos pacientes PT, as células NK apresentaram uma maior expressão do marcador NKG2D, mostrando dessa forma, que nesse grupo, têm-se células NK mais ativadas. Esta maior ativação pode estar relacionada com o controle da infecção, uma vez que estes pacientes já haviam finalizado o esquema terapêutico e apresentavam lesões cicatrizadas. Além disso, observamos uma maior expressão do marcador NKp46 nesta população celular. Um estudo realizado por Garcia-Iglesias e colaboradores (2009) observou que a baixa expressão de NKp30, NKp46 e NKG2D, estavam associados com a diminuição da atividade citotóxica das células NK, e consequentemente, relacionado com o câncer cervical e o surgimento de lesões precursoras (GARCIA-IGLESIAS et al., 2009). Dessa forma, nossos dados sugerem que após a cura clínica os pacientes apresentam células NK efetivamente ativadas, entretanto, com baixo potencial citotóxico, sugerindo assim, que as células após o fim da infecção ficam em estado de vigilância, o que é importante para o paciente. Além do mais, em nosso estudo, as células NK CD16- apresentaram uma diminuição do seu percentual em pacientes que já haviam obtido cura clínica, entretanto, estas células continuavam com alta ativação, estando estas células então, provavelmente atuando na produção de citocinas. Também se nota que estas células possuem baixa ação citotóxicas nos pacientes com lesão ativa. Com relação as células NK CD16+, parecem possuir uma baixa atividade citotóxica em pacientes com lesão ativa, além de apresentarem função efetora.

Cerca de 5% das células NK, expressão em sua superfície marcadores correspondentes a linfócitos T (CD3+), dessa forma, estas células passam a se comportar como células NKT. Entretanto, ainda é bastante escassos estudos com essas células na LTA. Em nosso estudo, observamos um aumento do número destas células em pacientes com lesão ativa (AT), quando comparado com o grupo pós-tratamento (PT) e saudável (CT), no entanto não observamos diferença estatística após cultura celular. Estudos observaram grandes percentuais dessas células em infecções por *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2002; VITELLI-AVELAR et al., 2006), sugerindo

assim, que estas células possam ser cruciais para o combate da infecção. Mais estudos são necessários para uma maior compreensão do seu papel na LTA.

Quando avaliado as subpopulações das células NKT *ex vivo*, observamos que pacientes com lesão ativa apresentam um menor percentual tanto de células NKT CD8 quanto de NKT CD4+. Estudos tem observado que essas subpopulações apresentam funções distintas. Enquanto que as células NKT CD4+ são fortes e potentes produtoras de citocinas como IL-2, IL-4 e IL-13, as células NKT CD8+ atuam de forma mais agressiva no combate a infecção, através da sua atuação citotóxica (GUMPERZ et al., 2002; MONTOYA et al., 2007; O'REILLY et al., 2011). Estudos realizados por Gumperz e colaboradores (2002) e por Carvalho e colaboradores (2010) observaram altos níveis de células NKT CD8+ em indivíduos sadios, corroborando dessa forma, com nossos achados (CARVALHO et al., 2010; GUMPERZ et al., 2002).

Quando realizada cultura com antígeno total, observamos um aumento no percentual no percentual das células NKT CD4+ em pacientes com lesão ativa. Segundo O'Reilly e colaboradores (2011), estas células apresentam grande capacidade de se expandir rapidamente, desde que estejam em condições favoráveis, o que não é observado em outras subpopulações (O'REILLY et al., 2011).

Em nosso estudo após estimulação antigênica, as células NKT, tanto CD4+ quanto CD8+, apresentaram uma baixa expressão de NKG2D, além de CD127. Sugerindo assim, que mesmo com um grande percentual de células NKT, as mesmas não estão muito ativadas, podendo o maior número de células ativadas pode estar no sítio da lesão. Quanto o marcador CD127, concluímos que as células NKT apresentaram função efetora, uma vez que, CD127 é cotado como marcador de células de memória (BOETTLER et al., 2006) e em nosso estudo observamos uma baixa expressão do mesmo.

Não observamos significância estatística com relação aos linfócitos T CD4+ quando avaliado em *ex vivo*, porém observamos um aumento das mesmas em pacientes com lesão ativa após cultura celular. Estas células são conhecidas pela sua grande capacidade de produzir citocinas, atuando assim na cura e/ou progressão da doença (SCOTT; NOVAIS, 2016). Esses linfócitos podem seguir dois perfis distintos, dependendo das citocinas que estão no meio: o perfil Th1, que produz uma grande

quantidade de IFN- γ , que é primordial para a produção de Óxido Nítrico (NO), culminando na morte da *Leishmania* (KIMA; SOONG, 2013; SOONG; HENARD; MELBY, 2012) e o perfil Th2, característico pela produção de Interleucina-4 (IL-4), Interleucina-10 (IL-10) e Fator de Necrose Tumoral-Beta (TNF- β), os quais atuam na inibição da produção de NO, favorecendo a multiplicação do parasita (GUMY; LOUIS; LAUNOIS, 2004; KEDZIERSKI; EVANS, 2014; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; RAPHAEL et al., 2015).

Nos linfócitos T CD4+, observamos uma maior expressão dos marcadores NKG2D por estas células após estimulação com antígeno total no grupo PT, além disso, também observamos uma maior expressão de Nkp46 e CD127 pelos pacientes AT, e uma diminuição nos pacientes PT. Não é comum encontrar linfócitos T CD4+ expressando o marcador NKG2D (VERNERIS et al., 2016), porém, estudos tem observado a expressão desse marcador por células CD4+ na infecção por Citomegalovírus, e em inflamações crônicas, como na esclerose múltipla e colite (QIAN et al., 2017; RUCK et al., 2013; SÁEZ-BORDERÍAS et al., 2006), bem como em algumas doenças autoimunes (ALLEZ et al., 2007; CAPRARU et al., 2008; GROH et al., 2003; YANG et al., 2017) sendo esta então considerada uma célula efetora citotóxica (LANIER, 2015). Desta forma, sugere-se que estas células possam estar relacionadas com o combate/cura da infecção, uma vez que pacientes curados apresentam um maior percentual destas células. Em um estudo realizado por Liu e colaboradores (2006) observaram que há uma regulação negativa do marcador CD127 em células T humanas após sua ativação (LIU et al., 2006). Dessa forma, nossos dados sugerem que nos pacientes as células T CD4+ apresentavam um grande percentual de ativação, e com isso, apresentaram então uma baixa expressão de CD127.

Os linfócitos T CD8+ apresentaram uma redução nos grupos AT e PT quando comparado com o grupo CT, após cultura com antígeno total de *L. braziliensis*. Estudos apontam que estas células estão relacionadas com a imunoproteção (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; CUNHA et al., 2016), em contra partida, outros autores apontam os linfócitos T CD8+ como os responsáveis pelos surgimentos das lesões, uma vez que estes são fontes produtoras de citocinas (CLARÊNCIO et al., 2008; FERRAZ et al., 2017; SANTOS et al., 2013). Campos e colaboradores (2019) observaram um menor percentual destas células em pacientes com leishmaniose,

quando comparado com o grupo de indivíduos saudáveis, corroborando desta forma com nossos achados (CAMPOS et al., 2019). Desta forma, sugere-se que, ao fim da infecção têm uma diminuição no percentual destas células, visto que o tecido lesado já cicatrizou e não é necessário a atuação destas células.

Nestas células, observamos uma menor expressão do marcador NKG2D pelos pacientes com lesão ativa (AT), bem como uma menor expressão de CD127 em ambos os grupos estudados, AT e PT, entretanto após cultura celular, observamos um aumento deste marcador por parte dos pacientes AT. Em um estudo realizado por Crosby e colaboradores (2015) observaram um aumento de células CD8+ que expressavam NKG2D em camundongos infectados por patógenos virais e bacterianos e em seguida pela *L. major* e em associação apresentaram lesões significativamente maiores. Neste mesmo estudo, os autores observaram que camundongos tratados com anticorpos bloqueadores de NKG2D, teve uma diminuição das lesões, bem como da gravidade da doença (CROSBY et al., 2014). O NKG2D, é cotado como uma grande possibilidade de alvo terapêutico, uma vez que este, traz informações sobre células que passaram por estresse, como células tumorais ou células infectadas por vírus ou parasitos (LANIER, 2015; SPEAR et al., 2013). Huster e colaboradores (2004) associa o marcador CD127 como ferramenta para diferenciação de células T de memória das efetoras (HUSTER et al., 2004), dessa forma, observamos que os pacientes do nosso estudo apresentaram um baixo percentual de células de memória nas células circulantes. Uma vez que na LTA é baseada na presença de lesões, e nestas lesões há a presença do parasito, é sugestivo que se tenha mais células efetoras no local da lesão, ou seja, *in situ*.

Na avaliação das citocinas, observamos um aumento na produção de TNF tanto nos pacientes AT, quanto nos pacientes PT. O TNF é uma das citocinas pró-inflamatória produzida pelo perfil Th1, que juntamente com o IFN- γ , atua na ativação de macrófagos, estimulando a produção de óxido nítrico, culminando dessa forma, na morte do parasita (ANVERSA et al., 2018; BARATTA-MASINI et al., 2007; CASTELLANO et al., 2009; RITTER et al., 2004). Entretanto, uma produção excessiva de TNF pode provocar danos teciduais e por conseguinte, provocar a formação de lesões (CASTELLANO et al., 2009; RITTER et al., 2004). Dessa forma, sugere-se que os pacientes deste estudo apresentavam uma resposta imunológica do perfil Th1. Estudos observaram que em pacientes com a forma disseminada, há uma menor

produção de TFN do que em pacientes com a forma localizada, podendo ser essa diminuição a causa da disseminação das lesões (MACHADO et al., 2011).

Diante disso, observamos que os pacientes que ainda não iniciaram o esquema terapêutico tendem a ter um aumento dos níveis de células NK, enquanto que há um aumento do percentual de células NKT. Entretanto, indivíduos saudáveis apresentam maior percentual de células NKT CD4⁺ e NKT CD8⁺, com um alto potencial citotóxico nas células NKT CD4⁺. NKG2D foi menos expresso nas células NK, NKT e linfócitos T CD8⁺, enquanto que nos linfócitos T CD4⁺, observamos uma maior expressão desse marcador nos pacientes PT. Já o marcador NKp46, observamos um aumento da sua expressão por células NK CD16⁻, NK, bem como nas células NKT CD4⁺, antes e pós estimulação, além dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ após estimulação com antígeno total. Observamos também uma baixa expressão de CD127 em todas as células avaliadas quando avaliado os dados *ex vivo*, porém ao realizar estimulação, observamos um aumento da expressão deste marcador em todas as células avaliadas. Com relação aos linfócitos, os pacientes AT apresentaram um maior percentual de linfócitos T CD4⁺ após estimulação com antígeno total, e com relação aos linfócitos T CD8⁺, apresentaram uma diminuição do seu percentual nos pacientes AT, após estimulação. Dessa forma, concluímos que as células NK parecem ser cruciais para o combate da infecção, bem como, as células NKT, visto que pacientes AT apresentam um maior percentual destas células. Além disso, as células NK parecem exercer um papel de memória, uma vez que pacientes com cura clínica apresentavam altos percentuais de células ativadas e citotóxicas. Além disso, as células NKT parecem exercer também um papel protetivo em indivíduos saudáveis, uma vez que os mesmos apresentaram maior percentual das subpopulações desta célula. Mais estudos serão realizados a fim de se fazer uma caracterização mais apurada das células NK e NKT, a fim de se observar a sua parcela de contribuição no controle da infecção.

7 CONCLUSÕES

- a) Todos os pacientes deste estudo eram moradores de áreas endêmicas para a LTA e a doença acometeu a mesma proporção de homens e mulheres, em sua maioria com idade superior a 20 anos. A evolução da doença variou de 0,2 a 5 meses, sendo as lesões encontradas em sua maioria nos membros inferiores, seguido dos membros superiores;
- b) Todos os pacientes tiveram ao menos um diagnóstico positivo para LTA e foram tratados com Glucantime® por um período de 20 dias;
- c) Nos estudos *ex vivo*, os pacientes que ainda não tinham iniciado o esquema terapêutico apresentaram um menor percentual de células NK CD16- e NK CD16+CD56+, bem como uma baixa expressão de Nkp46, NKG2D e CD127, sugerindo assim que estas células não apresentam potencial citotóxico, podendo então estar atuando na produção de citocinas nestes pacientes. Entretanto, nos pacientes pós-tratamento estas células se apresentam mais ativadas;
- d) Em relação as células NKT nas análises *ex vivo*, pacientes AT apresentaram um maior percentual destas células, enquanto que mostraram um menor percentual das subpopulações NKT CD4+ e NKT CD8+. Ao que parece, as células NKT apresentam um papel duplo na LTA. Elas podem atuar ora no combate a infecção, visto que pacientes AT apresentam células NKT CD4+ mais ativadas e menos citotóxicas, ora na produção de citocinas, atuando de forma protetiva, visto que indivíduos saudáveis apresentaram um maior percentual destas células;
- e) Na avaliação *ex vivo* dos linfócitos T CD4+ e CD8+, observamos baixa expressão de CD127 por estes linfócitos nos dois grupos de pacientes, além de uma menor expressão de NKG2D pelos linfócitos T CD8+ dos pacientes AT, mostrando assim que independente do momento da infecção, os linfócitos atuam de forma efetora, além disso, que as lesões formadas pelos pacientes AT não se relacionam com a citotoxicidade dos linfócitos T CD8+;

- f) Nos estudos com cultura celular, as células NK CD16⁻ apresentaram um menor percentual e pacientes antes e após tratamento em relação ao grupo controle, porém, pacientes AT apresentam uma maior ativação e ação efetora, mostrando dessa forma que diante do antígeno de *L. braziliensis* essas células aumentam sua ativação;
- g) Nas células NK (CD16⁺CD56⁺) não ocorreu mudança significativa no seu percentual após estimulação antigênica, porém, a estimulação mostrou uma maior ativação e ação efetora nos pacientes antes e após tratamento. Isso sugere que essas células parecem exercer um papel de memória, uma vez que pacientes com cura clínica apresentavam altos percentuais de células ativadas e citotóxicas;
- h) Após estimulação não se observou mudança no percentual das células NKT total, entretanto, observamos que as células NKT CD4⁺ apresentam um maior percentual e ativação em pacientes AT, mostrando que estas células atuam no combate a infecção, já as células NKT CD8⁺ apresentam uma maior ativação e ação efetora em pacientes PT, sugerindo assim que estas células possam atuar na vigilância após o término da infecção;
- i) Após cultura, os pacientes AT apresentaram alto percentual de linfócitos T CD4⁺, bem como uma maior expressão de NKp46 e CD127 e uma baixa expressão de NKG2D. Isso mostra que nestes pacientes estas células estão atuando de forma efetora e sem potencial citotóxico, porém, nota-se um aumento da citotoxicidade nestas células em pacientes com cura clínica, podendo o medicamento estimular o aumento desta citotoxicidade;
- j) Após cultura, os linfócitos T CD8⁺ apresentaram um menor percentual em pacientes AT e PT em relação ao controle. Também observamos uma maior expressão de NKp46 e CD127 pelos pacientes AT e um menor expressão de NKG2D pelos pacientes AT. Isso sugere que, mesmo com baixo percentual, estes linfócitos estão atuando de forma efetora e que estas células não estão envolvidas com o surgimento da lesão, visto que apresentaram baixo percentual citotóxico;

- k) Na avaliação das citocinas, os pacientes parecem ter apresentado um perfil pró-inflamatório, visto a alta concentração de TNF.

8 PERSPECTIVAS

- a) Avaliar a ação das células NK em co-cultura com promastigosta de *L. braziliensis*;
- b) Avaliar as células NK, NKT, linfócitos T CD4+ e linfócitos T CD8+, bem como os marcadores NKp46, NKG2D e CD127 em biópsia de lesões de pacientes com doença ativa.

REFERÊNCIAS

- AL-QADHI, B. N.; MUSA, I. S.; AL-MULLA HUMMADI, Y. M. K. Comparative immune study on cutaneous leishmaniasis patients with single and multiple sores. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 3, p. 361–370, 2015.
- ALLEZ, M. et al. CD4+NKG2D+ T Cells in Crohn's Disease Mediate Inflammatory and Cytotoxic Responses Through MICA Interactions. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2346–2358, 2007.
- ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review laís. **Rev assoc med BRas**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.
- APPAY, V. et al. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 11, p. 5954–8, 2002.
- APPAY, V. The physiological role of cytotoxic CD4+ T-cells: the holy grail? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 10–13, 2004.
- ARANHA, F. C. S. et al. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigote and macrophage infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 4, p. 334–341, 2005.
- ASLAN, N. et al. CYTOTOXIC CD4+ T CELLS IN VIRAL HEPATITIS. **J Viral Hepat**, v. 13, p. 505–514, 2006.
- BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.
- BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 3, p. 839–849, 2007.
- BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- BELLO, N. R. **Estudo clínico e epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no departamento de pando, região de fronteira entre o Brasil e a Bolívia.** [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.
- BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The Biology of NKT Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 297–336, 2007.
- BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, 2006.
- BENTES, A. A. et al. Leishmaniose americana cutaneous: challenging diagnosis in pediatric practice. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. Supl 6, p. 83–87, 2015.

- BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051–1057, 2008.
- BIHL, F. et al. Primed Antigen-Specific CD4 + T Cells Are Required for NK Cell Activation In Vivo upon Leishmania major Infection. **The Journal of Immunology**, p. 2174–2181, 2010.
- BOETTLER, T. et al. Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8 2 T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 80, p. 3532–3540, 2006.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1–9, 2012.
- BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.
- BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017b.
- BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012.
- BRELAZ, M. C. A. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 236–239, 2012.
- BRITO, F. F. DE et al. Estudo Clínico , Epidemiológico E Imunológico Para Leishmaniose Tegumentar Americana Em Centro. **Hensenologia Internationalis**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2015.
- BRYCESON, Y. T. et al. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. **Blood**, v. 107, p. 159–166, 2006.
- CAMPBELL, K. S.; HASEGAWA, J. Natural killer cell biology: An update and future directions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 536–544, 2013.
- CAMPOS-MARTÍN, Y. et al. Immature Human Dendritic Cells Infected with Leishmania infantum Are Resistant to NK-Mediated Cytolysis but Are Efficiently Recognized by NKT Cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. :6172-6179, 2006.
- CAMPOS, T. M. et al. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 11, p. 733–740, 2017.
- CAMPOS, T. M. et al. Granzyme B Produced by Natural Killer Cells Enhances Inflammatory Response and Contributes to the Immunopathology of Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1–10, 2019.

CAPRARU, D. et al. Expansion of circulating NKG2D+ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomaous lesions in Wegener's granulomatosis. **Clinical Immunology**, v. 127, n. 2, p. 144–150, 2008.

CARVALHO, K. I. et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–8, 2010.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.

CHUN, F. Z. et al. Cytotoxic CD4+ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2049–2057, 2007.

CICHOCKI, F.; SITNICKA, E.; BRYCESON, Y. T. NK cell development and function - Plasticity and redundancy unleashed. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 2, p. 114–126, 2014.

CLARÊNCIO, J. et al. Could the lower frequency of CD8⁺ CD18⁺ CD45RO⁺ lymphocytes be biomarkers of human VL ? **International Immunology**, v. 21, p. 137–144, 2008.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **TRENDS in Immunology**, v. 22, p. 633–640, 2001.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 19, p. 111–126, 2006.

CROME, S. Q. et al. Natural killer cells regulate diverse T cell responses. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 7, p. 342–349, 2013.

CROSBY, E. J. et al. Engagement of NKG2D on Bystander Memory CD8 T Cells Promotes Increased Immunopathology following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. 1–14, 2014.

CROUSE, J. et al. NK cells regulating T cell responses: Mechanisms and outcome. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 1, p. 49–58, 2015.

CUNHA, C. F. **Avaliação da Citotoxicidade na Evolução para a Cura Clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

CUNHA, C. F. et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis:

Assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 4, p. 244–254, 2016.

DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2017.

DE BRITO, M. E. F. et al. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: Uma avaliação crítica dos estudos realizados no estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1–2, p. 245–253, 2013.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–18, 2004.

DUNHAM, R. M. et al. CD127 and CD25 Expression Defines CD4+ T Cell Subsets That Are Differentially Depleted during HIV Infection. **J Immunol**, v. 180, p. 5582–5592, 2008.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012.

EXLEY, M. A.; KOZIEL, M. J. To be or not to be NKT: Natural killer T cells in the liver. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1033–1040, 2004.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8+ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, 2009.

FERRAZ, R. et al. CD3+CD4negCD8neg (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a+ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. Interleukin-7 : from bench to clinic. **Blood**, v. 99, p. 3892–3905, 2002.

GARCIA-IGLESIAS, T. et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. **BMC**

Cancer, v. 9, p. 1–8, 2009.

GEIGER, T. L.; SUN, J. C. Development and maturation of natural killer cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 39, p. 82–89, 2016.

GODFREY, D. I. et al. NKT cells: Facts, functions and fallacies. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 573–583, 2000.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–709, 2014.

GONÇALVES, N. V. et al. Cutaneous leishmaniasis : Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará , Brazilian Eastern Amazon. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, 2019.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. alpha -Galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 15, p. 8461–8466, 2002.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, p. 419–433, 2010.

GROH, V. et al. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9452–9457, 2003.

GUMPERZ, J. E. et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 5, p. 625–636, 2002.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 433–444, 2004.

HADAD, U. et al. NKp46 clusters at the immune synapse and regulates NK cell polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. SEP, p. 1–11, 2015.

HAMMOND, K. et al. Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells. **International Immunology**, v. 10, n. 10, p. 1491–1499, 1998.

HUSTER, K. M. et al. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. **PNAS**, v. 101, p. 5610–5615, 2004.

JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J. Natural killer cells and immune surveillance. **Jornal de**

Pediatrics, v. 84, n. 7, p. 58–67, 2009.

KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.

KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–5, 2013.

LANIER, L. L. NKG2D receptor and its ligands in host defense. **Cancer Immunol Res.**, v. 3, p. 575–582, 2015.

LIEKE, T. et al. Leishmania surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p. 221–230, 2008.

LIEKE, T. et al. 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**, v. 138, n. 14, p. 1898–1909, 2011.

LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4 + T reg cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1701–1711, 2006.

LOPEZ-VERGÉS, S. et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56 dim CD16² NK-cell subset. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3865–3875, 2016.

LUCA, P. M. DE; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis vaccination : A Matter of Quality. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–444, 2011.

MANDAL, A.; VISWANATHAN, C. Natural killer cells: In health and disease. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, v. 8, n. 2, p. 47–55, 2015.

MENDES, A. P. O. et al. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using L. (V.) braziliensis fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1015, 2019.

MONTALDO, E. et al. Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 2, p. 107–113, 2014.

MONTOYA, C. J. et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 1–14, 2007.

MROZEK, B. E.; ANDERSON, P.; CALIGIURI, M. A. Role of Interleukin-15 in the Development of Human CD56⁺ Natural Killer Cells From CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2632–2640, 1996.

NAGARAJAN, N. A.; KRONENBERG, M. Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2706–2713, 2007.

NAMEKAWA, T. et al. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 12, p. 2108–2116, 1998.

NARNI-MANCINELLI, E.; VIVIER, E. NK Cell Genesis: A Trick of the Trail. **Immunity**, v. 36, n. 1, p. 1–3, 2012.

NASCIMENTO, M. S. L. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, p. 1015–1026, 2014.

NYLÉN, S.; AKUFFO, H. Tracing immunity to human leishmaniasis. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 241–254, 2009.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 551–561, 2012.

O'REILLY, V. et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, cd8 α ⁺ and CD4⁺-CD8 α ⁺ invariant natural killer T cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 2–12, 2011.

OBEIDY, P.; SHARLAND, A. F. NKG2D and its ligands. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, p. 2364–2367, 2009.

OLIVEIRA, B. et al. American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A Review. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 05, n. 01, p. 1–5, 2016.

OLIVEIRA, A. P. DE et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1–2, p. 245–253, 2013.

OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. 1. ed. Washington: [s.n.].

PAPAMICHAIL, M. et al. Natural killer lymphocytes : biology , development , and function. **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, p. 176–186, 2004.

PEREIRA, A. M. DE S. et al. O uso da citometria de fluxo como critério de cura e

aplicabilidade diagnóstica na leishmaniose tegumentar americana (LTA). **Brazilian Journal of health Review**, v. 2, p. 203–213, 2019.

PIETRZAKI CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55, 2017.

PIPKIN, M. E.; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 301–308, 2007.

PISCOPO, T. V; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, v. 82, p. 649–657, 2006.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PORAKISHVILI, N. et al. Expansion of CD4⁺ T cells with a cytotoxic phenotype in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 126, n. 1, p. 29–36, 2001.

PORAKISHVILI, N. et al. Cytotoxic CD4⁺ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. **Haematologica**, v. 89, n. 4, p. 435–443, 2004.

QIAN, X. et al. NK1.1⁺ CD4⁺ NKG2D⁺ T cells suppress DSS-induced colitis in mice through production of TGF- β . **J. Cell. Mol. Med.**, v. 21, p. 1431–1444, 2017.

QUEZADA, S. A. et al. Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 3, p. 637–650, 2010.

RAMACHANDRAN, H. et al. Optimal Thawing of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Use in High-Throughput Human Immune Monitoring Studies. **Cells**, v. 1, n. 3, p. 313–324, 2012.

RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, p. 5–17, 2015.

REIS, L. C. et al. Cellular immune response profile in patients with american tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 63–69, 2009.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 581–596, 2007.

RITTER, U. et al. The control of *Leishmania* (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 6, p. 559–565, 2004.

RODRIGUES, M. G. DE A. et al. The role of deforestation on American cutaneous

leishmaniasis incidence: spatial-temporal distribution, environmental and socioeconomic factors associated in the Brazilian Amazon. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 3, p. 348–355, 2019.

ROUQUAYROL, M. Z.; GURGEL, M. **Epidemiologia & Saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

RUCK, T. et al. CD4 + NKG2D + T Cells Exhibit Enhanced Migratory and Encephalitogenic Properties in Neuroinflammation. v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 671–678, 2007.

SÁEZ-BORDERÍAS, A. et al. Expression and function of NKG2D in CD4 + T cells specific for human cytomegalovirus. **Eur. J. Immunol**, p. 3198–3206, 2006.

SANTOS-MATEUS, D. et al. The Battle between Leishmania and the Host Immune System at a Glance. **International Trends in Immunity**, p. 28–34, 2015.

SANTOS, C. D. S. et al. CD8+ granzyme B+ -mediated tissue injury vs. CD4 + IFN γ + -mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 1533–1540, 2013.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis : immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 581–592, 2016.

SHIMASAKI, N.; JAIN, A.; CAMPANA, D. NK cells for cancer immunotherapy. **Nature reviews. Drug discovery**, 2020.

SIVORI, S. et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 5, p. 1656–1666, 1999.

SLAUENWHITE, D.; JOHNSTON, B. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, 2015.

SMYTH, M. J. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4 SPEC. ISS., p. 501–510, 2005.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v. 34, p. 735–751, 2012.

SPEAR, P. et al. NKG2D ligands as therapeutic targets. **Cancer Immunity**, v. 13, p. 1–14, 2013.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the**

Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2011.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, 2011.

TOPHAM, N. J.; HEWITT, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 7–15, 2009.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF THE PERFORIN / GRANZYME CELL DEATH PATHWAY. **IMMUNOLOGY**, v. 2, n. October, p. 735–747, 2002.

VAN DE BERG, P. J. et al. Cytotoxic human CD4+ T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 3, p. 339–343, 2008.

VAN LEEUWEN, E. M. M. et al. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 3, p. 1834–41, 2004.

VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97–101, 2003.

VERNERIS, M. R. et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded. **bLOOD**, v. 103, p. 3065–3073, 2016.

VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25^{high} T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 1, p. 81–92, 2006.

VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.

VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2011.

VOKURKOVÁ, D. et al. Radiosensitivity of CD3-CD8+CD56+ NK cells. **Radiation Measurements**, v. 45, n. 9, p. 1020–1023, 2010.

WILLIAMS, N. S. et al. Natural killer cell differentiation: Insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. **Immunological Reviews**, v. 165, p. 47–61, 1998.

WU, Y.; TIAN, Z.; WEI, H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, 2017.

XIE, Y. et al. Naive tumor-specific CD4 + T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 3, p.

651–667, 2010.

YANG, D. et al. NKG2D + CD4 + T Cells Kill Regulatory T Cells in a NKG2D-NKG2D Ligand- Dependent Manner in Systemic Lupus Erythematosus. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

YASUKAWA, M. et al. Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans. **Blood**, v. 95, n. 7, p. 2352–5, 2000.

ZAJONC, D. M.; GIRARDI, E. Recognition of microbial glycolipids by Natural Killer T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUL, p. 1–11, 2015.

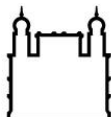
ZAMORA-CHIMAL, J. et al. NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 454–462, 2017.

ZAMORA-CHIMAL, J.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, I. NKT cells in leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 222, n. 4, p. 641–646, 2017.

ZAUNDERS, J. J. et al. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2238–2247, 2004.

ZHANG, C.; TIAN, Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 22–30, 2017.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Paciente

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar deste estudo porque mora em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado(a) por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como o(a) senhor(a) faz parte do grupo de pacientes, será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a). Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o senhor tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que serão prescritas pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração em seu organismo, o senhor deverá procurar o médico do posto de saúde. O senhor não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor e os membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício

no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. (A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o senhor venha a ter sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

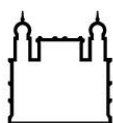
DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

Assinatura do paciente	data
Endereço do paciente para contato	data
Assinatura do pesquisador responsável	data
Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ	data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Pereira Hernandes):
Departamento de Imunologia, Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av.
Moraes Rêgo, s/nº, Recife, fone: (81) 21012631.

APÊNDICE B - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO PACIENTE MENOR DE 18 ANOS



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Termo de Assentimento Livre e Esclarecido— Grupo Paciente Menor de 18 anos

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo porque moram em uma região onde a leishmaniose é comum. O(A) senhor(a) será acompanhado por visitas em sua casa, com objetivo de identificar se alguém de sua família foi contaminado pelo parasita que causa a leishmaniose. Para isto, as pessoas que moram em sua casa serão consultadas.

Como responsável pelo menor, o(a) senhor(a) está sendo convidado a participar deste estudo devido ao mesmo se encontrar no grupo de pacientes menores de 18 anos. Será solicitada uma coleta de sangue de 20 ml, o que equivale a duas colheres de sopa. Serão também realizados exames para confirmar sua doença e que incluirão a pesquisa direta, punção aspirativa, imunofluorescência indireta e biópsia da borda da ferida. Todas as informações e detalhes dos exames que serão realizados, serão previamente esclarecidos para o(a) senhor(a) que é responsável pelo menor. Além disso, o(a) senhor(a) também receberá os resultados desses exames, que será emitido pelo Serviço de Referência em Leishmanioses do Instituto Aggeu Magalhães. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). A biópsia é a retirada de um pequeno pedaço da lesão, aplicando-se um anestésico; normalmente, não oferece riscos, exceto um pequeno sangramento no local ou um ponto de infecção, que pode ser tratado com limpeza e medicação locais. A biópsia será realizada pela médica dermatologista participante do projeto no hospital ou centro de saúde onde ela trabalha.

O remédio utilizado para o tratamento será o Glucantime® e o paciente menor de idade tomará injeções no braço ou nas nádegas em doses que será prescrita pela sua médica. Esse remédio (Glucantime®) é o mais utilizado, promove cura da doença e pode ter efeitos colaterais como náuseas e indisposição (moleza). Se ocorrer qualquer alteração no organismo do menor, o senhor deverá levar o menor ao médico do posto de saúde. O(A) senhor(a) não terá gastos em decorrência dos testes ou tratamento que o menor realizará. Os benefícios em participar deste estudo são que o senhor, o menor por quem o(a) senhor(a) é responsável e os outros membros de sua família serão estudados para avaliar se apresentam algum sinal de infecção ou se são imunes a desenvolver a leishmaniose. Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer

momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o consentimento do menor, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o senhor(a) concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter como responsável pelo menor sobre o significado dos termos empregados nesse texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

Eu,....., responsável pelo menor....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

Assinatura do menor

data

Assinatura do responsável pelo menor

data

Endereço do responsável pelo menor

data

Assinatura do pesquisador responsável

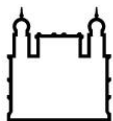
data

Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ

data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Pereira Hernandes):
Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/nº,
Recife, fone: (81) 21012631.

APÊNDICE C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO – GRUPO CONTROLE



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Aggeu Magalhães

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – Grupo Controle - Apêndice 3

Projeto: “Caracterização da resposta imunológica em pacientes portadores de Leishmaniose Tegumentar Americana Ativa e após cura clínica”.

O objetivo principal desse projeto é a análise de aspectos biológicos que pode ter influência na doença causada por *Leishmania Viannia braziliensis*. A *Leishmania* é um parasita do homem que causa doença (lesões) na pele, conhecida como leishmaniose tegumentar (ferida brava).

O(A) senhor está sendo convidado(a) a participar deste estudo por se encontrar no grupo controle, ou seja, grupo de indivíduos que não apresentam a doença, e reside em região em que não é endêmica para a doença, e que servirão de comparação com os indivíduos doentes. Ao senhor(a) será solicitada uma única coleta de sangue de 20 ml o que equivale a duas colheres de sopa. Todo procedimento será realizado com material estéril descartável e por profissionais de saúde de reconhecida capacidade. A coleta de sangue pode causar um leve desconforto, como dor no local da punção, e, raramente, pode levar ao aparecimento de uma mancha roxa ao redor da picada, causada pelo extravasamento de pequena quantidade de sangue (hematoma). Esse trabalho trará grande benefício no estudo da leishmaniose, pois ajudará a entender melhor sobre a proteção das pessoas a esta doença. O(A) senhor(a) pode solicitar informações sobre o projeto a qualquer momento caso julgue necessário. O(A) senhor(a) poderá recusar ou retirar o seu consentimento, em qualquer momento da investigação, sem qualquer punição ou prejuízo.

A Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ) está autorizada a utilizar as informações obtidas através dos resultados dos procedimentos em reuniões, congressos, patentes e publicações científicas preservando, neste caso, a sua identidade. O IAM/FIOCRUZ poderá também estocar o material coletado para posteriores estudos, apenas se o(a) senhor(a) concordar. O(A) senhor(a) poderá contactar o CEP/IAM para saber se a pesquisa foi avaliada e aprovada quanto à ética do estudo. Da mesma forma o CEP poderá ser contactado através do endereço Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Avenida Moraes Rego, s/n, Cidade Universitária, caixa postal 7472, CEP: 50670-420, Recife-PE, Brasil, telefone (81) 21012639 em caso de alguma denúncia de sua parte referente a essa pesquisa.

Este documento é feito em duas vias, ficando uma em sua posse e a outra com a equipe do projeto e que todas e quaisquer dúvidas que o(a) senhor(a) venha a ter sobre o significado dos termos empregados no presente texto lhe serão completamente esclarecidos por um dos membros do projeto antes que o senhor assine este impresso.

DECLARAÇÃO DO PARTICIPANTE

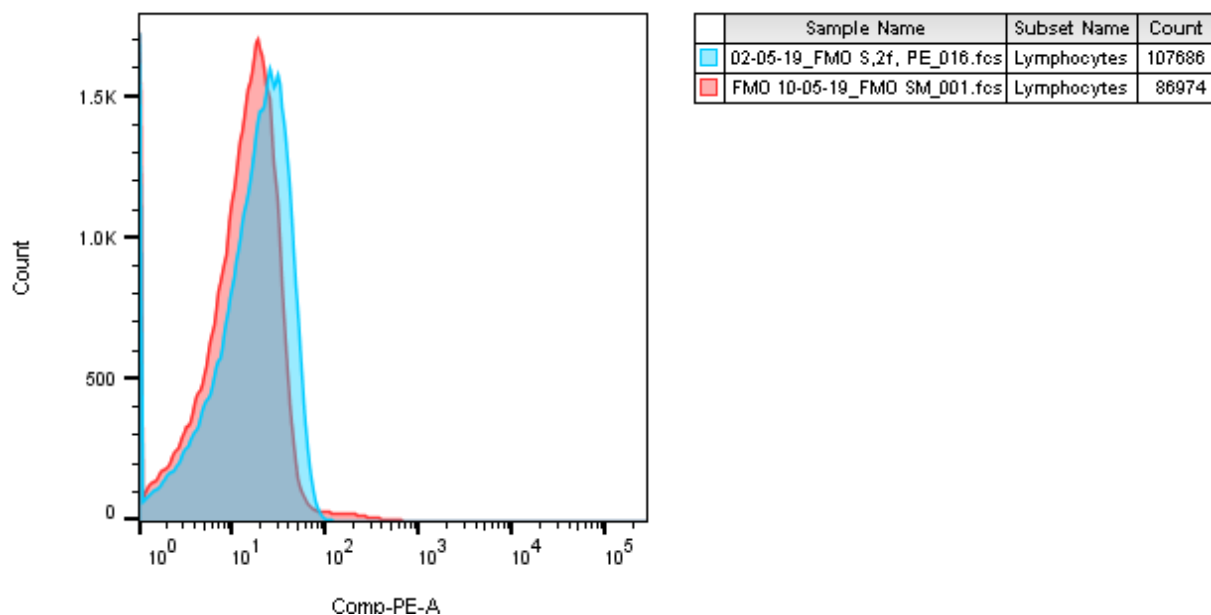
Eu,....., li e concordo em participar como voluntário neste projeto que envolverá o Instituto Aggeu Magalhães da Fundação Oswaldo Cruz (IAM/FIOCRUZ).

_____	_____
Assinatura do voluntário	data
_____	_____
Endereço do voluntário	data
_____	_____
Assinatura do pesquisador responsável	data
_____	_____
Assinatura do médico responsável – IAM/FIOCRUZ	data

Endereço profissional do pesquisador responsável (Valéria Rêgo Alves Pereira):
Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ, Av. Moraes Rêgo, s/nº,
Recife, fone: (81) 21012631.

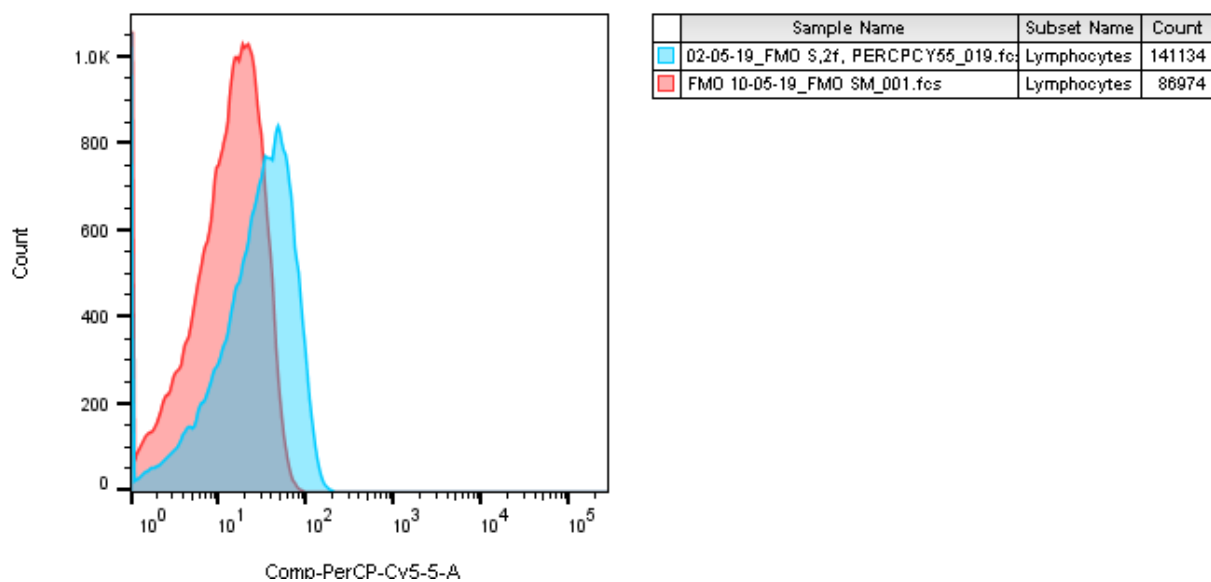
APÊNDICE D – FLUORESCENCE MINUS ONE DOS ANTICORPOS UTILIZADOS NO ESTUDO

Figura 31 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD56 (PE)



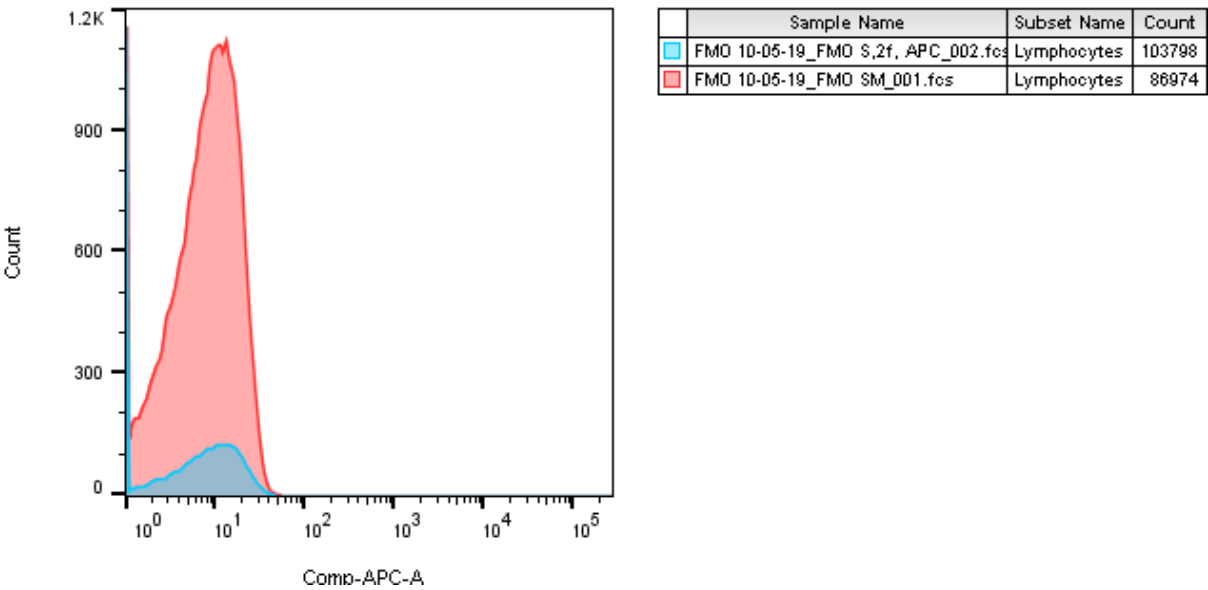
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

Figura 32 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD4 (PERCPCY 5.5)



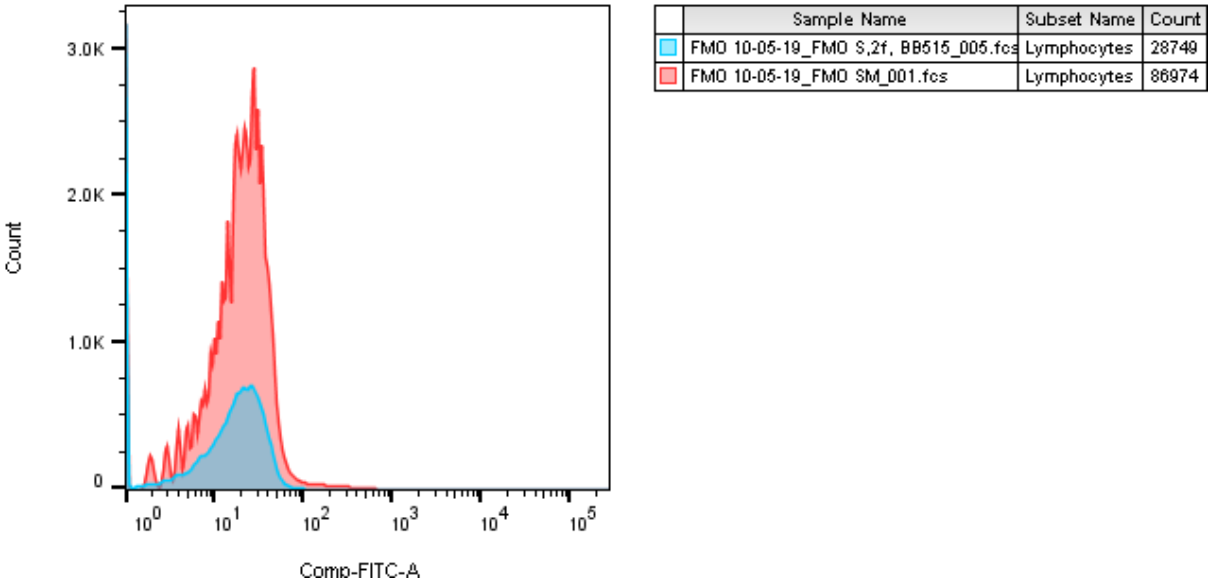
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

Figura 33 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD8 (APC)



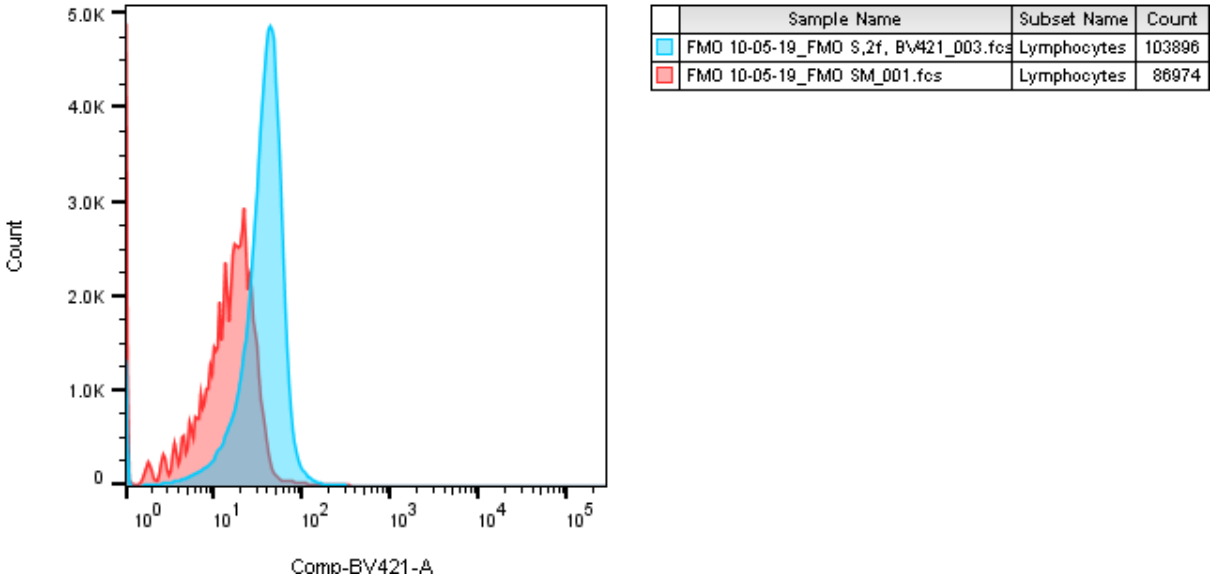
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

Figura 34 - Fluorescence Minus One do anticorpo NKp46 (BB515)



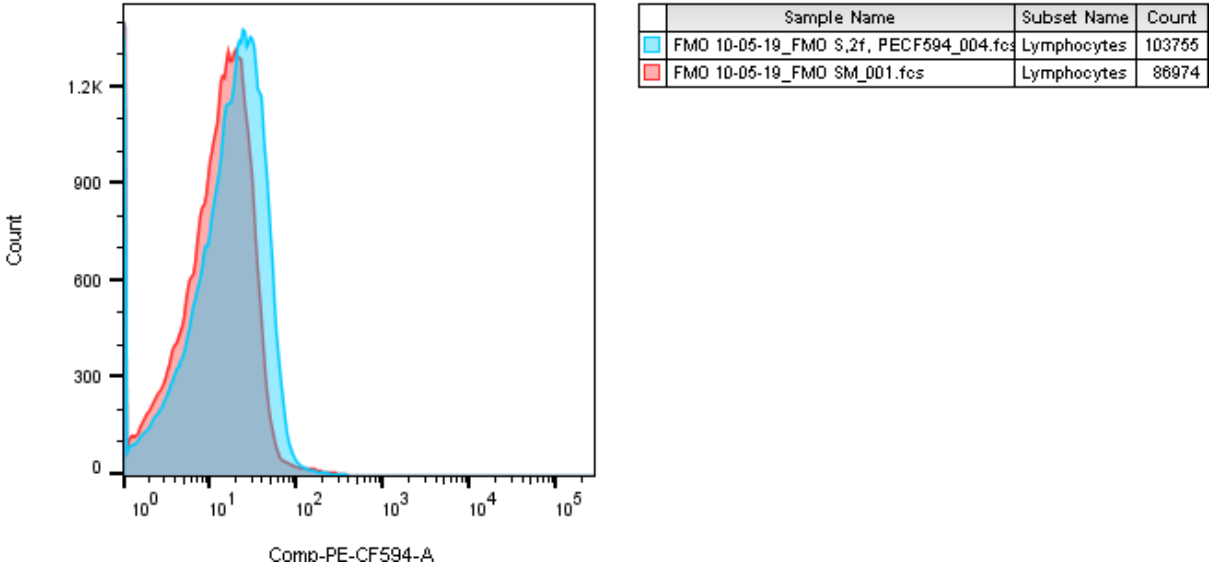
Fonte: Dados obtidos com o Software FlowJo versão 10

Figura 35 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD127 (BV421)



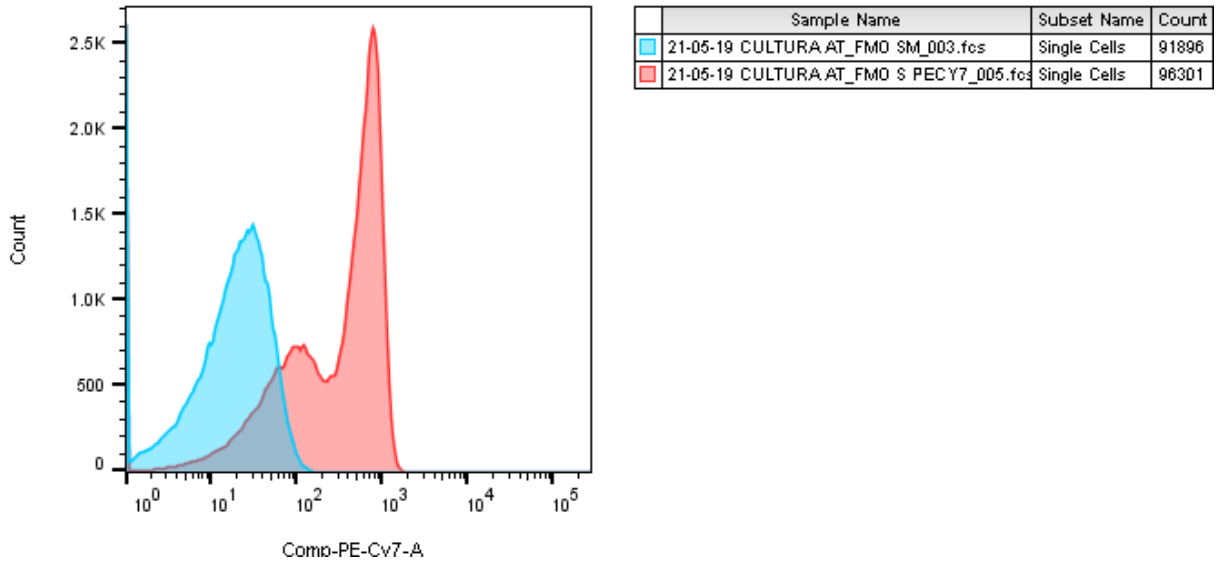
Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

Figura 36 - Fluorescence Minus One do anticorpo NKG2D (PECF594)



Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

Figura 37 - Fluorescence Minus One do anticorpo CD16 (PECY 7)



Fonte: Dados obtidos no software Flowjo versão 10

APÊNDICE E – ARTIGO 1

(Em redação)

AVALIAÇÃO DE CÉLULAS NK E NKT EM PACIENTES COM LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ANTES E APÓS TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

Short title: NK and NKT cell in ATL

Marton Kaique de Andrade Cavalcante¹, Allana Maria de Souza Pereira^{1,3}, Elis Dionisio da Silva³, Rafael de Freiras e Silva², Vitorina Nerivânia Covello Rehn⁴, Vanessa Lucília Silveira de Medeiros⁵, Maria Edileuza Felinto de Brito³, Valéria Rêgo Alves Pereira³, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro^{1,3,4}

1- Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil;

2- Universidade de Pernambuco, Garanhuns, PE, Brasil;

3- Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Recife, PE, Brasil;

4- Laboratório de Parasitologia, Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco (CAV/UFPE), Vitória de Santo Antão, PE, Brasil.

5- Hospital das Clínicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE, Brasil.

Correspondence address: Laboratory of Immunopathology and Molecular Biology - Aggeu Magalhães Institute/FIOCRUZ-PE. Av. Prof Moraes Rego, s/n - UFPE Campus - Cidade Universitária, Recife - PE - Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS:

We thank the platform PDTIS/Flow Cytometry (RPT08F) -FIOCRUZ. MKAC is the recipient of a MSc fellowship from CAPES. This work was supported by the FACEPE (APQ 0820-2.11.2017). The authors declare that there is no conflict of interest.

Key words: Flow cytometry, Leishmaniasis, Cutaneous, Neglected disease, NK cells, PBMC, Immune System.

INTRODUÇÃO

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, ligada principalmente a baixo status socioeconômico (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; SAVOIA, 2015). As leishmanioses estão espalhadas em cinco continentes acometendo em torno de 105 países (ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD, 2019). O número de indivíduos infectados pelo parasito vem aumentando com o passar dos anos, o que pode ser atribuído não apenas aos avanços no diagnóstico e notificação, mas também ao desmatamento, urbanização e migração, guerras, que provocam modificações ecológicas e consequentemente, mudanças no habitat do vetor (BELLO, 2014; GONÇALVES et al., 2019; KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015; RODRIGUES et al., 2019).

Atualmente, estima-se que cerca de 350 milhões de pessoas estejam sujeitas a contrair as leishmanioses. São estimados 1,3 milhões de novos casos por ano, dos quais cerca de 20 a 30 mil irão a óbito por consequência da doença (SANTOS-MATEUS et al., 2015). A leishmaniose tegumentar americana (LTA) corresponde a cerca de 50% dos novos casos, Cerca de 95% dos casos de LTA ocorrem nas Américas, na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Desse total, cerca de dois terços dos novos casos ocorrem principalmente em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e República Árabe Síria (ANVERSA et al., 2018; SANTOS-MATEUS et al., 2015).

O sistema imunológico pode expressar sua resposta à infecção por *Leishmania* através de mecanismos da imunidade inata e imunidade adaptativa. Após a inoculação do parasita na pele do hospedeiro, o mesmo irá interagir com os macrófagos teciduais, os quais irão fagocitá-los (KEDZIERSKI; EVANS, 2014), além de desencadear a ativação do sistema complemento (SANTOS-MATEUS et al., 2015). Dentre as diversas células que constituem a imunidade inata destacam-se as células Natural Killer (NK).

As células NK fazem parte da imunidade inata e correspondem a cerca de 5 - 20% dos linfócitos circulantes. São conhecidas pela sua capacidade de matar rapidamente células infectadas, modificadas ou autorreativas através do mecanismo de exocitose, onde libera seus grânulos interno denominados granzima e perforina (NARNI-MANCINELLI; VIVIER, 2012; VIVIER et al., 2008, 2011). Além disso, as

células NK são grandes produtoras de citocinas como IFN-gama e TNF atuando, desta forma, no recrutamento e ativação de outras células imunológicas para o combate a infecção (ZHANG; TIAN, 2017).

Estas células são reconhecidas por expressar em sua superfície os marcadores CD16⁺ e CD56⁺ e pela ausência do marcador CD3. As células NK podem ser divididas em 2 subtipos de acordo com a intensidade dos seus marcadores de superfície: CD3-CD56^{bright} e CD3-CD56^{dim}. A primeira, apresenta uma alta expressão do marcador CD56, e tem como função principal a produção de citocinas e quimiocinas, já a segunda, apresenta uma baixa expressão do marcador CD56, tem função efetora, matando através de seus grânulos, perforina e granzima, as células infectadas (CAMPOS et al., 2017; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020). Além disso, cerca de 5% do número total das NKs expressam em sua superfície, além do marcador CD56, o marcador CD3, tornando-as assim em células Natural Killer T (NKT) (CAMPBELL; HASEGAWA, 2013; COOPER; FEHNIGER; CALIGIURI, 2001).

As células NKT são linfócitos T que possuem características tanto destas células quanto de células NK, somando assim função destes dois tipos celulares. Estas células são responsáveis por fazer uma ponte entre as respostas inata e adaptativa e correspondem a cerca de 0,1-0,5% dos leucócitos do sangue periférico. Dentre as características de uma célula NKT destacam-se a presença de receptores de células T (TCR), expressão de CD1d, além da alta produção de citocinas, principalmente IFN- γ , TNF, IL-4, IL-10 e IL-13 (EXLEY; KOZIEL, 2004; GODFREY et al., 2000; SLAUENWHITE; JOHNSTON, 2015; ZAMORA-CHIMAL et al., 2017; ZAMORA-CHIMAL; HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2017).

Além disso, essas células expressam diversos marcadores como NKG2D, NKp46 e CD127. NKG2D é um marcador de ativação, encontrando nas células NK, linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, bem como em células $\gamma\delta$, localizado na superfície celular (OBEIDY; SHARLAND, 2009). Esta molécula é conhecida pela sua capacidade de reconhecer quando uma célula passou por episódio de estresse, através do NKG2D ligante (LANIER, 2015). O NKp46, é um marcador de ativação de células NK, o qual está envolvida com a extermínio de células-alvo (HADAD et al., 2015). Sivori e colaboradores (1999) relata que o NKp46 é o principal receptor responsável pela citotoxicidade das células NK humanas (SIVORI et al., 1999). O CD127 é o receptor da IL-7, citocina responsável pelo aumento da sobrevivência, bem como da expansão dos

linfócitos. Além de que, A IL-7 atua no melhoramento do desenvolvimento de linfócitos T a nível de medula óssea e timo (DUNHAM et al., 2008; FRY; MACKALL, 2002).

Entretanto, ainda são escassos estudos sobre a função da NKT na infecção pela *Leishmania* (ZAMORA-CHIMAL; HERNÁNDEZ-RUIZ; BECKER, 2017). Dessa forma, o presente estudo buscou avaliar as células NK e NKT em pacientes com leishmaniose tegumentar americana antes e após o tratamento com quimioterápico. Em nosso estudo observamos um aumento das células NK em pacientes AT e uma redução das mesmas em pacientes que obtiveram cura clínica. Entretanto, mesmo com baixo percentual destas células, os pacientes PT apresentam células mais ativadas e com perfil citotóxico. Também observamos que pacientes com lesão ativa apresentam um alto percentual de células NKT quando comparado com o grupo controle, entretanto, quando avaliado as subpopulações, observamos um maior percentual tanto das células NKT CD4+, quanto CD8+ em indivíduos saudáveis, sem histórico da doença e de transfusão sanguínea. Além disso, observamos que as células NKT CD4+ apresentavam uma maior ativação em pacientes AT, além de um baixo potencial citotóxico.

MATERIAIS E MÉTODOS

População de estudo

Os pacientes deste estudo eram residentes de áreas endêmicas para a LTA no estado de Pernambuco. Um total de 34 pacientes fizeram parte desta pesquisa, os quais foram distribuídos em 2 grupos: um grupo denominado antes do tratamento (AT), composto por pacientes que ainda não haviam iniciado o esquema terapêutico (n= 22) e um grupo denominado pós-tratamento (PT), composto por pacientes que já haviam finalizado o esquema terapêutico e obtido cura clínica (n= 12). Os dados desses grupos foram comparados com um grupo denominado controle (CT) composto por indivíduos saudáveis, residentes em áreas não endêmicas para a doença (n= 17). Foram incluídos no estudo todos os pacientes com idade superior a 10 anos, que apresentaram diagnóstico clínico, epidemiológico e ao menos dois diagnósticos laboratoriais positivos para a LTA, realizados pelo Serviço de Referência em Leishmaniose do Instituto Aggeu Magalhães. Dentre os exames realizados tivemos: Reação de Cadeia em Polimerase (PCR), Imunofluorescência indireta (IFI), Pesquisa direta (PD) ou Punção aspirativa (PA). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê

de Ética do Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães/Fiocruz (CAAE: 11083812.7.0000.5190).

Obtenção das células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Vinte mililitros (20ml) de sangue foram coletados utilizando-se o sistema a vácuo. O sangue foi diluído em meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) na proporção 2:1 e transferido para tubos cônicos contendo Ficoll-Hypaque (Amersham Bioscience, Uppsala, Suécia). Após centrifugação (400xG, 35') foi obtida uma camada de PBMC. As células foram lavadas duas vezes com 10 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e submetidas a nova centrifugação (300xG, 10'). Depois do descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em meio de cultura RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular (10µl) foi então removida, diluída em azul de trypan (90µl) (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer.

Após a separação e contagem das PBMCs, foi adicionado as células 900µl de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 100µl de DMSO. A amostra foi então homogeneizada e armazenada em um tubo vial de 2 ml. O vial foi levado para o Mr Frosty (Nalgene) e armazenado no Deep Freezer – 80°C e, no dia seguinte, foi transferido para um recipiente contendo nitrogênio líquido.

Para utilização, as amostras foram retiradas no nitrogênio, colocadas em gelo e rapidamente foram transferidas para banho maria (37°C), onde permaneceram até restar pequenas quantidades de cristais de gelo. Rapidamente, as amostras foram levadas para o fluxo, depositadas por gotejamento (durante 30 segundos) em um tubo falcon de 15 ml, e ressuspendidas inicialmente com 1 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO), adicionado por gotejamento (durante 30 segundos) e em seguida foi completado o volume para 5 ml, ainda por gotejamento e posteriormente completado para o volume final de 10 ml (adicionado lentamente pela parede do tubo). As células foram então centrifugadas (300 G x 6 minutos), foi descartado o sobrenadante e ressuspendidas novamente com 10 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab,

Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). As amostras foram levadas para estufa à 37°C / 5% de CO₂ durante 24h. Passado o tempo de descanso, as células foram centrifugadas (300 G x 6 minutos), ressuspensas em 1 ml de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) suplementado com 10% de SFB (Cultilab, Campinas, SP, Brasil) e 1% de antibiótico (100UI/ml de penicilina e 100µg/ml de estreptomicina; Sigma, St. Louis, MO). Uma alíquota da suspensão celular (10µl) foi então removida, diluída em azul de trypan (90µl) (Sigma, St. Louis, MO) e quantificada em câmara de Neubauer. Após contagem, foram realizados cálculos para ajustar a concentração de células (0,5x10⁶ células/ml).

Citometria de fluxo

Para a análise das populações linfocitárias NKT e os marcadores de citotoxicidade, as PBMCs (0,5x10⁶ células) foram suspensas em PBS e marcadas com anticorpos de superfície anti CD3, CD4, CD8, CD16, CD56, CD127, NKG2D e NKp46, por um período de 30 minutos (todos previamente titulados). Após esse tempo, as células foram lavadas com a solução de PBS, e então resuspensas em 200 µl de PBS. As amostras foram analisadas no citômetro de fluxo FACSARIA III- BD Bioscience (100.000 mil eventos/tubo) usando o software “Facs Diva 8.0” (BD Bioscience) para aquisição dos dados e o software FlowJo 7.6.5 (®Tree Star Inc.) para sua análise.

Análise estatística

Para a análise estatística utilizou-se o software GraphPad Prism 7. Primeiramente, foi realizado o teste Shapiro-Wilk, para verificar a normalidade dos dados. Em seguida, foi realizado o teste test T-student quando observados os pressupostos de normalidade. Quando não, foi utilizado o teste não paramétrico Mann-Whitney. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características clínicas dos pacientes

O grupo de pacientes antes do tratamento (AT), foi composto por vinte e dois pacientes que apresentavam lesão ativa e que ainda não haviam iniciado o esquema terapêutico, os mesmos foram incluídos obedecendo-se os critérios de inclusão e exclusão. Foram observadas características como idade, sexo, forma clínica, número de lesões, localização das lesões e tempo de evolução da doença (Tabela 1). A idade dos pacientes variou entre 12 e 76 anos, com média de $40,04 \pm 18,66$. Os pacientes apresentaram de 1 a 5 lesões distribuídas por todo corpo, sendo a maioria das lesões localizadas nos membros inferiores, seguido dos membros superiores. Todos os pacientes foram tratados com Glucantime®, recebendo 15 ml por dia, durante 20 dias consecutivos.

No grupo pós-tratamento (PT), foram selecionados doze pacientes, que já haviam finalizado o esquema terapêutico, obtido cura clínica e que recebeu alta médica. A idade destes pacientes variou entre 7 e 71, com média de idade $39,66 \pm 20,43$ (Tabela 1).

O grupo controle (CT), foi representado por dezessete indivíduos sadios, residentes de áreas não endêmicas, sem histórico da doença e de transfusão sanguínea com idade entre 22 e 32. A média de idade dos controles foi de $29,47 \pm 10,94$ (Tabela 1).

<i>Características</i>	<i>Grupo de Estudo</i>		
	<i>BT</i>	<i>PT</i>	<i>CT</i>
Número	22	12	17
Idade	40,04 (12-76)	39,66 (7-71)	29,47 (23-59)
Razão H/M*	11/11	8/4	7/10
Duração média da doença/Período pós-tratamento	2,59 meses (0,26-5 meses)	6,5 meses (2-21 meses)	-

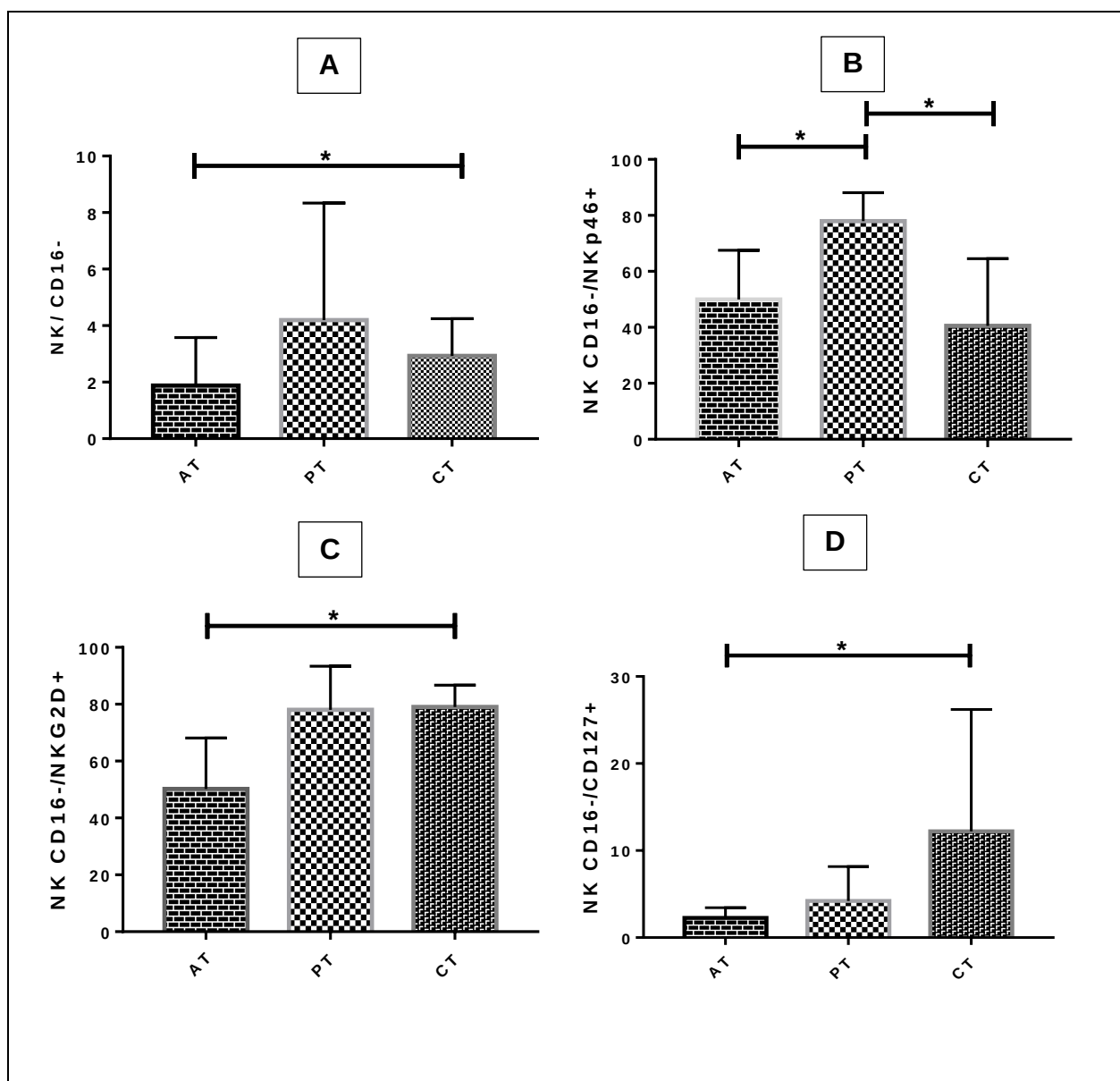
No. médio de lesões/cicatrizes	1,65 (1-5)	10,2 (1-80)	-
Local das lesões/cicatrizes	Face (22,73%)	Face (8,33%)	-
	MMSS (27,28%)	MMSS (41,66%)	
	MMII (54,55%)	MMII (66,66%)	

Avaliação de células Natural Killer CD16- E CD16+CD56+

Ao avaliarmos *ex vivo* o percentual de células NK que não expressam o marcador CD16, observamos um menor percentual destas células em pacientes com lesão ativa, quando comparado com o grupo controle ($p=0,0091$) (FIGURA 1 A). Quando avaliado a expressão de NKp46 por estas células, observamos uma maior expressão por pacientes PT quando comparado aos grupos AT ($p=0,0016$) e CT ($p=0,0003$) (FIGURA 1 B).

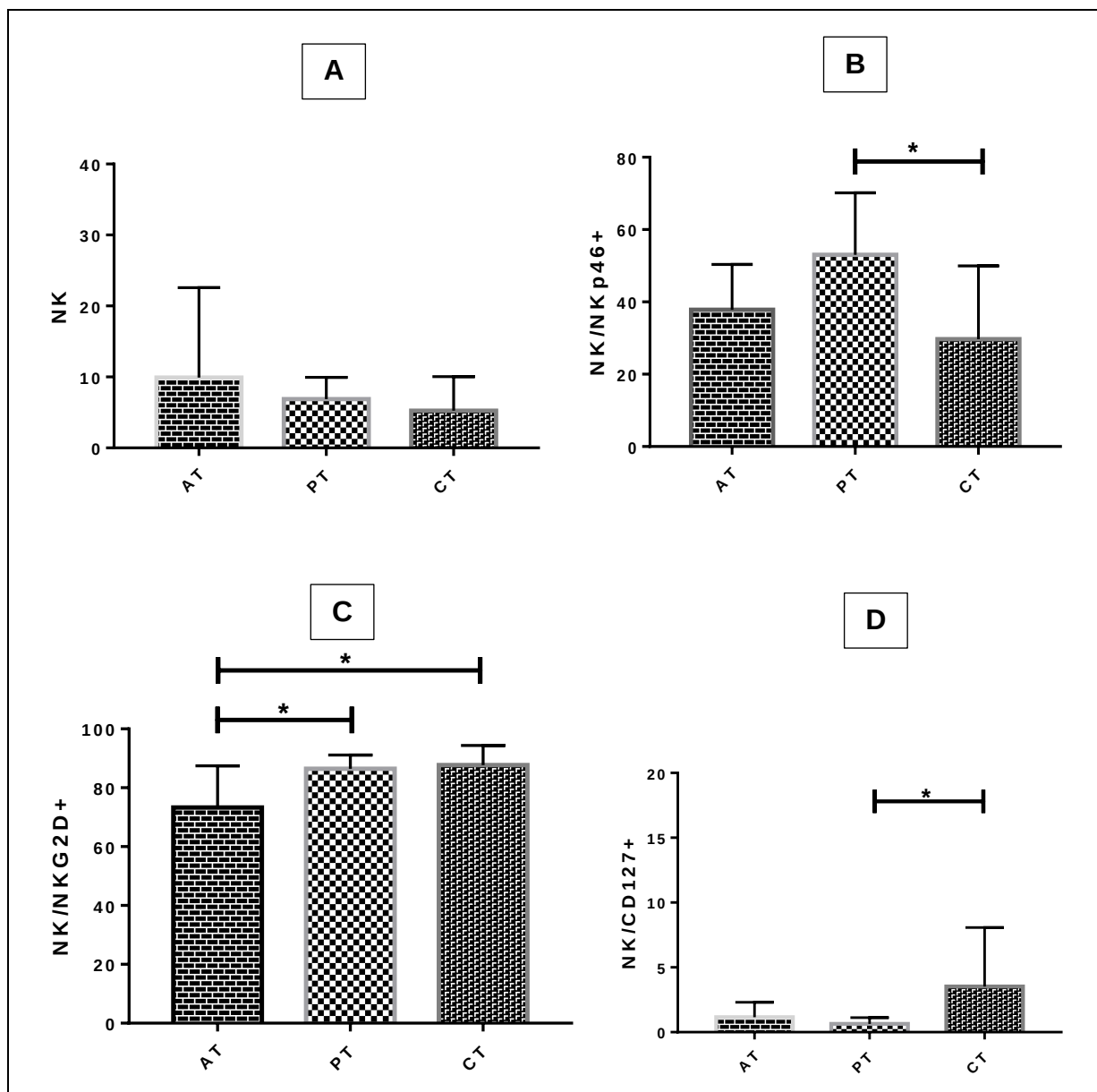
Ao considerar a expressão dos marcadores NKG2D, observamos sua diminuição nos grupos AT, quando comparado com o grupo CT ($p=0,0003$) (FIGURA 1 C). Além disso, observamos uma menor expressão do marcador CD127 nos pacientes AT quando comparado com o grupo controle ($p=0,0115$) (FIGURA 1 D).

Figura 1 - A: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-; B: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-/NKp46+; C: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-/NKG2D+ e D: Percentual *ex vivo* de células NK CD16-/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Já as células NK (CD16+CD56+) não apresentaram diferença estatística entre os grupos estudados (FIGURA 2 A). O marcador NKp46 apresentou uma maior expressão do marcador NKp46 em pacientes pós-tratamento (PT) em relação ao grupo CT ($p=0,0116$) (FIGURA 2 B). Com relação a expressão do marcador NKG2G, observamos uma menor expressão nas células NK de pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0420$) e CT ($p=0,0101$) (FIGURA 2 C). Além disso, também observamos uma menor expressão do marcador CD127 no grupo PT, quando comparado ao grupo CT ($p=0,0222$) (FIGURA 2 D).

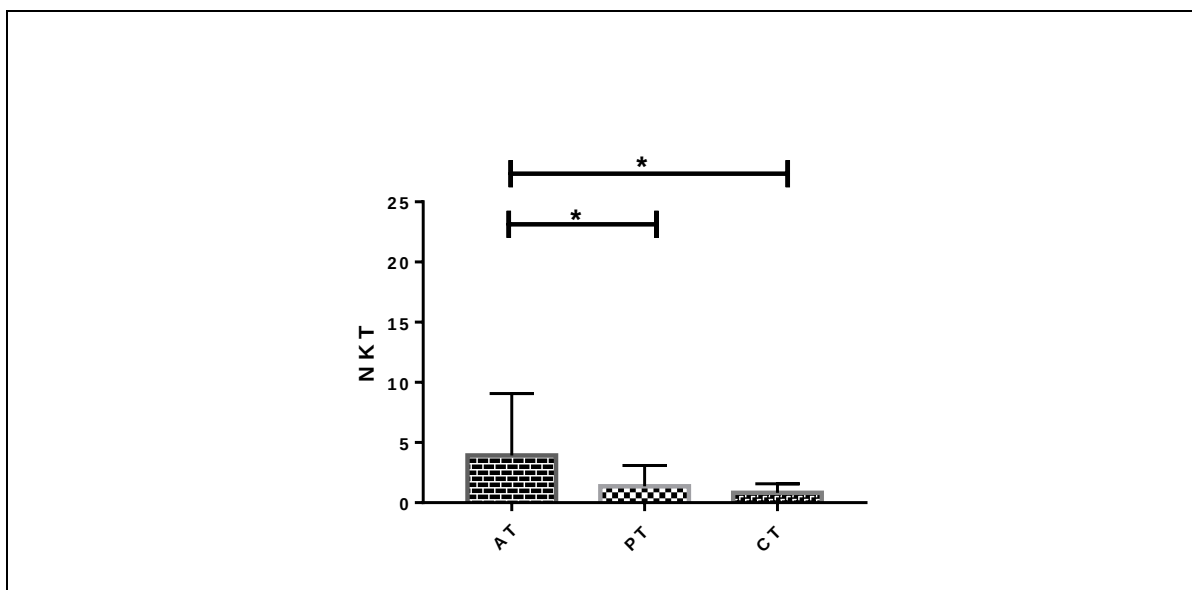
Figura 2 – A: Percentual ex vivo de células NK; B: Percentual ex vivo de células NK/NKp46+; C: Percentual ex vivo de células NK/NKG2D+ e D: Percentual ex vivo de células NK/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Avaliação de células Natural Killer T

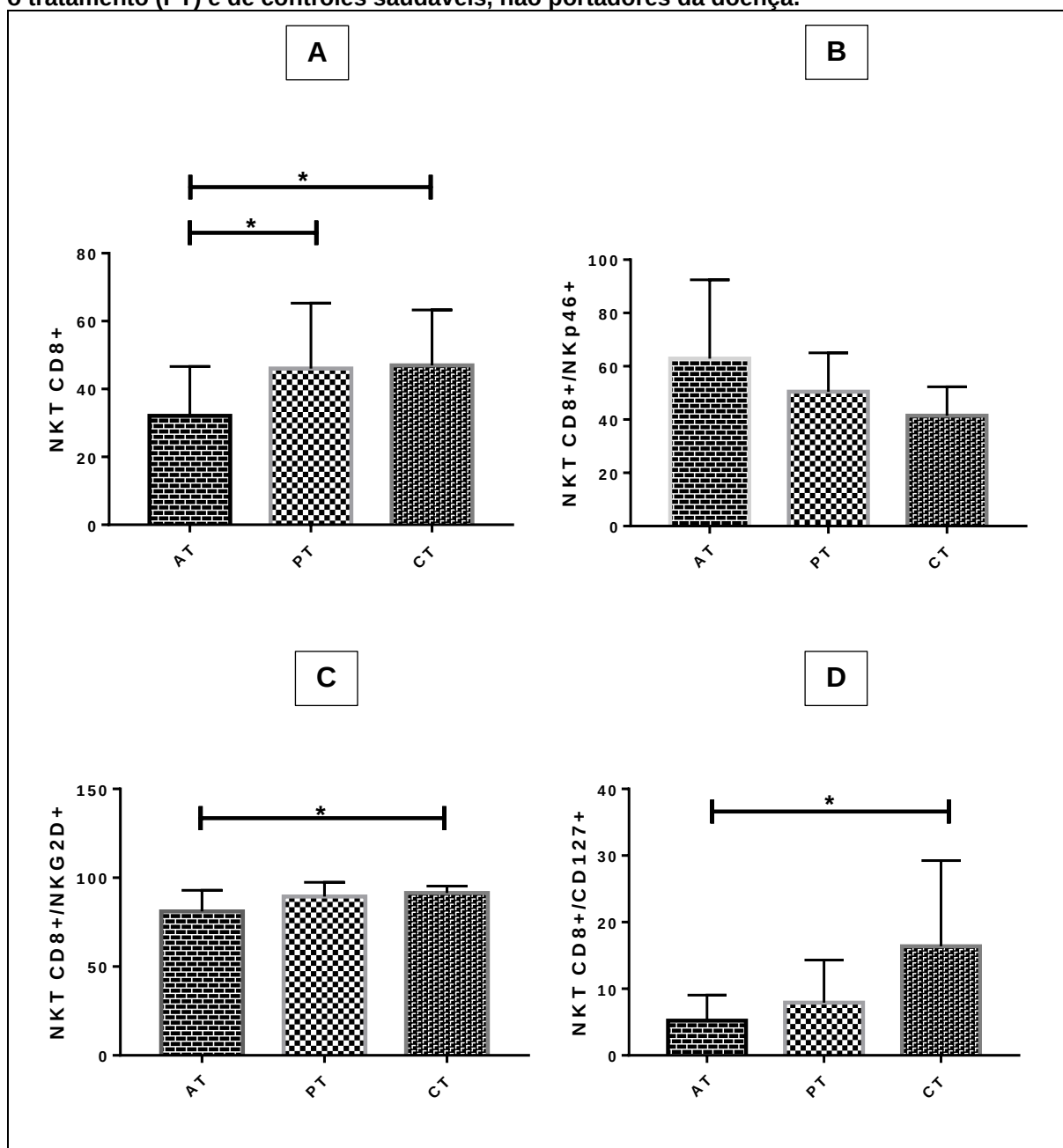
Observamos um aumento estatisticamente significativo de células NKT (CD3+CD16+CD56+) no grupo AT, quando comparado com aos grupos PT ($p=0,0153$) e CT ($p=0,0013$) em *ex vivo* (FIGURA 3 A).

Figura 3 - Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Quando avaliado a expressão do marcador CD8 por parte das células NKT, observamos um menor percentual dessa população no grupo AT em relação ao grupo PT ($p=0,0457$), bem como quando comparado com o grupo controle ($p=0,0197$) (FIGURA 4 A). Quando avaliado a expressão do marcador NKG2D nas células NKT CD8+, observamos uma menor expressão no grupo AT, quando comparado com o grupo CT ($p=0,0101$) (FIGURA 4 C). Da mesma forma, observamos uma menor expressão do marcador CD127 no grupo AT, em relação ao grupo controle ($p=0,0094$) (FIGURA 4 D). Não se observou significância estatística com relação a expressão de Nkp46 por estas células (FIGURA 4 B).

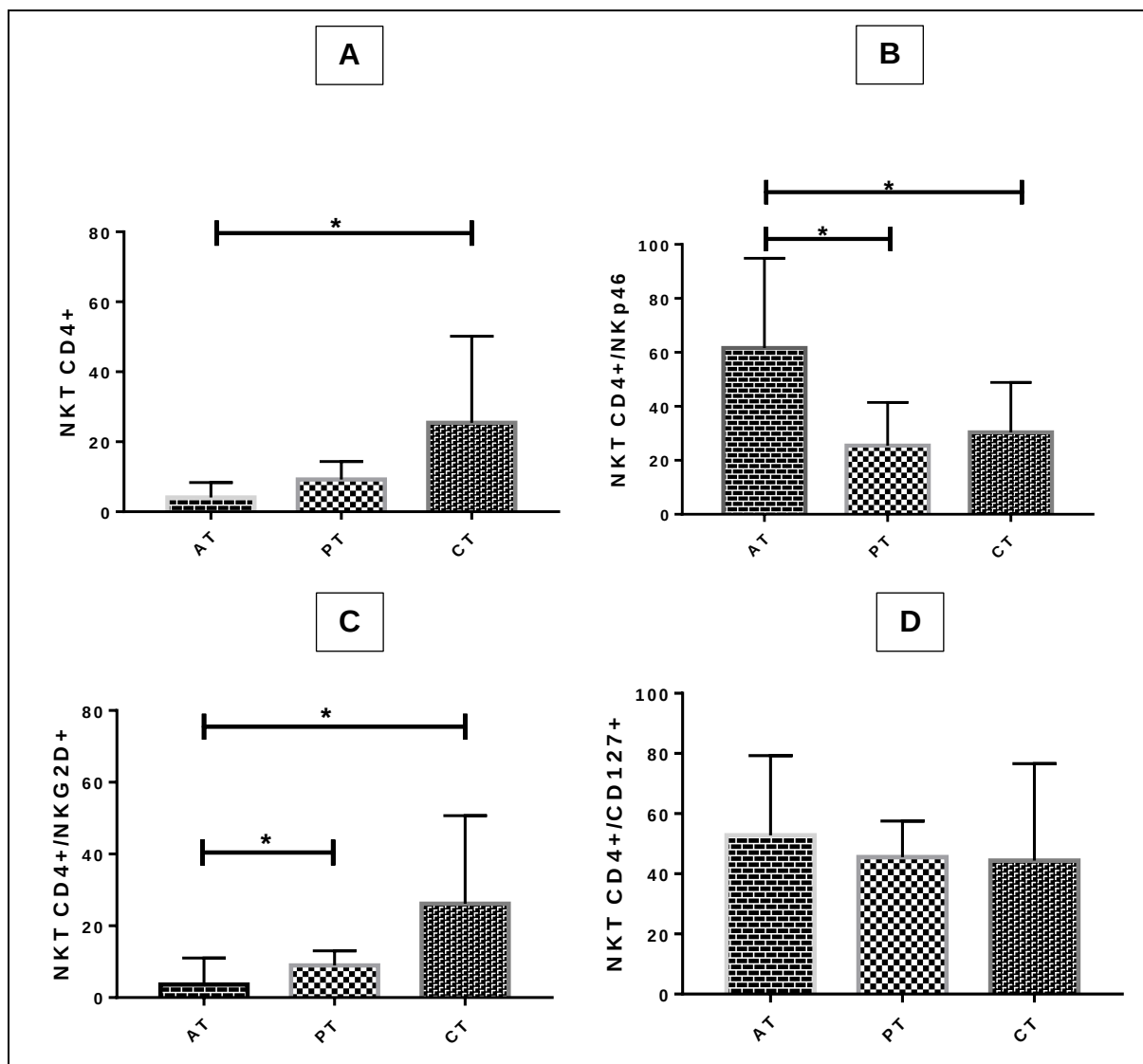
Figura 4 – A: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD8+; B: Percentual de linfócitos NKT CD8+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos NKT CD8+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos NKT CD8+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



Com relação as células NKT que expressão o marcador CD4, observamos um menor percentual destas células em pacientes com lesão ativa (AT), quando comparado ao grupo CT ($p=0,0035$) (FIGURA 5 A). Observamos uma maior expressão do marcador NKp46 em pacientes AT, em relação aos grupos PT ($p=0,0212$) e CT ($p=0,0082$) (FIGURA 5 B). Entretanto, quando avaliado o marcador NKG2D, observamos um baixo percentual deste em pacientes AT, quando comparado aos grupos PT ($p=0,0020$) e CT ($p=0,0001$) (FIGURA 5 C). Não observamos

significância estatística com relação a expressão do marcador CD127 pelos linfócitos NKT CD4+ (FIGURA 5 D).

Figura 5 – A: Percentual *ex vivo* de linfócitos NKT CD4+; B: Percentual de linfócitos NKT CD4+/NKp46+; C: Percentual de linfócitos NKT CD4+/NKG2D+ e D: Percentual de linfócitos NKT CD4+/CD127+ em PBMCs de pacientes portadores de LTA ativa antes do tratamento (AT), após o tratamento (PT) e de controles saudáveis, não portadores da doença.



DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças negligenciadas, ligada principalmente a baixa condições socioeconômica (KEDZIERSKI; EVANS, 2014; SAVOIA, 2015). O registro do número de indivíduos infectados pelo parasito vem aumentando com o passar dos anos, o que pode ser atribuído não apenas aos avanços no diagnóstico e notificação, mas também ao desmatamento, urbanização,

migração e guerras, que provocam modificações ecológicas e consequentemente, mudanças no habitat do vetor (KEVRIC; CAPPEL; KEELING, 2015).

Todos os pacientes incluídos no estudo foram provenientes de áreas endêmicas para a doença. Os vinte e dois pacientes AT foram diagnosticados como portadores de LTA ativa, pois se encaixaram na tríade de diagnóstico clínico-epidemiológico-laboratorial. Os pacientes em sua totalidade apresentaram lesões ulceradas, com bordas elevadas e geralmente em áreas descobertas do corpo, como os membros inferiores e superiores.

Observamos uma predominância de indivíduos do sexo masculino, adultos jovens e com atividades profissionais que estão relacionadas com matas, como por exemplo agricultura e carreira militar. Isso explica também o grande percentual de lesões em áreas descobertas do corpo, como membros superiores e inferiores. No Brasil, a LTA acomete ambos os sexos e em todas as faixas etárias, predominando em pacientes acima dos 10 anos de idade e no sexo masculino (BRASIL, 2017a).

A LTA exibe uma patogênese aspectos clínicos, que podem variar de lesões localizadas a múltiplas lesões espalhadas pelo corpo, e que está estritamente relacionada com as respostas imunes inata e adaptativa do hospedeiro, bem como com outros fatores como nutricionais e genética (BRELAZ-DE-CASTRO et al., 2012; BRELAZ et al., 2012; REIS et al., 2009). Entretanto, mesmo com os avanços das pesquisas na área da imunologia, ainda se tem muitas lacunas a serem preenchidas, visando um melhor entendimento dos aspectos imunológicos.

As células NK são conhecidas fenotipicamente pela ausência do marcador CD3 e pela expressão dos marcadores CD16 e CD56. Entretanto, outros marcadores podem ser observados nestas células como os marcadores CD127, NKG2D e NKp46. Estes marcadores auxiliam na avaliação da expansão dos linfócitos, ativação de células NK e atividade citotóxica, respectivamente (DUNHAM et al., 2008; HADAD et al., 2015; LANIER, 2015; OBEIDY; SHARLAND, 2009; SHIMASAKI; JAIN; CAMPANA, 2020; SIVORI et al., 1999). Estas células fazem parte da resposta imune inata, atuando induzindo a apoptose de células infectadas por meio da sua ação citotóxica (SMYTH et al., 2005; TOPHAM; HEWITT, 2009).

Em nosso estudo, observamos *ex vivo* que os pacientes com lesão ativa (AT) tendem a ter um aumento do percentual de células NK, embora não foi observado

significância estatística. Além disso, observamos que estes mesmos pacientes apresentam um menor percentual de células NK CD16-. O mesmo foi observado por Cunha (2013) em seu estudo, que observou altos níveis de células NK (CD16+56+) em pacientes com leishmaniose tegumentar antes, durante e após o tratamento (CUNHA, 2013). Entretanto, Lieke e colaboradores (2008, 2011) observaram uma diminuição da proliferação destas células em modelos usando *L. (L.) major* e *L. (L.) aeothipica*, uma vez que a forma promastigota da *Leishmania* inibi sua proliferação (LIEKE et al., 2008, 2011). Talvez nosso resultado diferente seja devido a outra espécie de *Leishmania* que circula na nossa região. Nessas células NK, observamos ainda uma diminuição significativa da expressão do marcador NKG2D pelos pacientes AT. Sugerindo assim que, neste grupo, as células NK encontravam pouco ativadas, ou ainda, sugerindo que as células mais ativadas estejam no sitio de infecção. Este marcador, juntamente com o NKp46, podem estimular a atividade citotóxica das células NK, mesmo que em repouso (BRYCESON et al., 2006). Além disso, observamos uma menor expressão do marcador CD127, porém ao realizar cultura com antígeno de *Leishmania*, observamos um aumento da expressão desse marcador. Concluindo-se que, nos pacientes que AT, há uma tendência de expansão das células NK, entretanto, com o estímulo estas células tendem a ter uma alta ativação e, por conseguinte, atuar no combate a infecção.

Nos pacientes PT, as células NK apresentaram uma maior expressão do marcador NKG2D, mostrando dessa forma, que nesse grupo, têm-se células NK mais ativadas. Esta maior ativação pode estar relacionada com o controle da infecção, uma vez que estes pacientes já haviam finalizado o esquema terapêutico e apresentavam lesões cicatrizadas. Além disso, observamos uma maior expressão do marcador NKp46 nesta população celular. Um estudo realizado por Garcia-Iglesias e colaboradores (2009) observou que a baixa expressão de NKp30, NKp46 e NKG2D, estavam associados com a diminuição da atividade citotóxica das células NK, e consequentemente, relacionado com o câncer cervical e o surgimento de lesões precursoras (GARCIA-IGLESIAS et al., 2009). Dessa forma, nossos dados sugerem que após a cura clínica os pacientes apresentam células NK efetivamente ativadas, entretanto, com baixo potencial citotóxico, sugerindo assim, que as células após o fim da infecção ficam em estado de vigilância, o que é importante para o paciente. Além do mais, em nosso estudo, as células NK CD16- apresentaram uma diminuição do

seu percentual em pacientes que já haviam obtido cura clínica, entretanto, estas células continuavam com alta ativação, estando estas células então, provavelmente atuando na produção de citocinas. Também se nota que estas células possuem baixa ação citotóxica nos pacientes com lesão ativa. Com relação as células NK CD16+, parecem possuir uma baixa atividade citotóxica em pacientes com lesão ativa, além de apresentarem função efetora.

Cerca de 5% das células NK, expressão em sua superfície marcadores correspondentes a linfócitos T (CD3+), dessa forma, estas células passam a se comportar como células NKT. Entretanto, ainda é bastante escassos estudos com essas células na LTA. Em nosso estudo, observamos um aumento do número destas células em pacientes com lesão ativa (AT), quando comparado com o grupo pós-tratamento (PT) e saudável (CT), no entanto sem diferença estatística. Estudos observaram grandes percentuais dessas células em infecções por *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum* (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA et al., 2002; VITELLI-AVELAR et al., 2006), sugerindo assim, que estas células possam ser cruciais para o combate da infecção. Mais estudos são necessários para uma maior compreensão do seu papel na LTA.

Quando avaliado as subpopulações das células NKT *ex vivo*, observamos que pacientes com lesão ativa apresentam um menor percentual tanto de células NKT CD8 quanto de NKT CD4+. Estudos tem observado que essas subpopulações apresentam funções distintas. Enquanto que as células NKT CD4+ são fortes e potentes produtoras de citocinas como IL-2, IL-4 e IL-13, as células NKT CD8+ atuam de forma mais agressiva no combate a infecção, através da sua atuação citotóxica (GUMPERZ et al., 2002; MONTOYA et al., 2007; O'REILLY et al., 2011). Estudos realizados por Gumperz e colaboradores (2002) e por Carvalho e colaboradores (2010) observaram altos níveis de células NKT CD8+ em indivíduos saudáveis, corroborando dessa forma, com nossos achados (CARVALHO et al., 2010; GUMPERZ et al., 2002).

REFERÊNCIAS

AL-QADHI, B. N.; MUSA, I. S.; AL-MULLA HUMMADI, Y. M. K. Comparative immune study on cutaneous leishmaniasis patients with single and multiple sores. **Journal of Parasitic Diseases**, v. 39, n. 3, p. 361–370, 2015.

ALLEZ, M. et al. CD4+NKG2D+ T Cells in Crohn's Disease Mediate Inflammatory and Cytotoxic Responses Through MICA Interactions. **Gastroenterology**, v. 132, n. 7, p. 2346–2358, 2007.

ANVERSA, L. et al. Human leishmaniasis in Brazil: A general review laís. **Rev assoc med BRas**, v. 64, n. 3, p. 281–289, 2018.

APPAY, V. et al. Characterization of CD4(+) CTLs ex vivo. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 168, n. 11, p. 5954–8, 2002.

APPAY, V. The physiological role of cytotoxic CD4+ T-cells: the holy grail? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 138, n. 1, p. 10–13, 2004.

ARANHA, F. C. S. et al. Interleukin-2-activated natural killer cells may have a direct role in the control of Leishmania (Leishmania) amazonensis promastigote and macrophage infection. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 62, n. 4, p. 334–341, 2005.

ASLAN, N. et al. CYTOTOXIC CD4+ T CELLS IN VIRAL HEPATITIS. **J Viral Hepat**, v. 13, p. 505–514, 2006.

BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 Production among Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–78, 2009.

BARATTA-MASINI, A. et al. Mixed cytokine profile during active cutaneous leishmaniasis and in natural resistance. **Frontiers in Bioscience**, v. 12, n. 3, p. 839–849, 2007.

BASANO, S. D. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol.**, v. 7, p. 328–337, 2004.

BELLO, N. R. **Estudo clínico e epidemiológico da leishmaniose tegumentar americana no departamento de pando, região de fronteira entre o Brasil e a Bolívia.** [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The Biology of NKT Cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, n. 1, p. 297–336, 2007.

BENSOUSSAN, E. et al. Comparison of PCR assays for diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 4, p. 1435–1439, 2006.

BENTES, A. A. et al. Leishmaniose americana cutânea: diagnóstico desafiador na prática pediátrica. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 25, n. Supl 6, p. 83–87, 2015.

BETTELLI, E. et al. Induction and effector functions of TH17 cells. **Nature**, v. 453, n. 7198, p. 1051–1057, 2008.

BIHL, F. et al. Primed Antigen-Specific CD4 + T Cells Are Required for NK Cell Activation In Vivo upon Leishmania major Infection. **The Journal of Immunology**, p. 2174–2181, 2010.

BOETTLER, T. et al. Expression of the Interleukin-7 Receptor Alpha Chain (CD127) on Virus-Specific CD8 α T Cells Identifies Functionally and Phenotypically Defined Memory T Cells during Acute Resolving Hepatitis B Virus Infection. **JOURNAL OF VIROLOGY**, v. 80, p. 3532–3540, 2006.

BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 1–9, 2012.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017a.

BRASIL. **Guia de Vigilância em Saúde**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017b.

BRELAZ-DE-CASTRO, M. C. A. et al. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions before and after clinical cure. **Cellular Immunology**, v. 279, n. 2, p. 180–186, 2012.

BRELAZ, M. C. A. et al. Leishmania (Viannia) braziliensis antigenic fractions: the immune response characterization of patients at the initial phase of disease. **Parasite Immunology**, v. 34, p. 236–239, 2012.

BRITO, F. F. DE et al. Estudo Clínico , Epidemiológico E Imunológico Para Leishmaniose Tegumentar Americana Em Centro. **Hensenologia Internationalis**, v. 40, n. 1, p. 17–24, 2015.

BRYCESON, Y. T. et al. Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. **Blood**, v. 107, p. 159–166, 2006.

CAMPBELL, K. S.; HASEGAWA, J. Natural killer cell biology: An update and future directions. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 132, n. 3, p. 536–544, 2013.

CAMPOS-MARTÍN, Y. et al. Immature Human Dendritic Cells Infected with *Leishmania infantum* Are Resistant to NK-Mediated Cytolysis but Are Efficiently Recognized by NKT Cells. **The Journal of Immunology**, v. 176, p. :6172-6179, 2006.

CAMPOS, T. M. et al. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 11, p. 733–740, 2017.

CAMPOS, T. M. et al. Granzyme B Produced by Natural Killer Cells Enhances Inflammatory Response and Contributes to the Immunopathology of Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, p. 1–10, 2019.

CAPRARU, D. et al. Expansion of circulating NKG2D+ effector memory T-cells and expression of NKG2D-ligand MIC in granulomaous lesions in Wegener's granulomatosis. **Clinical Immunology**, v. 127, n. 2, p. 144–150, 2008.

CARVALHO, K. I. et al. Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID). **PLoS ONE**, v. 5, n. 9, p. 1–8, 2010.

CARVALHO, L. P. et al. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. OCT, p. 1–9, 2012.

CARVALHO, S. H. et al. American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 00, n. 00, p. 1–12, 2019.

CASTELLANO, L. R. et al. Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.

CHUN, F. Z. et al. Cytotoxic CD4⁺ T cells use granulysin to kill *Cryptococcus neoformans*, and activation of this pathway is defective in HIV patients. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2049–2057, 2007.

CICHOCKI, F.; SITNICKA, E.; BRYCESON, Y. T. NK cell development and function - Plasticity and redundancy unleashed. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 2, p. 114–126, 2014.

CLARÊNCIO, J. et al. Could the lower frequency of CD8⁺ CD18⁺ CD45RO⁺ lymphocytes be biomarkers of human VL ? **International Immunology**, v. 21, p. 137–144, 2008.

COOPER, M. A.; FEHNIGER, T. A.; CALIGIURI, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. **TRENDS in Immunology**, v. 22, p. 633–640, 2001.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS**, v. 19, p. 111–126, 2006.

CROME, S. Q. et al. Natural killer cells regulate diverse T cell responses. **Trends in Immunology**, v. 34, n. 7, p. 342–349, 2013.

CROSBY, E. J. et al. Engagement of NKG2D on Bystander Memory CD8 T Cells Promotes Increased Immunopathology following *Leishmania major* Infection. **PLoS Pathogens**, v. 10, p. 1–14, 2014.

CROUSE, J. et al. NK cells regulating T cell responses: Mechanisms and outcome. **Trends in Immunology**, v. 36, n. 1, p. 49–58, 2015.

CUNHA, C. F. **Avaliação da Citotoxicidade na Evolução para a Cura Clínica da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [s.l.] Instituto Oswaldo Cruz, 2013.

CUNHA, C. F. et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: Assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 4, p. 244–254, 2016.

DANTAS-TORRES, F. et al. Sand fly population dynamics and cutaneous leishmaniasis among soldiers in an Atlantic forest remnant in northeastern Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 2, p. 1–14, 2017.

DE BRITO, M. E. F. et al. Leishmaniose cutânea no nordeste do Brasil: Uma

avaliação crítica dos estudos realizados no estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, n. 4, p. 425–429, 2012.

DE OLIVEIRA, A. P. et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1–2, p. 245–253, 2013.

DE PAIVA-CAVALCANTI, M. et al. Leishmaniasis diagnosis: An update on the use of immunological and molecular tools. **Cell and Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 1–10, 2015.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous leishmaniasis: recent developments in diagnosis and management. **American journal of clinical dermatology**, v. 16, n. 2, p. 99–109, 2015.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–18, 2004.

DUNHAM, R. M. et al. CD127 and CD25 Expression Defines CD4⁺ T Cell Subsets That Are Differentially Depleted during HIV Infection. **J Immunol**, v. 180, p. 5582–5592, 2008.

DUTHIE, M. S. et al. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 134–141, 2012.

EXLEY, M. A.; KOZIEL, M. J. To be or not to be NKT: Natural killer T cells in the liver. **Hepatology**, v. 40, n. 5, p. 1033–1040, 2004.

FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8⁺ T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–439, 2009.

FERRAZ, R. et al. CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–12, 2017.

FRY, T. J.; MACKALL, C. L. Interleukin-7 : from bench to clinic. **Blood**, v. 99, p.

3892–3905, 2002.

GARCIA-IGLESIAS, T. et al. Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. **BMC Cancer**, v. 9, p. 1–8, 2009.

GEIGER, T. L.; SUN, J. C. Development and maturation of natural killer cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 39, p. 82–89, 2016.

GODFREY, D. I. et al. NKT cells: Facts, functions and fallacies. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 573–583, 2000.

GOMES, C. M. et al. Complementary exams in the diagnosis of American tegumentary leishmaniasis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 5, p. 701–709, 2014.

GONÇALVES, N. V. et al. Cutaneous leishmaniasis : Spatial distribution and environmental risk factors in the state of Pará , Brazilian Eastern Amazon. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 13, 2019.

GONTIJO, B.; DE CARVALHO, M. DE L. R. Leishmaniose tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 1, p. 71–80, 2003.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. et al. alpha -Galactosylceramide-activated Valpha 14 natural killer T cells mediate protection against murine malaria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 15, p. 8461–8466, 2002.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v. 8, p. 419–433, 2010.

GROH, V. et al. Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 16, p. 9452–9457, 2003.

GUMPERZ, J. E. et al. Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining. **Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 5, p. 625–636, 2002.

- GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**, v. 34, p. 433–444, 2004.
- HADAD, U. et al. NKp46 clusters at the immune synapse and regulates NK cell polarization. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. SEP, p. 1–11, 2015.
- HAMMOND, K. et al. Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells. **International Immunology**, v. 10, n. 10, p. 1491–1499, 1998.
- HUSTER, K. M. et al. Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8+ memory T cell subsets. **PNAS**, v. 101, p. 5610–5615, 2004.
- JOBIM, M.; JOBIM, L. F. J. Natural killer cells and immune surveillance. **Jornal de Pediatria**, v. 84, n. 7, p. 58–67, 2009.
- KEDZIERSKI, L.; EVANS, K. J. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 141, n. 12, p. 1544–1562, 2014.
- KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, 2015.
- KIMA, P. E.; SOONG, L. Interferon gamma in leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 4, p. 1–5, 2013.
- LANIER, L. L. NKG2D receptor and its ligands in host defense. **Cancer Immunol Res.**, v. 3, p. 575–582, 2015.
- LIEKE, T. et al. *Leishmania* surface protein gp63 binds directly to human natural killer cells and inhibits proliferation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 153, n. 2, p. 221–230, 2008.
- LIEKE, T. et al. 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**, v. 138, n. 14, p. 1898–1909, 2011.
- LIU, W. et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive

function of human CD4 + T reg cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 203, p. 1701–1711, 2006.

LOPEZ-VERGÉS, S. et al. CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56 dim CD16² NK-cell subset. **Blood**, v. 116, n. 19, p. 3865–3875, 2016.

LUCA, P. M. DE; MACEDO, A. B. B. Cutaneous Leishmaniasis vaccination : A Matter of Quality. **Frontiers in Immunology**, v. 7, p. 1–8, 2016.

MACHADO, P. R. et al. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: In situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 8, p. 438–444, 2011.

MANDAL, A.; VISWANATHAN, C. Natural killer cells: In health and disease. **Hematol Oncol Stem Cell Ther**, v. 8, n. 2, p. 47–55, 2015.

MENDES, A. P. O. et al. American tegumentary leishmaniasis diagnosis using L. (V.) braziliensis fixed promastigotes: a comparative performance of serological tests and spontaneous cure identification. **BMC infectious diseases**, v. 19, n. 1, p. 1015, 2019.

MONTALDO, E. et al. Development of human natural killer cells and other innate lymphoid cells. **Seminars in Immunology**, v. 26, n. 2, p. 107–113, 2014.

MONTOYA, C. J. et al. Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11. **Immunology**, v. 122, n. 1, p. 1–14, 2007.

MROZEK, B. E.; ANDERSON, P.; CALIGIURI, M. A. Role of Interleukin-15 in the Development of Human CD56⁺ Natural Killer Cells From CD34⁺ Hematopoietic Progenitor Cells. **Blood**, v. 87, n. 7, p. 2632–2640, 1996.

NAGARAJAN, N. A.; KRONENBERG, M. Invariant NKT Cells Amplify the Innate Immune Response to Lipopolysaccharide. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 5, p. 2706–2713, 2007.

NAMEKAWA, T. et al. Functional subsets of CD4 T cells in rheumatoid synovitis. **Arthritis and Rheumatism**, v. 41, n. 12, p. 2108–2116, 1998.

NARNI-MANCINELLI, E.; VIVIER, E. NK Cell Genesis: A Trick of the Trail.

Immunity, v. 36, n. 1, p. 1–3, 2012.

NASCIMENTO, M. S. L. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **The Journal of infectious diseases**, v. 211, p. 1015–1026, 2014.

NYLÉN, S.; AKUFFO, H. Tracing immunity to human leishmaniasis. **Future Microbiology**, v. 4, n. 2, p. 241–254, 2009.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 12, p. 551–561, 2012.

O'REILLY, V. et al. Distinct and overlapping effector functions of expanded human CD4⁺, CD8 α ⁺ and CD4⁺CD8 α ⁺ invariant natural killer T cells. **PLoS ONE**, v. 6, n. 12, p. 2–12, 2011.

OBEIDY, P.; SHARLAND, A. F. NKG2D and its ligands. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 41, p. 2364–2367, 2009.

OLIVEIRA, B. et al. American Tegumentary Leishmaniasis and Flow Cytometry: A Review. **Journal of Medical Microbiology & Diagnosis**, v. 05, n. 01, p. 1–5, 2016.

OLIVEIRA, A. P. DE et al. Comparison of flow cytometry and indirect immunofluorescence assay in the diagnosis and cure criterion after therapy of American tegumentary leishmaniasis by anti-live *Leishmania (Viannia) braziliensis* immunoglobulin G. **Journal of Immunological Methods**, v. 387, n. 1–2, p. 245–253, 2013.

OLIVEIRA, W. N. et al. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2014.

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. **Manual de procedimientos para vigilancia y control de las leishmaniasis en las Américas**. 1. ed. Washington: [s.n.].

PAPAMICHAIL, M. et al. Natural killer lymphocytes : biology , development , and function. **Cancer Immunol Immunother**, v. 53, p. 176–186, 2004.

PEREIRA, A. M. DE S. et al. O uso da citometria de fluxo como critério de cura e aplicabilidade diagnóstica na leishmaniose tegumentar americana (LTA). **Brazilian Journal of health Review**, v. 2, p. 203–213, 2019.

PIETRZAKI CERUTTI, P. H. et al. Métodos diagnósticos da leishmaniose tegumentar americana: uma revisão de literatura. **Revista de Patologia do Tocantins**, v. 4, n. 4, p. 55, 2017.

PIPKIN, M. E.; LIEBERMAN, J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. **Current Opinion in Immunology**, v. 19, n. 3, p. 301–308, 2007.

PISCOPO, T. V; MALLIA, A. C. Leishmaniasis. **Postgrad Med J**, v. 82, p. 649–657, 2006.

PITTA, M. G. R. et al. IL-17 and IL-22 are associated with protection against human kala azar caused by *Leishmania donovani*. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 8, p. 2379–2387, 2009.

PORAKISHVILI, N. et al. Expansion of CD4⁺ T cells with a cytotoxic phenotype in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia (B-CLL). **Clinical and Experimental Immunology**, v. 126, n. 1, p. 29–36, 2001.

PORAKISHVILI, N. et al. Cytotoxic CD4⁺ T cells in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia kill via a perforin-mediated pathway. **Haematologica**, v. 89, n. 4, p. 435–443, 2004.

QIAN, X. et al. NK1.1⁺ CD4⁺ NKG2D⁺ T cells suppress DSS-induced colitis in mice through production of TGF- β . **J. Cell. Mol. Med.**, v. 21, p. 1431–1444, 2017.

QUEZADA, S. A. et al. Tumor-reactive CD4⁺ T cells develop cytotoxic activity and eradicate large established melanoma after transfer into lymphopenic hosts . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 3, p. 637–650, 2010.

RAMACHANDRAN, H. et al. Optimal Thawing of Cryopreserved Peripheral Blood Mononuclear Cells for Use in High-Throughput Human Immune Monitoring Studies. **Cells**, v. 1, n. 3, p. 313–324, 2012.

RAPHAEL, I. et al. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. **Cytokine**, v. 74, p. 5–17, 2015.

REIS, L. C. et al. Cellular immune response profile in patients with american tegumentary leishmaniasis prior and post chemotherapy treatment. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 23, p. 63–69, 2009.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, p. 581–596, 2007.

RITTER, U. et al. The control of Leishmania (Leishmania) major by TNF in vivo is dependent on the parasite strain. **Microbes and Infection**, v. 6, n. 6, p. 559–565, 2004.

RODRIGUES, M. G. DE A. et al. The role of deforestation on American cutaneous leishmaniasis incidence: spatial-temporal distribution, environmental and socioeconomic factors associated in the Brazilian Amazon. **Tropical Medicine and International Health**, v. 24, n. 3, p. 348–355, 2019.

ROUQUAYROL, M. Z.; GURGEL, M. **Epidemiologia & Saúde**. 7. ed. Rio de Janeiro: Medbook, 2013.

RUCK, T. et al. CD4 + NKG2D + T Cells Exhibit Enhanced Migratory and Encephalitogenic Properties in Neuroinflammation. v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

RUIZ, J. H.; BECKER, I. CD8 cytotoxic T cells in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 29, n. 12, p. 671–678, 2007.

SÁEZ-BORDERÍAS, A. et al. Expression and function of NKG2D in CD4 + T cells specific for human cytomegalovirus. **Eur. J. Immunol**, p. 3198–3206, 2006.

SANTOS-MATEUS, D. et al. The Battle between Leishmania and the Host Immune System at a Glance. **International Trends in Immunity**, p. 28–34, 2015.

SANTOS, C. D. S. et al. CD8+ granzyme B+ -mediated tissue injury vs. CD4 + IFN γ + -mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, p. 1533–1540, 2013.

SAVOIA, D. Recent updates and perspectives on leishmaniasis. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 6, p. 588–596, 2015.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis : immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 581–592,

2016.

SHIMASAKI, N.; JAIN, A.; CAMPANA, D. NK cells for cancer immunotherapy. **Nature reviews. Drug discovery**, 2020.

SIVORI, S. et al. NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. **European Journal of Immunology**, v. 29, n. 5, p. 1656–1666, 1999.

SLAUENWHITE, D.; JOHNSTON, B. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. MAY, 2015.

SMYTH, M. J. et al. Activation of NK cell cytotoxicity. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 4 SPEC. ISS., p. 501–510, 2005.

SOONG, L.; HENARD, C. A.; MELBY, P. C. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol**, v. 34, p. 735–751, 2012.

SPEAR, P. et al. NKG2D ligands as therapeutic targets. **Cancer Immunity**, v. 13, p. 1–14, 2013.

SRIVASTAVA, P. et al. Diagnosis of visceral leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 105, n. 1, p. 1–6, 2011.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of Leishmania: How to Teach Using Animations. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, p. e1003594, 2013.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, 2011.

TOPHAM, N. J.; HEWITT, E. W. Natural killer cell cytotoxicity: How do they pull the trigger? **Immunology**, v. 128, n. 1, p. 7–15, 2009.

TRAPANI, J. A.; SMYTH, M. J. FUNCTIONAL SIGNIFICANCE OF THE PERFORIN / GRANZYME CELL DEATH PATHWAY. **IMMUNOLOGY**, v. 2, n. October, p. 735–747, 2002.

VAN DE BERG, P. J. et al. Cytotoxic human CD4+ T cells. **Current Opinion in Immunology**, v. 20, n. 3, p. 339–343, 2008.

- VAN LEEUWEN, E. M. M. et al. Emergence of a CD4+CD28- granzyme B+, cytomegalovirus-specific T cell subset after recovery of primary cytomegalovirus infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 173, n. 3, p. 1834–41, 2004.
- VEGA-LÓPEZ, F. Diagnosis of cutaneous leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 16, n. 2, p. 97–101, 2003.
- VERNERIS, M. R. et al. Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded. **bLOOD**, v. 103, p. 3065–3073, 2016.
- VIGIL, M. D. E. **Manual de vigilância da**. [s.l: s.n.].
- VITELLI-AVELAR, D. M. et al. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25^{high} T cells balancing activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clinical and Experimental Immunology**, v. 145, n. 1, p. 81–92, 2006.
- VIVIER, E. et al. Functions of natural killer cells. **Nature Immunology**, v. 9, n. 5, p. 503–510, 2008.
- VIVIER, E. et al. Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. **Science**, v. 331, n. 6013, p. 44–49, 2011.
- VOKURKOVÁ, D. et al. Radiosensitivity of CD3-CD8+CD56+ NK cells. **Radiation Measurements**, v. 45, n. 9, p. 1020–1023, 2010.
- WILLIAMS, N. S. et al. Natural killer cell differentiation: Insights from knockout and transgenic mouse models and in vitro systems. **Immunological Reviews**, v. 165, p. 47–61, 1998.
- WU, Y.; TIAN, Z.; WEI, H. Developmental and functional control of natural killer cells by cytokines. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. AUG, 2017.
- XIE, Y. et al. Naive tumor-specific CD4 + T cells differentiated in vivo eradicate established melanoma . **The Journal of Experimental Medicine**, v. 207, n. 3, p. 651–667, 2010.
- YANG, D. et al. NKG2D + CD4 + T Cells Kill Regulatory T Cells in a NKG2D-NKG2D Ligand- Dependent Manner in Systemic Lupus Erythematosus. **Scientific Reports**,

v. 7, n. 1, p. 1–13, 2017.

YASUKAWA, M. et al. Granule exocytosis, and not the fas/fas ligand system, is the main pathway of cytotoxicity mediated by alloantigen-specific CD4(+) as well as CD8(+) cytotoxic T lymphocytes in humans. **Blood**, v. 95, n. 7, p. 2352–5, 2000.

ZAJONC, D. M.; GIRARDI, E. Recognition of microbial glycolipids by Natural Killer T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. JUL, p. 1–11, 2015.

ZAMORA-CHIMAL, J. et al. NKT cell activation by *Leishmania mexicana* LPG: Description of a novel pathway. **Immunobiology**, v. 222, n. 2, p. 454–462, 2017.

ZAMORA-CHIMAL, J.; HERNÁNDEZ-RUIZ, J.; BECKER, I. NKT cells in leishmaniasis. **Immunobiology**, v. 222, n. 4, p. 641–646, 2017.

ZAUNDERS, J. J. et al. Identification of circulating antigen-specific CD4+ T lymphocytes with a CCR5+, cytotoxic phenotype in an HIV-1 long-term nonprogressor and in CMV infection. **Blood**, v. 103, n. 6, p. 2238–2247, 2004.

ZHANG, C.; TIAN, Z. NK cell subsets in autoimmune diseases. **Journal of Autoimmunity**, v. 83, p. 22–30, 2017.

APÊNDICE F – ARTIGO 2

(Submetido a Memórias do Instituto Oswaldo Cruz)

INDIVIDUALS LIVING IN ENDEMIC REGION FOR *Leishmania braziliensis* HAVE LOW LEVELS OF CD45RO ON T CELL

Marton Kaique de Andrade Cavalcante^{1,2,3*}, Rafael de Freitas e Silva⁴, Maria Edileuza Felinto de Brito³, Vitorina Nerivânia Covello Rehn², Valéria Rêgo Alves Pereira^{1,3}, Maria Carolina Accioly Brelaz-de-Castro^{1,2,3}

- 1- Postgraduate Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, PE, Brazil.
- 2- Laboratory of Parasitology, Academic Center of Vitória, Federal University of - Pernambuco (CAV-UFPE), Vitoria de Santo Antão, PE, Brazil.
- 3- Department of Immunology, Aggeu Magalhães Institute (IAM / FIOCRUZ), Recife, PE, Brazil.
- 4- Department of Natural Sciences, University of Pernambuco (UPE), Garanhuns, PE, Brazil.

Correspondence address: Laboratory of Parasitology, Academic Center of Vitória - Federal University of Pernambuco (CAV-UFPE). Rua do Alto do Reservoir s/n, Bela Vista. CEP: 55608-680. Vitória de Santo Antão/PE Brazil. E-mail: m.kaiquecavalcante@hotmail.com

ABSTRACT: We evaluated CD4⁺, CD8⁺, double-positive (DP) and double-negative (DN) T cells and their expression of CD45RO in American Cutaneous Leishmaniasis patients, divided into three groups: before treatment (BT), posttreatment (PT) and subclinical (SC). CD4⁺ T cells had a higher percentage in PT and SC groups when compared to the control group (CT). CD4⁺ T cells presented a greater expression of CD45RO in BT and PT groups compared to the SC group, that had a lower expression

compared with the CT. CD8⁺ T lymphocytes had a higher percentage in BT when compared with CT and a greater expression of CD45RO when compared to PT, SC and CT groups. We did not observe any statistical significance in the percentage of the DP and DN lymphocytes, however, we noticed that the DP lymphocytes presented a lower expression of CD45RO in the SC group when compared to the CT group, whereas, the DN lymphocytes showed a greater expression of CD45RO in the BT group when compared with the other groups. CD4⁺ T cells appear to be protective in these patients and CD8⁺ T lymphocytes seem to be related to pathogenesis, while DP and DN lymphocytes when expressing CD45RO, appear to play a dual role.

Key words: Flow cytometry, Leishmaniasis, Cutaneous, Neglected disease, T-Lymphocytes, Immune system.

INTRODUCTION

Leishmaniasis is an important neglected tropical disease, considered a public health issue in more than 98 countries [1]. This parasite is found mainly in countries such as East Africa, Southeast Asia and Latin America, affecting mainly the least favored socioeconomically. According to WHO, in the period between 2005 and 2016, there were 250.988 cases of American Cutaneous Leishmaniasis (ACL) in Brazil [2]. In the northeast region of Brazil, in 2017, there were 4,705 cases of ACL [3]. In Pernambuco, a state considered endemic to the ACL, cases have been reported in all regions of the State.

ACL is characterized by the appearance of skin lesions, which can range from one to hundreds. Subclinical patients are characterized by positive diagnosis for *Leishmania*, however, they do not present any clinical manifestations. In a study conducted by Follador et al (2002) [4] of the 461 healthy patients, 68 presented a positive diagnosis for *Leishmania*, however, they did not to manifest the disease nor received treatment. There are currently many studies with subclinical patients in visceral leishmaniasis, but very few studies in LTA. Thus, further studies are needed to better understand their immune response. These patients seem to have an efficient immune response so that they do not develop the infection. However, the true performance of the immune

system in these patients is not yet known. Therefore, studies are needed with this population in order to better understand the efficiency of the immune system.

After sand flies inoculation of parasites in the skin, there is an activation of the innate immune system and ultimately an activation of the adaptive immune response, where CD4⁺ T cells are crucial for healing and/or progression of ACL [5]. These T cells are cytokine-producing sources, acting on the mechanisms of healing and pathogenesis of the disease [6]. These lymphocytes may follow two distinct profiles: the Th1 profile, which produces a large amount of IFN- γ that is essential for the production of nitric oxide (NO), culminating in the death of *Leishmania* [7]; and the Th2 profile, characterized by the production of Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-10 (IL-10) and Tumor Necrosis Factor-Beta (TGF- β), which act to inhibit the production of NO, favoring the multiplication of the parasite [8,9,10].

CD8⁺ T lymphocytes have a double role in the fight against infection. They can act with a lytic function, which will kill the infected cells through the release of granules which contain granzymes and perforins. They may also act in the production of cytokines and chemokines, causing more cells to reach and be activated at the site of infection [6,11]. However, the role of these cells is still controversial. It seems that when the CD8⁺ T lymphocyte is a cytokine producer, producing cytokines like interferon- γ (IFN- γ), it acts in a protective way, contributing to infection control. However, when this same cell has a cytolytic function, it contributes to the onset/exacerbation of lesions caused by the disease [12,13].

The double-positive lymphocytes (DP) express on their surface both CD4⁺ and CD8⁺ molecules. Its main function is not yet known, but it is believed that these cells develop auxiliary and cytolytic functions [14]. Studies have shown an increase of these cells in some autoimmune diseases such as atopic dermatitis, autoimmune thyroiditis, in addition to viral infections and cancer [15,16,17].

In contrast, double-negative lymphocytes (DN), that do not express CD4⁺ and CD8⁺ molecules, appear to exert a regulatory function, as well as a pro-inflammatory function [18]. Studies performed by Ferraz et al. (2017) [11] with patients with ACL observed that DN lymphocytes were the most found cells *in situ* when compared to the other cells evaluated by the group. They also showed that these cells, together with the CD4⁺ T lymphocytes and the NKT, corresponded to 80% of the cytotoxic cells in the

lesion [12]. Both DP lymphocytes and DN originate in the thymus. DP cells correspond to 80% of thymocytes, whereas DNs correspond to 5% [19].

The maturation stage of lymphocytes is due to the presentation of peptides of the antigen by Major Histocompatibility Complex (MHC). For activation of CD4⁺ T cells, it is necessary for MHC to be Class II, while for CD8⁺ T cells the MHC is Class I [19,20]. The evaluation of the maturation stage of cells can be done with the CD45RO surface marker [21].

The present study aimed to characterize these lymphocyte populations and their and the expression of the CD45RO marker profile in patients with ACL. In our study we found a decrease of the CD45RO marker in the DP cells, DN and the CD4⁺ T lymphocytes. Thus, we contributed to a better knowledge of the immune response in ACL. The strength of our study lies in the analysis of human populations and in the staging of the disease process.

MATERIALS AND METHODS

Study population

The patients in this study were residents of endemic areas for ACL in the state of Pernambuco. The first group, was called control group (CT), composed of healthy individuals living in areas not endemic to the disease (n= 19). A total of 50 patients were included in this study, and they were divided into three groups: a group called subclinical (SC), composed of individuals who presented a positive clinical, epidemiological and laboratorial (Montenegro Intradermal reaction (MIR) diagnosis for ACL but had no clinical manifestations of the disease (n= 10); a group before treatment (BT), composed of patients who had not yet started the treatment regimen (n= 33); and a group called post-treatment (PT), composed of patients who had already completed the therapeutic regimen and obtained a clinical cure (n= 7). All patients older than 10 years, who presented clinical, epidemiological and at least two positive laboratory diagnosis, were included in the study. The laboratorial exams, performed by the Reference Service in Leishmaniasis of the Aggeu Magalhães Institute included: Polymerase chain reaction (PCR), indirect immunofluorescence (IFI), Montenegro Intradermal reaction (MIR), direct research (DR) using the scarified lesion for parasite visualization or aspiration puncture (AP). The present study was approved by the

Ethics Committee of the Aggeu Magalhães Institute/ Fiocruz (CAAE: 11083812.7.0000.5190).

Obtaining Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC)

A total of 18 ml of venous blood was collected from each patient in tubes containing heparin. After collection, the blood was placed in a Falcon tube containing Ficoll-Hypaque (Amersham Biosciences, Uppsala, Sweden), then the tube was centrifuged at room temperature in 400xg for 30 minutes. After that, the PBMCs were collected and transferred to another tube, which was washed twice and centrifuged with phosphate buffered saline (PBS) at room temperature, at 300xg for 10 minutes. Subsequently, in an aliquot, 10 µl of cells + 90 µl of Trypan blue dye (Sigma, St. Louis, MO) were added, so that the cells were counted, analyzed for their viability and adjusted to their concentration for the experiment [5].

Flow cytometry

For the analysis of CD4⁺, CD8⁺, DP and DN lymphocyte populations and their activation profile, PBMCs (0.5×10^6 cells) were suspended in PBS and labeled with anti-CD3 - FITC (BD Pharmigen, San Jose, CA), CD4 - PEcy-7 (BD Pharmigen, San Jose, CA), CD8 - APC (Immunotools, Friesoythe, Germany) and CD45RO - PE (BD Pharmigen, San Jose, CA) surface antibodies for a period of 20 minutes (all previously titrated). After that time, the cells were washed with the PBS solution, and then resuspended in 200µl PBS. Samples were then analyzed on the FACSCalibur-BD Bioscience flow cytometer (> 20.000 events / tube) using the Cell Quest Pro software (BD Bioscience) for data acquisition and FlowJo 7.6.5 software (®Tree Star Inc.) for its analysis [5]. For data analysis the quadrants' limits were based on the negative population, antibody titration, as well as controls using all antibodies except one (Fluorescence minus one from - FMO).

Statistical analysis

For statistical analysis, the GraphPad Prism 5.1 (GraphPad Prism 5.1 Software, La Jolla, CA, USA) software was used. First, the Shapiro-Wilk test was performed to verify the normality of the data. Then, the T-student and Anova tests were performed when the normality assumptions were observed. When not, the non-parametric Mann-

Whitney or Kruskal-Wallis tests were used. The results were considered statistically significant when $p < 0.05$.

RESULTS

Clinical characteristics of patients

The patients in this study came from endemic areas for American Cutaneous Leishmaniasis (ACL). All patients received an epidemiological, clinical and laboratory diagnosis for ACL. The mean age of the patients was 29.36 years in the BT group, 20.57 years in the PT group, 33.8 years in the SC group and 27.89 years in the CT group. In the group before treatment, a highest number of infected men was observed when compared to the number of women (ratio of 4.5: 1). BT patients presented, at the time of the clinical evaluation, ulcerous lesions in uncovered areas of the body, with evolution time ranging from 18 days to 24 months. The mean number of lesions / scars ranged from 1 to 5 in the BT and PT groups (Table 1).

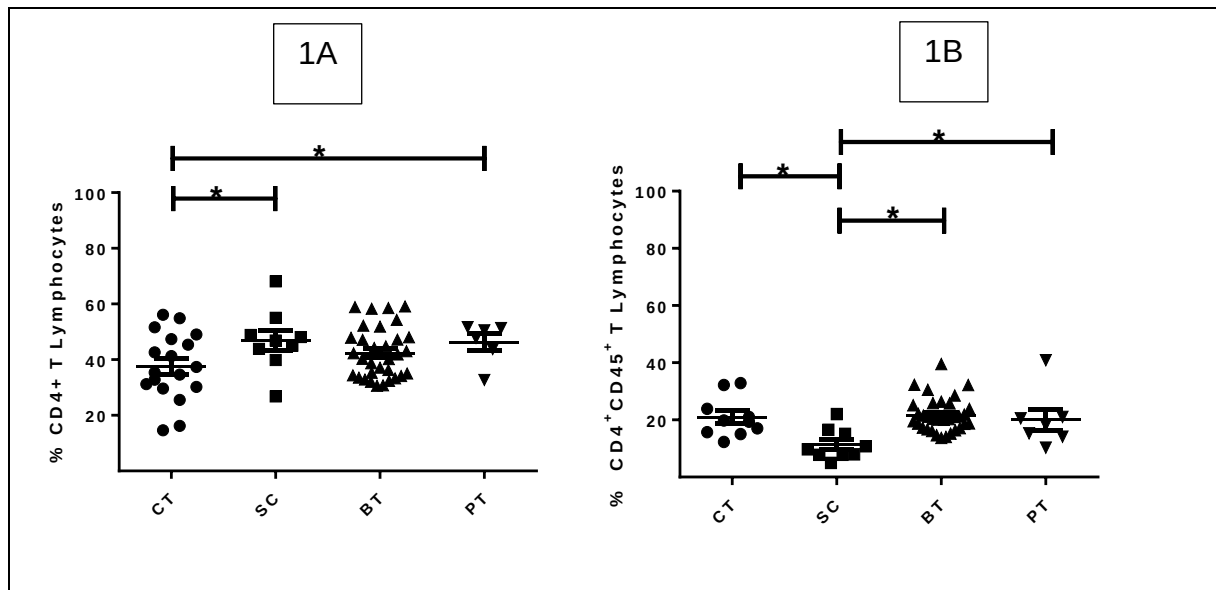
Table 1 – Main characteristics of the study group

<i>Characteristics</i>	<i>Study group</i>			
	<i>CT</i>	<i>SC</i>	<i>BT</i>	<i>PT</i>
Number os patients	19	10	33	7
Age	27,89 (26-32)	33,8 (11-63)	29,36 (13-71)	20,57 (12-37)
Ratio M/F	9/10	4/6	27/6	3/4
Mean Duration of disease	-	-	2,97 months (18 days–24 months)	8 months (3-24 months)
Mean number of lesions	-	-	1,54 (1-5)	3 (1-5)

Subtitle: CT: group control; SC: group subclinical; BT: group before treatment; PT: group posttreatment.

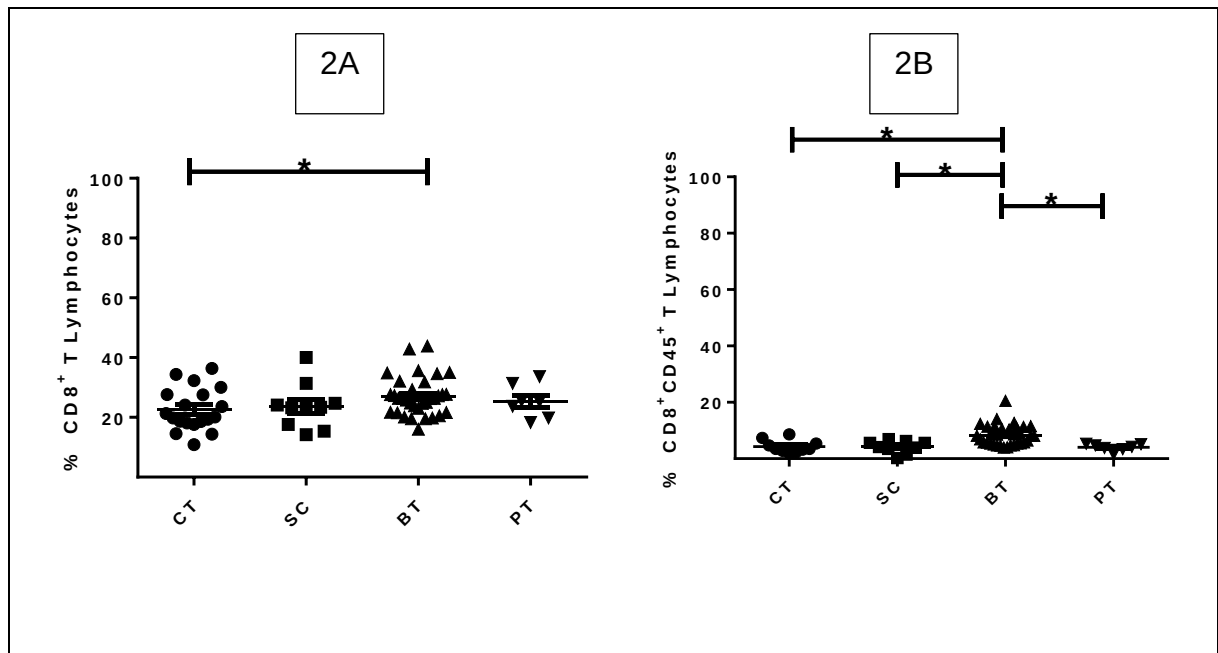
Immunological evaluation

We observed a statistically significant increase in CD4⁺ T cells in the PT ($p = 0.0431$) and SC ($p = 0.0311$) groups when compared to the control group (Graph 1-A). Regarding the expression of CD45RO by CD4⁺ T cells, we observed that these cells were more positive in the BT groups ($p = 0.003$) and PT ($p = 0.0418$), when compared with the SC group. We also observed a decrease in the expression of CD45RO in the SC group ($p = 0.0057$) when compared to the CT group (Fig. 1-B).



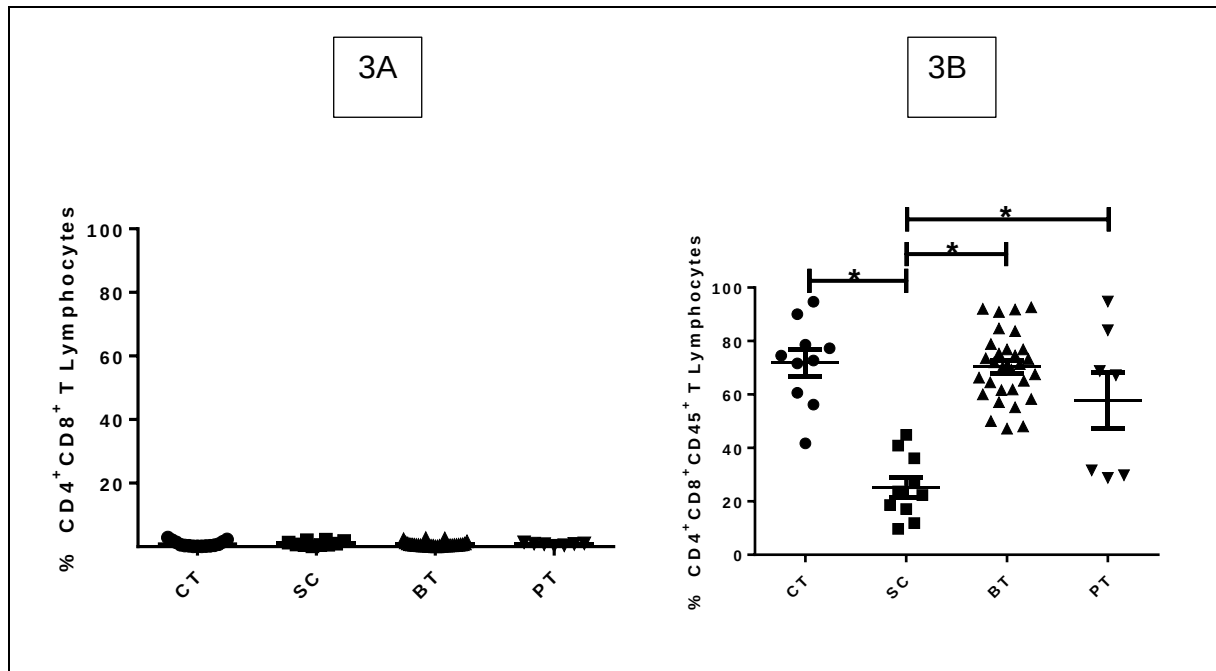
Graph 1 - A: Percentage of CD4⁺ T lymphocytes and B: Percentage of activation of CD4⁺ T lymphocytes in PBMCs of patients with active ACL before treatment (BT), posttreatment (PT), subclinical (SC) patients and healthy controls, not carriers of the disease, (CT). Results are expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were considered significant when values of "p" were less than 0.05 and are represented by the "*" symbol.

When we evaluated the percentage of CD8⁺ T lymphocytes (Graph 2-A), we observed a statistically significant increase of these cells in the BT group ($p = 0.0231$) compared to the CT group. Regarding CD45RO expression (Graph 2-B), we noticed a greater positivity among BT groups in comparison to PT ($p = 0.0007$), SC ($p = 0.0027$) and CT ($p = 0.0008$).



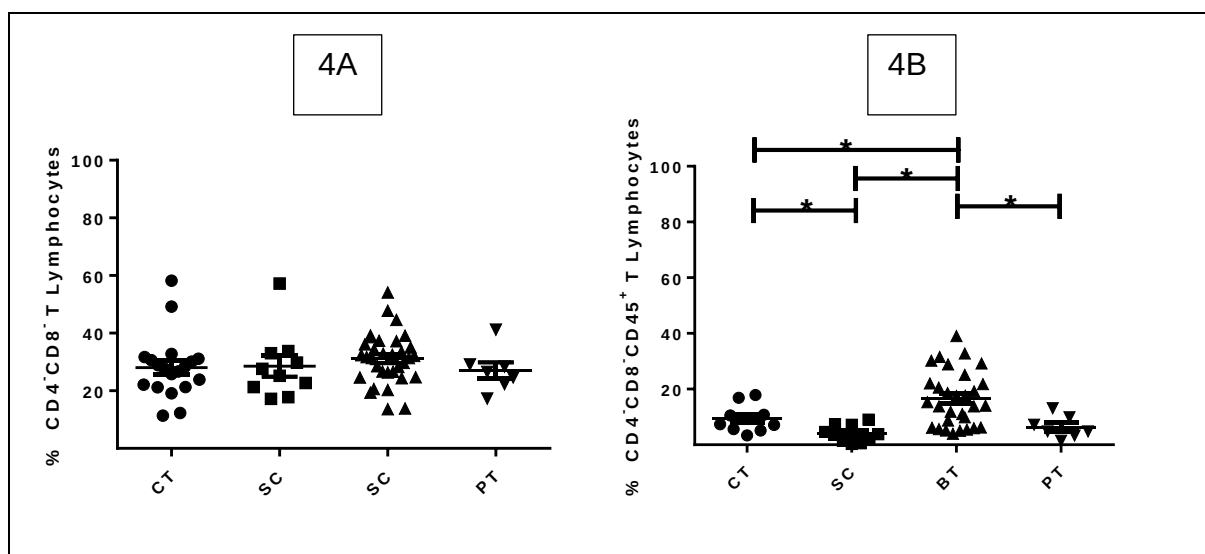
Graph 2 - A: Percentage of CD8⁺ T lymphocytes and B: Percentage of activation of CD8⁺ T lymphocytes in PBMCs of patients with active LTA before treatment (BT), posttreatment (PT), subclinical (SC) patients and healthy controls, not carriers of the disease, (CT). Results are expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were considered significant when values of "p" were less than 0.05 and are represented by the "*" symbol.

We did not observe any statistical significance when evaluating the percentage of DP lymphocytes (Graph 3-A). When we evaluated their CD45RO positivity (Graph 3-B), we observed a greater expression in the BT group compared to SC ($p < 0.0001$), PT when compared to SC ($p = 0.0097$) and a decrease in their expression in the SC group when confronted with the CT group ($p < 0.0001$).



Graph 3 - A: Percentage of DPT lymphocytes T and B: Percentage of activation of DP T lymphocytes in PBMCs of patients with active ACL before treatment (AT), posttreatment (PT), subclinical (SC) and healthy controls, not carriers of the disease, (CT). Results are expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were considered significant when values of "p" were less than 0.05 and are represented by the "*" symbol.

Finally, when evaluating the DN lymphocytes (Graph 4-A), we did not observe any statistical significance. However, when we evaluated the percentage of CD45RO expression of these cells (Graph 4-B), we noticed a greater positivity among BT groups when compared to PT ($p = 0.0044$), SC ($p = 0.0001$) and CT ($p = 0.0473$) and a decrease in the SC group when compared to the CT group ($p = 0.0089$).



Graph 4 - A: Percentage of DN T lymphocytes and B: Percentage of activation of DN T lymphocytes in PBMCs of patients with active LTA before treatment (AT), posttreatment (PT), of subclinical (SC) patients and of healthy controls, not carriers of the disease, (CT). Results are expressed as means $\pm$ SEM. Differences between groups were considered significant when values of "p" were less than 0.05 and are represented by the "*" symbol.

DISCUSSION

The results showed an increase in CD4⁺ T cells in the PT and SC groups when compared to the control group. These data corroborate previous findings from our group, where we evaluated PBMCs from patients with ACL and observed an increase in these lymphocytes in patients after treatment with chemotherapy [5]. Our data support the assumption that these cells are crucial in combating the infection, and consequently, by preventing the infection from progressing.

In addition, CD4⁺ T cells had a greater expression of CD45RO in patients who had an active disease (BT group) and in patients who had completed the therapeutic regimen and obtained clinical cure (PT) in relation to the subclinical ones, suggesting that these cells contribute to the protection of ACL. We also showed a regression of the expression CD45RO in subclinical patients in comparison to the controls, suggesting that a greater positivity for this marker can generate a deregulated response, giving rise to the lesions of the disease. Clarêncio et al. (2008) [22] evaluated the percentage of CD4⁺ T cells CD45RO expression in patients with visceral leishmaniasis, before and after treatment, and observed a greater positivity in the posttreatment group when

compared to the pre-treatment group. More studies are needed to clarify the role of this marker in ACL.

CD8⁺ T lymphocytes have been associated with immunoprotection [5,23], as well as responsible for lesions [11,12,24]. The latter is related by its cytokine-producing activity. Some studies indicate that CD8⁺ T lymphocytes act by destroying macrophages that are infected with *Leishmania*, thus inducing the infection control [25,26]. In this study, these cells presented a higher percentage and expression of CD45RO in the BT group when compared with the other groups studied. These findings suggest that these cells may be involved with the onset of lesions. In a study conducted by Clarêncio et al. (2008) with VL [22], a greater expression of CD45RO by CD8⁺ T lymphocytes was observed in healthy individuals when compared to the before treatment group in LV. In addition, they observed a higher expression of CD45RO in these cells in the post-treatment group compared to the before treatment group [22].

Double-positive lymphocytes, which carry CD4⁺ and CD8⁺ markers on their surface, have been associated with suppressor and cytotoxic roles [27]. These cells have already been observed in lesions of multiple sclerosis, where they have a regulatory function and in HIV infection, which had a high proliferative and effector capacity [28,29]. In the present study, no statistical significance was obtained in relation to the percentage of these cells between the studied groups. However, as for CD45RO expression, an increase of this marker was seen in the group with active infection (BT) and in the group that obtained clinical cure (PT) and a decrease in the expression of CD45RO was observed in the SC group, suggesting that these cells may be related to the infection. However, additional studies are needed to accurately define their role in ACL.

Double-negative lymphocytes (DN) have also been associated with a cytotoxic role. Ferraz et al. (2017) [11] have associated them as one of the main sources of cytotoxic activity at *in situ* lesions in ACL, thus contributing to the onset of lesions. It is postulated that these cells are recruited to the site of infection, making its amount in the peripheral blood small [39]. Gollob et al. (2008) [30] suggests that these cells through the production of cytokines play a role associated with pathogenesis as well as plays a regulatory role in cutaneous leishmaniasis. In this study, there was no statistical significance regarding the percentage of these cells in the three groups of patients

when compared with the group of healthy individuals. However, we observed a higher expression of CD45RO in these cells in the BT group, suggesting that these cells are activate when they are still in the peripheral blood and are recruited to the site of infection, and may contribute to the pathogenesis of the disease. In addition, there is a decrease in the expression of CD45RO in the SC group, raising the hypothesis that these cells can also act in the fight against infection.

In our study, we observed that CD4⁺ T cells appear to be linked to protection and that CD8⁺ T lymphocytes appear to have played the cytotoxic role, thus contributing to ACL lesions. We observed a decrease of the CD45RO marker in the DP, DN and CD4⁺ cells in subclinical patients, suggesting that a greater expression of CD45RO of these cells is the mechanism responsible for the appearance of the lesions in patients with active ACL. This marker appears to have a greater expression in effector cells than in memory cells and is thus more likely to be found in the active disease since, when recognizing the antigen, the lymphocytes enter into an activation process, where we see CD45RO expression, in order to counteract the infection.

The subclinical patients in our study appear to have had a Th1 response during infection since they did not present lesions at any time. We also observed that DP and DN lymphocytes, when expressing CD45RO, seem to play a dual role (pathogenesis and protection). We emphasize that more studies with a larger number of patients should be performed in order to characterize these lymphocyte populations.

REFERENCES

- 1- Negrão GN, Ferreira MEMC. Considerações sobre a leishmaniose tegumentar americana e sua expansão no território brasileiro. Revista Percurso – NEMO 2014; 6:147-168.
- 2- WHO| Leishmaniasis [Internet]. WHO. Acesso em 15 de fevereiro de 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.
- 3- DATASUS, Ministério da Saúde. Departamento de Informática do SUS. Acesso em 15 de maio de 2018. Disponível em: <http://datasus.saude.gov.br/>.

- 4- Follador I, Araújo C, Bacellar O, et al. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin Infect Dis* 2002; 34: e54-e58.
- 5- Brelaz-de-Castro MCA, Almeida AF, Oliveira AP, Assis-Souza M, Rocha LF, Pereira VRA. Cellular immune response evaluation of cutaneous leishmaniasis patients cells stimulated with *Leishmania (Viannia) braziliensis* antigenic fractions before and after clinical cure. *Cellular Immunology* 2012; 279:180-186.
- 6- Scott P, Novais FO. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 2016; 16:581-592.
- 7- Kima PE, Soong L. Interferon gamma in Leishmaniasis. *Frontiers in Immunology* 2013; 4:1-5.
- 8- Kedzierski L, Evans KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. *Parasitology* 2014; 141:1544-1562.
- 9- Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG. T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine* 2015; 74:5-17.
- 10- Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections A Practical Review. *Dermatol Clin* 2015; 33:579-593.
- 11- Ferraz R, Cunha CF, Pimentel MIF, et al. CD3⁺CD4^{neg}CD8^{neg} (double negative) T lymphocytes and NKT cells as the main cytotoxic-related-CD107a⁺ cells in lesions of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Parasites & Vectors* 2017; 10:1-12.
- 12- Campos TM, Costa R, Passos S, Carvalho LP. Cytotoxic activity in cutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2017; 112:733-740.
- 13- Novais FO, Scott P. CD8⁺ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol* 2015; 37:251-259.
- 14- Zuckermann FA, Husmann RJ. Functional and phenotypic analysis of porcine peripheral blood CD4/CD8 double-positive T cells. *Immunology* 1996; 87:500-512.
- 15- Iwatani Y, Hidaka Y, Matsuzuka F, Kuma K, Amino N. Intrathyroidal lymphocyte subsets, including unusual CD4⁺ CD8⁺ cells and CD3^{lo}TCR alpha beta ^{lo}/-CD4-CD8- cells, in autoimmune thyroid disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 93:430-436.
- 16- Nascimbeni M, Shin E, Chiriboga L, Kleiner DE, Rehmann B. Peripheral CD4⁺CD8⁺ T cells are differentiated effector memory cells with antiviral functions. *Immunobiology* 2004; 104:478-486.

- 17- Desfrançois J, Derré L, Corvaisier M, et al. Increased frequency of nonconventional double positive CD4CD8 alphabeta T cells in human breast pleural effusions. *Int J Cancer* 2009; 125:374-380.
- 18- Fischer K, Voelkl S, Heymann J, et al. Isolation and characterization of human antigen-specific TCR alpha beta+ CD4(-)CD8- double-negative regulatory T cells. *Blood* 2005; 105:2828-2835.
- 19- Murphy K, Travers P, Walport M. *Imunologia de Janeway*. Porto Alegre: Artmed; 2010. 848 p.
- 20- Doyle C, Strominger JL. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 1987; 330:256-259.
- 21- Martinez-Arends A, Tapia FJ, Cáceres-Dittmar G, et al. Immunocytochemical characterization of immune cells in lesions of American cutaneous leishmaniasis using novel T cell markers. *Acta Tropica* 1991; 49:271-280.
- 22- Clarêncio J, Oliveira CI, Favali C, et al. Could the lower frequency of CD81CD181CD45RO1 lymphocytes be biomarkers of human VL? *International Immunology* 2008; 21:137-144.
- 23- Cunha CF, Ferraz R, Pimentel MIF, et al. Cytotoxic cell involvement in human cutaneous leishmaniasis: assessments in active disease, under therapy and after clinical cure. *Parasite Immunology* 2016; 38:244-254.
- 24- Santos CS, Boaventura V, Cardoso CR, et al. CD8(+) Granzyme B(+)-mediated tissue injury versus CD4(+)IFNγ(+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 2013; 33:1533–40.
- 25- Da-Cruz AM, Conceição-Silva F, Bertho AL, Coutinho SG. Leishmania-Reactive CD4+ and CD8+ T Cells Associated with Cure of Human Cutaneous Leishmaniasis. *Infection and Immunity* 1994; 62:2614-2618.
- 26- Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JA, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. *European Journal of Immunology* 1994; 24:2813-2917.
- 27- Overgaard NH, Jung JW, Steptoe RJ, Weels JW. CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage?. *Journal of Leucocyte Biology* 2015; 97:31-38.
- 28- Eljaafari A, Yuruker O, Ferrand C, et al. Isolation of Human CD4/CD8 Double-Positive, Graft-Versus-Host Disease-Protective, Minor Histocompatibility Antigen-

Specific Regulatory T Cells and of a Novel HLA-DR7-Restricted HY-Specific CD4 Clone. *The Journal of Immunology* 2012 190:184-194.

29- Frahm MA, Picking RA, Kurucs JA, et al. CD4+CD8+ T-cells Represent a Significant Portion of the Anti-HIV T-cell Response to Acute HIV Infection. *J Immunol* 2012; 188:4289-4296.

30- Gollob KJ, Antonelli LRV, Faria DR, Keesen TSL, Dutra WO. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8- (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int Immunopharmacol* 2008; 8:1338-1343.

ACKNOWLEDGEMENTS:

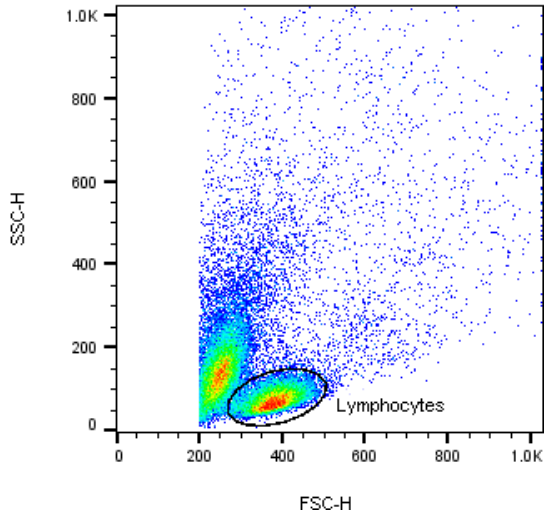
We thank the platform PDTIS/Flow Cytometry (RPT08F)-FIOCRUZ. MKAC is the recipient of a MSc fellowship from CAPES. This work was supported by the FACEPE (APQ 0820-2.11.2017).

AUTHOR'S CONTRIBUTION

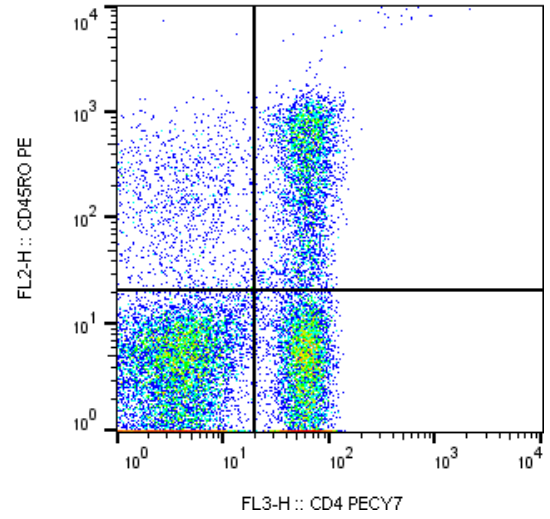
MKAC and MCABC realized the experiments and wrote the paper; RFS, VNCV and VRAP revised the manuscript, MEFB assisted in the collection of samples. All authors participated in conducting the study, had full access to the data, and read and approved the final manuscript. The authors declare that there is no conflict of interest.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

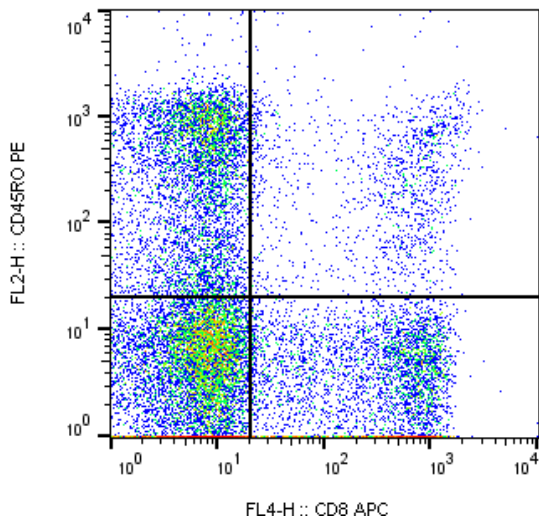
1A



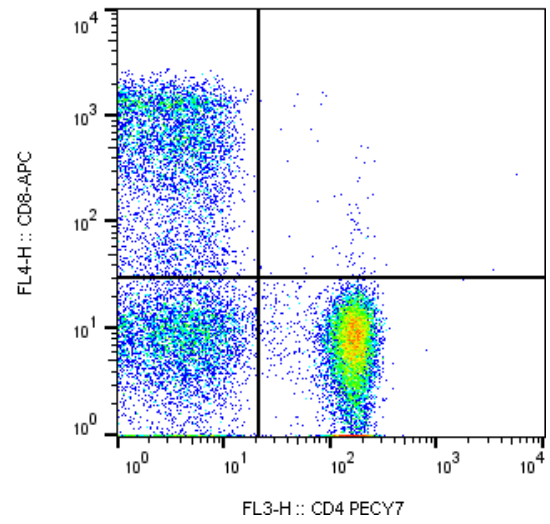
1B



1C



1D



1E

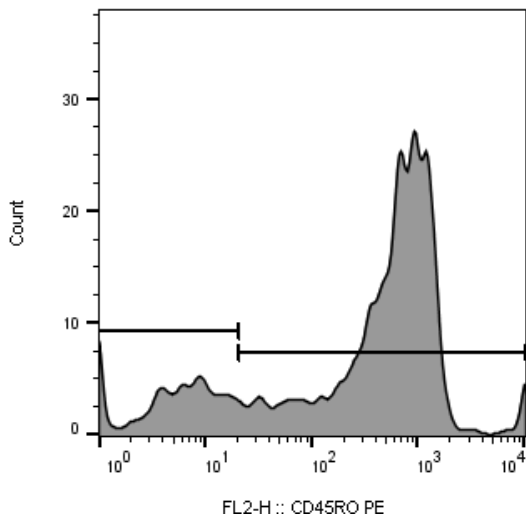


Figure 1 - Strategies for analysis of lymphocytes 1A: Identification of the lymphocyte population; 1B: Evaluation of activation of CD4 + T cells; 1C: Evaluation of activation of CD8 + T cells; 1D: Evaluation of DP and DN cells; 1E: Evaluation of the activation of DP and DN cells.

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA**PARECER DE RELATÓRIO PARCIAL**

Título: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

Pesquisador responsável: Valéria Pereira Hernandes

Instituição de realização do Projeto: CPqAM

Instituições Envolvidas: CPqAM/ FIOCRUZ

Data de aprovação do projeto no CEP/CPqAM: 04/04/2013

Data de apreciação do relatório parcial no CEP/CPqAM: 30/03/2016

Registro no CAAE: 11083812.7.0000.5190

Prezada Dra., Valéria Pereira Hernandes

Após analisar o relatório parcial referente ao projeto em pauta na reunião do CEP/CPqAM que ocorreu dia 14 de Junho de 2016, informamos que o referido relatório foi deferido, pois se encontra em concordância com a Resolução sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, Res. 466 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares. O CEP/CPqAM defere também quanto à solicitação da pesquisadora responsável pelo projeto para prorrogação de prazo de conclusão do estudo, que fica alterada para 03 de julho de 2019.

Recife, 26 de julho de 2016.

Janaina Campos de Miranda

Coordenadora CEP/CPqAM/FIOCRUZ

Av. Moraes Rego, s/n
50.870-420 Fone: (81) 2101.2639
(81) 3453.1911 | 2101.2639
Rio de Janeiro, RJ, Brasil
E-mail: cepcpqam@fiocruz.br



ANEXO B – SOLICITAÇÃO DE RENOVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Fwd: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

----- Forwarded message -----

De: **Equipe Plataforma Brasil** <plataformabrasil@saude.gov.br>

Date: qua, 26 de jun de 2019 às 16:31

Subject: PLATBR - Estado de apreciação de Pesquisa

To: Valéria Pereira Hernandes <valeriaph@gmail.com>

Caro (a) Pesquisador (a) e Assistente(s),

O projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA foi aceito para análise no CEP. Significa que o CEP concluiu a validação documental de sua última submissão, por favor verifique a situação do projeto de pesquisa e atenda a possíveis pendências documentais, se existirem. Caso contrário aguarde o parecer consubstanciado do CEP, cujo o nome pode ser consultado no campo localização atual do projeto, disponível no item detalhar.

Atenciosamente,

Plataforma Brasil

Siga **Ética em Pesquisa** nas Redes Sociais:

[Instagram](#)

[Facebook](#)

[Twitter](#)

[LinkedIn](#)



INSTITUTO AGGEU
MAGALHÃES (IAM)



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA

Pesquisador: Valéria Pereira Hernandes

Versão: 6

CAAE: 11083812.7.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante:

Patrocinador Principal: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Informamos que o projeto CARACTERIZAÇÃO DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM PACIENTES PORTADORES DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA ATIVA E APÓS CURA CLÍNICA que tem como pesquisador responsável Valéria Pereira Hernandes, foi recebido para análise ética no CEP Instituto Aggeu Magalhães (IAM) em 26/06/2019 às 16:31.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.670-420

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2101-2639

Fax: (81)2101-2639

E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br