

TATJANA KEESEN DE SOUZA LIMA

**Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas**

Departamento de Bioquímica e Imunologia

**ESTUDO DO REPERTÓRIO V β EM
LINFÓCITOS T CD4⁺ E DA FUNÇÃO
IMUNOLÓGICA DE CÉLULAS T DUPLO
NEGATIVAS CD4⁻CD8⁻ E NKT EM PACIENTES
COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA
POR *L. braziliensis***

Belo Horizonte, junho de 2010

Tese apresentada ao Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências
Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção de
título de Doutor em Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Kenneth John Gollob

SRI International

Programa de Pós-graduação da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte

Co-orientadora: Prof^a Dr^a Walderez Ornelas Dutra

Laboratório das Interações Celulares do Departamento de Morfologia do Instituto de Ciências
Biológicas da UFMG

Este trabalho contou com a colaboração dos seguintes pesquisadores:

Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Minas Gerais:

Professora Dr^a. Walderez Ornelas Dutra

Pós doutoranda Dr^a Daniela Rodrigues de Faria

**Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar dos Santos,
Universidade Federal da Bahia:**

Dr. Edgar M. Carvalho

Dr. Luiz Henrique Guimarães

Dr^a. Olívia Bacellar

Dr. Paulo Machado

Centro de Pesquisas René Rachou/FIOCRUZ:

Dr^a Lis Ribeiro do Vale Antonelli

Este trabalho contou com o financiamento das seguintes agências:

NIH-TMRC

NIH – RO3

CNPq

FAPEMIG

“Sem noção de responsabilidade, sem devoção à prática do bem, sem amor ao estudo e sem esforço perseverante em nosso próprio burilamento moral, é impraticável a perigração libertadora para os Cimos da vida.”

Emmanuel / Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

Agradecer... Uma atitude que deveria fazer parte no dia a dia de todos nós....

Ao acordar deveríamos agradecer sempre por um dia vivido e por mais um dia a se viver.

Agradecer ao Ser maior que nos dá a grande oportunidade da vida e da evolução.

E eu não podia deixar de agradecer a Ele, DEUS, que é com certeza dentro do que eu acredito, o maior responsável por eu estar aqui agora agradecendo. O meu muito obrigada por tudo!

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais que também são peças chave para a realização dessa conquista, sem eles eu não conseguiria. As minhas amadas irmãs Mariana, Isabela e Gabriela. A minha linda e levada sobrinha Mirela. Melhor de tudo em minha vida!

Ao meu noivo/marido Carlos, lindo! Que sempre esteve comigo, me dando força e incentivado a crescer. Compreensão é o nome dele! Obrigada meu amado companheiro!

Aos meus orientadores e amigos, Ken e Wal, que desde o início acreditaram em mim e me empurraram para o conhecimento. Obrigada por todos os momentos de conhecimento científico ou de vida. Pela convivência amiga e confiante e por todas as oportunidades. Muito obrigada!

Aos pacientes, que participaram ativamente desse trabalho e não conseguem imaginar a grandeza da sua ajuda! Obrigada!

Quero agradecer a todos os participantes ativos ou não, componentes do nosso grupo de trabalho. Conviver com todos vocês sempre foi muito bom!

Em especial, quero agradecer a Lis, que me auxiliou muito no início do trabalho, me ensinando e me mostrando excelentes exemplos de ser uma boa cientista.

A Dani, que além de me ajudar com os experimentos de confocal, me ajuda e pede ajuda também de todos os jeitos. Obrigada amiga!

Agradecer a Érica, companheira de laboratório pela sempre ajuda em Salvador e em todos os lugares. Com certeza, sem ela, tudo seria mais lento.

Agradecer a todos os companheiros e amigos que de alguma forma fizeram parte desse momento: Adriana, Micena, Cris, Sabrina, Germano, Polly, Diego, Ricardo, Janete, Fernanda, Paula, Paulo, Pat, Lu,, Alan, Luiza, Leo, Kayla, Karen, Vítor, Priscila, Soraia.

Todos sempre ajudando de alguma forma. Ao meu aprendiz/amigo Rodrigo, que me fez crescer cientificamente e se tornou um grande amigo.

Não posso esquecer-me dos funcionários do departamento de Bioquímica/Imunologia que foram muito importantes para o trabalho! O meu muito obrigada a Celise, ao Jamil e a Grazi.

Aos funcionários e pesquisadores do Serviço de Imunologia do Hospital Edgar Santos em Salvador! Sem a grande ajuda de vocês, tudo seria mais difícil!

Aos meus professores de Bases, o meu muito obrigada pelos momentos de conhecimento!

Aos amigos de Bases Andreza, Bruno, Érica, Leo, Luigi, Nataly, Pat e Ric! Momentos de muita alegria e grande amizade vivemos juntos!

Com certeza esqueci alguma coisa, mas para que a ingratidão não faça parte desse momento, quero deixar o meu muito obrigada por todos aqueles que em algum momento dessa trilha estiveram comigo!

4.10 Microscopia Confocal	50
4.11 Análises das Imagens	50
4.12 Análises estatísticas	51
5 RESULTADOS	52
5.1 Determinação do repertório de células T CD4⁺ pela análise de expansão preferencial de regiões Vβ do TCR em indivíduos não infectados e em pacientes com leishmaniose, apresentando a forma clínica cutânea.....	52
5.1.1 Pacientes com leishmaniose cutânea mostraram um aumento na frequência de células T CD4 ⁺ expressando V β 5.2 quando comparados com indivíduos não infectados.....	52
5.2 Análise comparativa da média da frequência das células T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões Vβ do TCR, tanto na presença quanto na ausência de estímulo com SLA ..	54
5.3 Análise da média de frequência de expressão de moléculas de ativação e memória em linfócitos T CD4⁺ com expressão diferencial da região Vβ do TCR	56
5.3.1 - Pacientes com LC tem perfil de ativação e memória aumentado nas células T CD4 ⁺ expressando diferentes regiões V β do TCR comparado aos indivíduos não infectados	56
5.3.2 – Células T CD4 ⁺ expressando V β 5.2, 11 e 24 apresentam perfil de ativação e memória aumentado comparado com as células T CD4 ⁺ expressando os demais V β nos pacientes com LC.....	58
5.4 Análise da média de frequência de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α e IL-10), em linfócitos T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões Vβ do TCR, na presença ou ausência de estímulo, nos pacientes com leishmaniose cutânea	60
5.4.1 As mesmas sub-populações de células T CD4 ⁺ (V β 5.2, 11 e 24) que apresentaram um fenótipo de ativação e memória, também apresentaram uma frequência aumentada de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias seguida de estímulo antigênico, quando comparadas com as outras sub-populações de células T CD4 ⁺ V β específicas.....	60
5.5 Análise das correlações entre as frequências de células expressando diferentes citocinas, nas células T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões Vβ do TCR, estimuladas com SLA, em pacientes com leishmaniose cutânea.....	63

5.5.1 Correlação positiva entre células T CD4 ⁺ expressando distintos Vβ produtoras de IFN-γ e TNF-α, concomitantemente.....	63
5.5.2 Citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ e TNF-α) estão positivamente correlacionadas com a citocina anti-inflamatória IL-10 nas células T CD4 ⁺ expressando os Vβ 5.2 e 24.....	64
5.5.3 Células T CD4 ⁺ expressando distintas regiões Vβ estão correlacionadas com características clínicas.....	65
5.6 Determinação da frequência de células T CD4⁺ expressando distintos Vβ em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea.....	66
5.6.1 Lesões de pacientes com LC apresentam alta frequência de células T CD4 ⁺ expressando Vβ 5.2.....	66
5.7 Análise comparativa da média da frequência total das células NKT semi-invariantes com expressão preferencial da região Vα24 do TCR, entre indivíduos não infectados e pacientes com LC.....	68
5.7.1 Sub-populações NKT provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea possuem menor frequência média total comparada às sub-populações de indivíduos saudáveis <i>ex vivo</i> ...	68
5.7.2 Sub-populações de células NKT CD4 ⁻ CD8 ⁻ duplo negativas e NKT CD4 ⁺ de pacientes com LC, apresentam perfil de ativação aumentado em comparação com indivíduos não infectados.....	70
5.8 Análise da média de frequência de expressão de moléculas de ativação, memória e citotoxicidade em linfócitos semi-invariantes NKT DN e CD4⁺ com expressão diferencial da região Vα24 do TCR, em pacientes com LC.....	71
5.8.1 Sub-populações de células NKT DN apresentam perfil de ativação aumentado comparadas às células NKT CD4 ⁺ após cultura nos pacientes com LC.....	71
5.8.2 Sub-populações de células NKT DN apresentam perfil de citotoxicidade aumentado comparadas com células NKT CD4 ⁺ após cultura nos pacientes com LC.....	72

5.9 Análise da média de frequência de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN-γ, TNF-α e IL-10), em sub-populações de células NKT semi-invariantes, na presença ou ausência de estímulo, nos pacientes com leishmaniose cutânea	73
5.9.1 Sub-populações de células NKT DN e NKT CD4 ⁺ apresentam perfil espontâneo inflamatório nos pacientes com LC.....	73
5.9.2 SLA induziu aumento na expressão de IL-17 nas células NKT DN de pacientes com LC.....	74
5.10 Análise comparativa <i>ex vivo</i> das sub-populações de células T CD4⁻CD8⁻ duplo negativas expressando os TCR $\alpha\beta$ e NKT em pacientes com LC, antes e após o tratamento da doença	76
5.10.1 Sub-populações NKT provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea possuem maior frequência média total de expressão de marcadores de ativação e memória, do que as células T DN $\alpha\beta$, antes e após o tratamento da LC.....	76
5.11 Comparação <i>in vitro</i> da capacidade citotóxica e produção de citocinas pelas sub-populações de células T CD4⁻CD8⁻ DN expressando os TCR $\alpha\beta$ e NKT em pacientes com LC, tanto antes quanto após o tratamento da doença	79
5.11.1 Análise comparativa da capacidade citotóxica entre as células T DN $\alpha\beta$ e NKT (DN e CD4 ⁺) antes e após o tratamento da LC.....	79
5.11.2 Análise comparativa entre as células T DN $\alpha\beta$ e NKT (DN e CD4 ⁺) produtoras de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatória IL-10, antes e após o tratamento da LC.....	81
5.11.3 Análise comparativa entre as células T DN $\alpha\beta$ e NKT (DN e CD4 ⁺) produtoras da citocina IL-17, antes e após o tratamento da LC.....	81
5.12 Análise individual da expressão de granzima A e citocinas nas sub-populações linfocitárias NKT e DN $\alpha\beta$, antes e após o tratamento da LC, após cultura	82
5.12.1 Expressão de granzima A aumenta nas células T DN $\alpha\beta$ após o tratamento da LC.....	83

5.12.2	Frequência média de expressão de IFN- γ e TNF- α está aumentada em pacientes com LC após o tratamento.....	84
--------	--	----

5.12.3	Células T CD4 ⁻ CD8 ⁻ duplo negativas $\alpha\beta$ diminuem a frequência média de expressão de IL-17 nos pacientes com LC após o tratamento	85
--------	--	----

5.12.4	Células T CD4 ⁻ CD8 ⁻ duplo negativas $\alpha\beta$ e NKT DN aumentam a frequência média de expressão de IL-10, enquanto que as células NKT CD4 ⁺ diminuem, nos pacientes com LC após o tratamento	86
--------	---	----

6 DISCUSSÃO88

6.1	Sub-populações específicas de células T CD4 ⁺ definidas pela expressão da região V β do TCR estão associadas com perfis imunoreguladores e tamanho da lesão na leishmaniose humana.....	88
-----	--	----

6.2	Células NKT CD4 ⁻ CD8 ⁻ duplo negativas e CD4 ⁺ na leishmaniose cutânea humana: Potencial funcional e possível papel na ativação imune <i>versus</i> patologia	96
-----	---	----

6.3	Distintas sub-populações linfocitárias (DN $\alpha\beta$, NKT DN e NKT CD4 ⁺) apresentam diferentes perfis funcionais quando comparadas antes e após o tratamento da leishmaniose cutânea.....	99
-----	---	----

7 CONCLUSÕES FINAIS104

REFERÊNCIAS107

ANEXOS

ANEXO 1

Artigo 1: Immunoregulatory mechanisms and CD4⁻CD8⁻ (double negative) T cells subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: A balancing act between protection and pathology

ANEXO 2

Participações em congressos, cursos e outras atividades acadêmicas e científicas realizadas durante o Doutorado

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Sub-populações de linfócitos T e geração de repertório.....	18
Figura 2- Perfil da distribuição de células mononucleares do sangue periférico no gráfico de tamanho <i>versus</i> granulosidade e controle de isotipo.....	45
Figura 3: “Dot plots” e histogramas representativos das células T CD4 ⁺ com expressão diferencial das regiões V β do TCR e expressão de CD45RO.....	46
Figura4. “Dot-Plots” representativos para análise de células NKT semi-invariantes expressando o TCR α 24.....	47
Figura5. “Dot-Plots” representativos para análise de células duplo negativas CD4 ⁻ CD8 ⁻ expressando o TCR $\alpha\beta$	48
Figura 6: Análise comparativa da frequência <i>in vitro</i> da expressão diferencial das regiões V β do TCR em linfócitos T CD4 ⁺ , entre indivíduos não infectados e pacientes com leishmaniose cutânea.....	53
Figura 7 Frequência de células T CD4 ⁺ expressando diferentes regiões V β do TCR após estímulo com SLA.....	55
Figura8: Expressão de CD69, HLA-DR e CD45RO está aumentada nas células T CD4 ⁺ expressando distintas regiões V β provenientes de pacientes com LC.....	57
Figura9: Expressão de CD45RO e HLA-DR nas células T CD4 ⁺ expressando distintas regiões V β de pacientes LC.....	59
Figura10: Estímulo antígeno específico aumenta expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 nas células T CD4 ⁺ expressando distintas regiões V β do TCR.....	62
Figura11: Expressão de IFN- γ e TNF- α está correlacionada positivamente nas células T CD4 ⁺ expressando regiões V β 5.2, 8, 11 e 17, após estímulo com SLA.....	64

Figura 12: Expressão de IL-10 está correlacionada positivamente com a expressão de IFN- γ e TNF- α nas células T CD4 ⁺ expressando regiões V β 5.2 e 24, após estímulo com SLA.....	65
Figura 13: A freqüência de células T CD4 ⁺ expressando V β 5.2 correlaciona-se positivamente com o tamanho da lesão de pacientes com leishmaniose cutânea.....	66
Figura 14: Freqüência de células T CD4 ⁺ expressando V β em lesões de pacientes com LC.....	67
Figura 15: Análise da freqüência média de células NKT totais do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea ou indivíduos não infectados.....	69
Figura 16: Análise da freqüência média de células NKT DN e CD4 ⁺ expressando CD69 após cultura.....	71
Figura 17: Análise da freqüência média de expressão de granzima A nas células NKT DN e CD4 ⁺	72
Figura 18: Células NKT DN e NKT CD4 ⁺ expressam espontaneamente citocinas inflamatórias distintas.....	74
Figura 19: SLA induziu aumento de células NKT DN produtoras de IL-17.....	75
Figura 20: Comparação da expressão de CD69 e CD45RO nas células NKT e DN $\alpha\beta$ antes e após o tratamento dos pacientes com LC.....	78
Figura 21: Comparação da expressão de IL-17 entre as células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC.....	82
Figura 22: Comparação da expressão de granzimaA nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC.....	83
Figura 23- Comparação da expressão de IFN- γ e TNF- α nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC.....	85
Figura 24- Comparação da expressão de IL-17 nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC.....	86
Figura 25- Comparação da expressão de IL-10 nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC.....	87
Figura 26: Desenho esquemático sobre o modelo estudado.....	105

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea estudados na primeira fase do trabalho.....	39
Tabela 2: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea estudados nas segunda e terceira fases do trabalho.....	41
Tabela 3. Células NKT de pacientes com leishmaniose cutânea expressam um perfil hiperativado comparadas a indivíduos não infectados.....	70
Tabela4: Comparação entre sub-populações linfocitárias em pacientes com LC antes e após o tratamento.....	77
Tabela 5- Comparação <i>in vitro</i> da expressão de granzima A e citocinas entre sub-populações linfocitárias em pacientes com LC antes e após o tratamento.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS

CAA - Célula apresentadora de antígeno
CMSP - Células mononucleares do sangue periférico
Células T $\alpha\beta$ DN - Células T $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ duplo negativas
FITC - Isotiocianato de fluoresceína
IFN- γ - Interferon gama
IL-10 - Interleucina 10
IL-17- Interleucina 17
LC - Leishmaniose cutânea
MHC - Complexo principal de histocompatibilidade
MST - Montenegro *skin test*
NKT - Célula T *natural killer*
NKT DN - Células T *natural killer* CD4⁻CD8⁻ duplo negativa
NKT CD4⁺ - Células T *natural killer* CD4
OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS -Tampão salina-fosfato
PE - Ficoeritrina
SLA - Antígeno solúvel de *Leishmania*
TCR - Receptor de célula T
Th0 - Células T auxiliares do tipo 0
Th1 - Células T auxiliares do tipo 1
Th2 - Células T auxiliares do tipo 2
Th3 - Células T auxiliares do tipo 3
Th17- Células T auxiliares do tipo 17
TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa
TGF- β -Fator de crescimento transformante-beta
V α - Região variável da cadeia alfa do receptor de célula T
V β - Região variável da cadeia beta do receptor de célula T

ABSTRACT

Leishmaniasis is caused by the infection with the protozoan parasite *Leishmania* and causes serious morbidity worldwide. *Leishmania* parasitizes human cells and the cellular immune response is essential for controlling infection. Whereas the acquired T cell mediated protection against intracellular pathogens such *Leishmania* has been well studied, the antigens that trigger this response and how these T subpopulations recognize these *Leishmania* antigens is still unknown. Moreover, the cells and mechanisms involved in their innate control are also poorly understood. This work was designed to better understand the role that distinct T cell subpopulations play in disease progression or development of protective immune response against *L. braziliensis* in humans. In order to measure host's T cell response to *Leishmania* infection, in the first part of this work, we have utilized a sensitive and powerful method of monitoring the expansion, activation state, and functional potential of specific T cells as identified by their T cell receptor (TCR) variable beta (V β) region expression. In a group of well-defined cutaneous leishmaniasis (CL) patients, we evaluated these characteristics in nine different T cell subpopulations as identified by their V β region (V β 2, 3, 5.1, 5.2, 8, 11, 12, 17 and 24) expression, before and after specific *Leishmania* antigen stimulation. Our results showed: (1) an increase in CD4⁺ T cells expressing V β 5.2 in CL as compared to controls; (2) a *Leishmania* antigen induced increase in CD4⁺ T cells expressing V β 5.2, 11, 12 and 17; (3) a profile of previous activation of CD4⁺ V β 5.2, 11 and 24 positive T cells, with higher expression of CD69, HLA-DR, CD45RO, IFN-gamma, TNF-alpha and IL-10 in CL; (4) a positive correlation between higher frequencies of CD4⁺V β 5.2⁺ T cells and lesion size; (5) At lesion site the majority of CD4⁺ T cells expressed V β 5.2. Besides of study the CD4⁺ T sub-populations expressing different V β , we also evaluated two distinct T cells subpopulations in peripheral blood from CL patients, the NKT cells and alpha/beta CD4⁺CD8⁻ double negative cells, and their important role in the development of protective and/or pathogenic immune responses in human CL disease. NKT cells are among the cell types that have been postulated to link the innate and adaptive arms of the immune system and are candidates being able to respond rapidly and subsequently to activate other cell types. Although NKT cells are a small subpopulation in the peripheral blood, they play crucial roles in early stages of infections with various pathogens, including protozoa, and recognize glycolipids presented by CD1d molecules. Our group has examined T cell responses in human CL caused by *L. braziliensis* and has determined that alpha/beta CD4⁺CD8⁻, double negative (DN) T cells, are the second most prevalent cellular source of Th1 type cytokine producing cells. In the second and third parts of this work, we evaluated leucocytes freshly isolated, as well as *in vitro* before and after culture with soluble *Leishmania* antigen (SLA), from a group of well-defined cutaneous leishmaniasis (CL) patients before and after treatment and a group of normal individuals. Within this population, we identified the functional role of distinct subpopulations of semi-invariant natural killer T (iNKT) cells, double negative CD4⁻ CD8⁻ (DN NKT) and CD4⁺ semi-invariant natural killer (CD4⁺ NKT) T cells, as well as the alpha/beta CD4⁺CD8⁻, double negative (DN) T cells. Strikingly, NKT cells were decreased in CL patients as compared with control group, and the double negative NKT and CD4⁺ NKT cells are hyperactivated naturally. Furthermore, we found that while this antigen-specific NKT DN subpopulation is also a high IL-17 producer, and express cytotoxic features, CD4⁺ NKT cells have a spontaneously inflammatory profile with higher IFN- γ producing cells. Lastly, we studied the functional behavior of both NKT subtypes and $\alpha\beta$ DN T cells, comparing their activation and memory marker expression, as well as cytokines production and cytotoxicity, after the patient's treatment. Summarizing, our results demonstrated that $\alpha\beta$ DN T cells present higher cytotoxic potential and higher IL17 producing cells in active disease. Moreover, the NKT cells are high IFN- γ producers compared with $\alpha\beta$ DN T cells. Curiously, after treatment the DN NKT and $\alpha\beta$ DN T cells increased IL-10 expression while CD4⁺ NKT cells decreased the expression of this cytokine, as compared with before treatment. Thus, we suggest an inflammatory nature for both NKT subpopulations and maybe a pathogenic role for $\alpha\beta$ DN T cells in active infection by *L. braziensis*. These findings suggest that these subpopulations may be important in the direction of initial immune response in CL patients, as well as for induction of pathogenic or protective responses. Given that CL involves some level of pathology (lesion) and is often followed by longlived protection and cure, the identification of specific subpopulations active in this form of disease could allow for the discovery of immunodominant *Leishmania* antigens important for triggering efficient host responses against the parasite, or identify cell populations most involved in pathology.

RESUMO

A leishmaniose é causada pela infecção com o protozoário *Leishmania* e causa grave morbidade em todo mundo. A resposta imune celular contra as células parasitadas é essencial para o controle da infecção. Enquanto a proteção mediada por células T contra patógenos intracelulares como a *Leishmania* está bem estabelecida, os antígenos responsáveis pelo desenvolvimento dessa resposta e como ocorre o reconhecimento dos antígenos de *Leishmania* é ainda pouco compreendido. Além disso, as células e mecanismos envolvidos no seu controle inato são também pobremente conhecidos. Este trabalho foi delineado com a finalidade de melhor entender o papel que distintas sub-populações de células T desempenham na progressão da doença ou no desenvolvimento de uma resposta imune protetora contra a *Leishmania braziliensis* em humanos. Como medida da resposta de células T do hospedeiro pela infecção por *Leishmania*, na primeira parte desse trabalho, nós utilizamos um poderoso e sensível método para monitorar a expansão, estado de ativação e potencial funcional de células T específicas, identificadas pela expressão da região variável beta (V β) do receptor de células T (TCR). Estudando um grupo bem definido de pacientes com leishmaniose cutânea (LC), avaliamos as características de nove diferentes sub-populações de células T CD4⁺ identificadas pelas regiões V β expressando V β 2, 3, 5.1, 5.2, 8, 11, 12, 17 e 24, antes e após estímulo antígeno específico com o antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA). Nossos resultados mostraram: (1) aumento das células T CD4⁺ expressando o V β 5.2 nos pacientes com LC comparados aos controle; (2) SLA induz um aumento de células T CD4⁺ expressando o V β 5.2, 11, 12 e 17; (3) um perfil de ativação prévia das células T CD4⁺ expressando o V β 5.2, 11 e 24, com maior expressão de CD69, HLA-DR, CD45RO, IFN- γ , TNF- α e IL-10 nos pacientes com LC; (4) correlação positiva entre maiores freqüências de células T CD4⁺ expressando V β 5.2 e maiores lesões; (5) no sítio da lesão, a maioria das células T CD4⁺ expressam V β 5.2. Além de estudar as células T CD4⁺ expressando diferentes regiões V β do TCR, nós também avaliamos duas distintas sub-populações de células T do sangue periférico de pacientes com LC, as células NKT e as células T $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ duplo negativas ($\alpha\beta$ DN) e seu importante papel no desenvolvimento de resposta imune protetora ou patogênica na LC humana. Células NKT estão entre os tipos celulares postuladas em ligar a resposta inata e adaptativa do sistema imune sendo capazes de responder rapidamente e, subsequentemente, ativar outros tipos celulares. Embora as células NKT sejam uma sub-população relativamente pouco freqüente no sangue periférico, elas desempenham papéis cruciais no início da infecção com vários patógenos, incluindo protozoários, e reconhecem glicolípides apresentados por CD1d. Nosso grupo, examinando pacientes com LC, causada por *L. braziliensis*, determinou que as células T $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ duplo negativas, são a segunda fonte produtora de IFN- γ no sangue periférico. Nas segunda e terceira partes deste trabalho, nós avaliamos leucócitos *ex vivo*, como também *in vitro* antes e após estímulo com o SLA, de um grupo bem definido de pacientes com LC, tanto antes quanto após o tratamento da LC; avaliamos também leucócitos de indivíduos não infectados. Dentro dessa população, nós identificamos o papel funcional de distintas sub-populações de células NKT semi-invariantes (NKT CD4⁻CD8⁻ DN e NKT CD4⁺), como também das células T $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ duplo negativas. De forma interessante, as células NKT apresentaram-se em menor freqüência no sangue de pacientes com LC, comparadas ao grupo controle, além das células NKT DN e CD4⁺ serem hiperativadas naturalmente. Além disso, nós encontramos que células NKT DN são antígeno específicas, mais citotóxicas e maiores produtoras de IL-17, enquanto que as células NKT CD4⁺ possuem perfil inflamatório espontâneo com maior produção de IFN- γ , ambas na doença ativa. Por último, estudamos o comportamento funcional de ambos sub-grupos de células NKT e de células T $\alpha\beta$ DN, comparando entre elas marcadores de ativação e memória, como também produção de citocinas e citotoxicidade, após o tratamento dos pacientes com LC. Resumindo, nossos resultados demonstraram que as células T $\alpha\beta$ DN apresentam forte perfil citotóxico e alta produção de IL-17 na doença ativa. Além disso, as células NKT são maiores produtoras de IFN- γ do que as células T $\alpha\beta$ DN. Curiosamente, após o tratamento da LC, as células T $\alpha\beta$ DN e NKT DN apresentam freqüência aumentada de IL-10 e as células NKT CD4⁺ diminuem a produção desta citocina, em relação a produção antes do tratamento. Dessa forma, nós sugerimos uma natureza inflamatória para ambas sub-populações de células NKT e talvez um papel patogênico para as células T $\alpha\beta$ DN na infecção ativa causada por *L. braziliensis*. Essas descobertas sugerem que essas sub-populações podem ter uma importância no direcionamento da resposta imune inicial nos pacientes com LC, como também podem ser capazes de levar a um perfil protetor ou patogênico. Dado que a leishmaniose cutânea envolve algum nível de patologia (lesão) e, frequentemente, é seguida por um longo tempo de proteção e cura, a identificação de sub-populações específicas ativas nessa forma da doença, poderia nos permitir a descoberta de antígenos imunodominantes de *Leishmania*, importantes por induzirem respostas contra o parasita, ou identificar populações mais envolvidas na patologia.

1 INTRODUÇÃO

1.1 O sistema imunológico e a importância do estudo das células T

O sistema imune é definido, historicamente, como proteção contra doenças, em particular, doenças infecciosas. O sistema imune de mamíferos é baseado na co-existência de duas estratégias, agora comumente referidas como imunidade inata e adaptativa. A resposta imune inata baseia-se no reconhecimento de modelos moleculares conservados associados à patógenos por diferentes receptores, codificados pela linhagem germinal, com estruturas fixas. Já a resposta imune adaptativa permite o reconhecimento de um repertório potencialmente ilimitado de antígenos por receptores específicos de estruturas variáveis (imunoglobulinas e receptores de células T - TCR), obtidos por recombinações aleatórias de segmentos genômicos (Dutronec, Y. & Porcelli, S.A, 2002).

O sistema imune adaptativo pode ser dividido como sistema imune humoral e sistema imune celular, no qual as principais células são os linfócitos B e T. Linfócitos são células que têm a capacidade de reconhecer especificamente diferentes determinantes antigênicos. Eles podem ser divididos em grupos distintos por suas funções e produtos protéicos (Abbas A. & Janeway C. A. Jr., 2000).

Linfócitos T constituem distintos subgrupos e podem desempenhar diferentes funções. Durante o desenvolvimento das células T no timo, um amplo repertório de receptores antigênicos é produzido a partir de progenitores diferenciados. Os receptores antigênicos dos linfócitos T são extremamente variáveis nas suas especificidades antigênicas, tornando um indivíduo capaz de produzir uma resposta imune contra uma grande variedade de patógenos encontrados durante toda sua vida (Davis, M. M. & Bjorkman, P.J., 1988). A Figura 1 mostra as principais sub-populações de linfócitos T descritas até o momento, definidas pela expressão de moléculas de superfície como CD4 e CD8 e TCR alfa/beta e gama/delta duplo negativas, como também as células NKT.

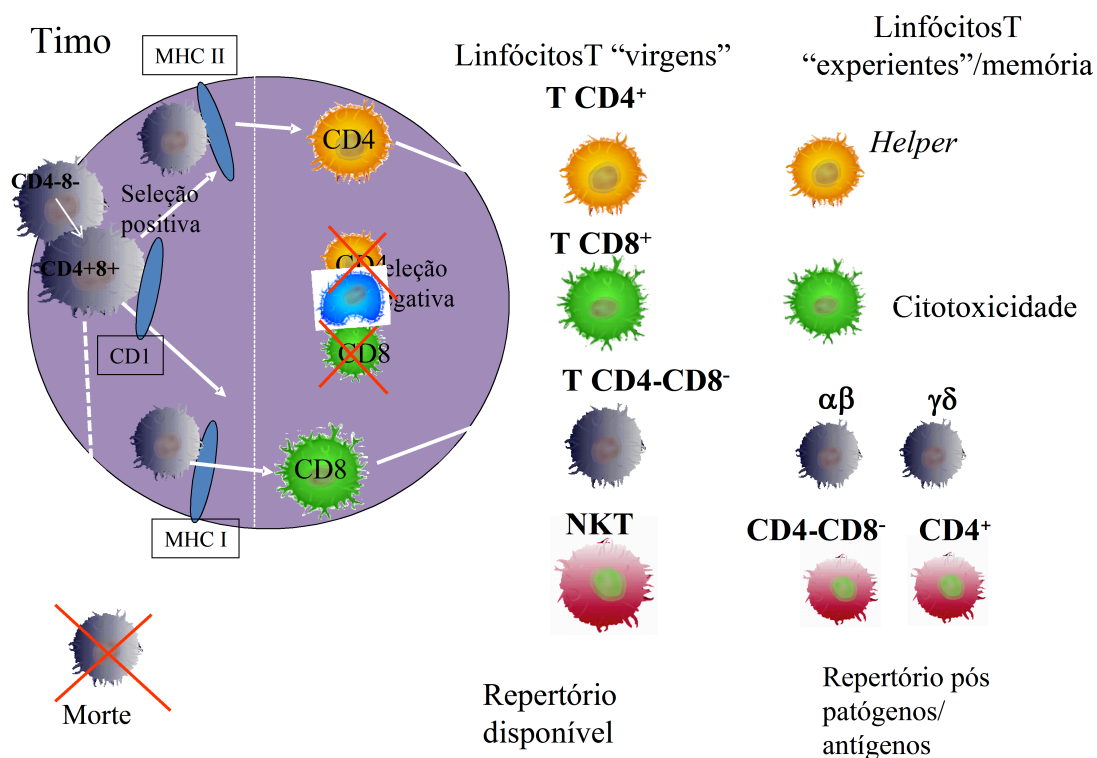


Figura 1: Sub-populações de linfócitos T e geração de repertório. Figura ilustrativa sobre a geração de linfócitos T no timo.

Os receptores de antígenos dos linfócitos, na forma de imunoglobulinas nas células B e receptores de células T (TCR) nas células T, atuam como sensores por meio dos quais os linfócitos detectam a presença do antígeno em seu ambiente (Viola, A. & Lanzavecchia, 1996; Lennon, G. P., *et al.*, 2000).

O TCR é composto por pares de glicoproteínas ($\alpha\beta$ ou $\gamma\delta$), ligadas por pontes dissulfeto, e que são responsáveis pelo reconhecimento antigênico (Meuer, S. C., *et al.*, 1983; Brenner M. B., *et al.*, 1985). As cadeias α e β formam o tipo mais comum de TCR e são compostas por sub-regiões V e J ou V, D e J, respectivamente, que, combinadas, proporcionam a especificidade do receptor (Herman, A., *et al.*, 1991). Em cada cadeia, a região variável está ligada a uma região constante (C) invariável. A geração da uma grande diversidade de TCRs funcionais é obtida por mecanismos de recombinação de segmentos gênicos descontínuos. Esses fragmentos são arranjados durante o desenvolvimento dos linfócitos por recombinação somática do DNA para formar a sequência completa da região variável, um mecanismo conhecido como rearranjo gênico, e este rearranjo ocorre no timo (Goldrath, A. W. & Bevan, M. J., 1999; Ali M. *et al.*, 2003).

Somente um *locus* gênico é rearranjado de cada vez, e os *loci* são rearranjados em uma sequência fixa. Em primeiro lugar, tanto as células B quanto as células T rearranjam o *locus* dos segmentos gênicos D, seguido do segmento J e por último o segmento V, que para as células T será o *locus* da cadeia β do receptor de célula T (Goldrath, A. W. & Bevan, M. J., 1999; Krangel, M. S., 2003). Somente quando um rearranjo produtivo é feito, as células T rearranjam o *locus* da cadeia α . Neste estágio de desenvolvimento, as células T produzem cadeias “substitutas” que auxiliam a testar se o rearranjo do gene β foi produtivo ou não. Estes substitutos pareiam com a região constante da cadeia β para produzir “receptores” que são expressos na superfície celular (Call, M. E. & Wucherpfenning, K. W., 2005). A formação desses receptores produz sinais que resultam no fim do rearranjo VDJ. Um rearranjo gênico bem sucedido, que leva a produção de uma cadeia proteica, serve como sinal para a célula progredir para o próximo estágio de desenvolvimento, que é o rearranjo VJ na cadeia α das células T (Padovan, E., *et al.*, 1995). Durante a fase de desenvolvimento de linfócitos, o receptor é testado para suas propriedades de reconhecimento antigênico por moléculas presentes ao seu redor. A especificidade e afinidade do receptor para esses ligantes determinam o destino no linfócito imaturo; ou seja, se a célula é selecionada para sobreviver ou se ela morre sem atingir a maturidade. Os linfócitos que sobrevivem para desenvolver a população de linfócitos maduros são, dessa forma, uma pequena fração daqueles produzidos na medula óssea ou no timo. No entanto, estas células expressam um grande repertório de receptores capazes de responder a uma variedade ilimitada de estruturas. Este repertório fornece o material básico sobre o qual a seleção clonal atua na resposta imune adaptativa (Starr, T. K., *et al.*, 2003).

O reconhecimento antigênico pelo TCR faz-se pela interação com moléculas apresentadas por proteínas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) ou CD1. O sítio de ligação MHC-peptídeo ou CD1-glicolípide é formado primariamente por três regiões determinantes de complementariedade (CDRs) (Davis, M. M., & Bjorkman P. J., 1988; Arden, B., 1998; van der Merwe, P. A. & Davis, S. J., 2003). A diversidade dos receptores de células T é concentrada na região CDR3 reconhecadora do complexo MHC-peptídeo ou CD1-glicolípide, pois possui melhor mudança conformacional para o encaixe a este complexo (Davis, M. M., & Bjorkman P. J., 1988; van der Merwe, P. A. & Davis, S. J., 2003). As regiões determinantes de complementariedade, CDR1 e CDR2, que reconhecem a molécula de MHC/CD1, são codificadas dentro da linhagem germinativa variável (V) sendo bem

conservadas nas diferentes subfamílias V α e V β e, portanto, mostram limitada diversidade em relação à extrema diversidade observada em CDR3 (Arden, B., 1998).

A maioria das células T que expressa o receptor $\alpha\beta$ também expressa os co-receptores CD4 e CD8. No entanto, estes receptores são apenas expressos numa minoria das células $\gamma\delta$ (Danska, J.S., 1989). Além disso, existem sub-populações linfocitárias que não expressam esses co-receptores e, por isso, são denominadas CD4⁺CD8⁻ duplo negativas (DN). Blank e colaboradores (2003) demonstraram em modelo experimental que, a ausência de células tímicas expressando o receptor de morte programada (PD-1) aumenta a porcentagem de células T $\alpha\beta$ DN na periferia. Outro trabalho publicado anteriormente, sugeriu que as células T $\alpha\beta$ DN não continuavam o desenvolvimento tímico, até chegarem ao estágio de simples positividade (CD4 ou CD8) e que essa sub-população pode expressar preferencialmente o V β 17 do TCR (Huang L. & Cripe I. N., 1992).

Do ponto de vista funcional, os linfócitos T podem ser subdivididos em sub-populações distintas, baseado, entre outras características, no perfil de citocinas que secretam. As células T CD4⁺ classificadas em Th1 e Th2 (Mosmann, T. R. & Coffman, R. L., 1989) são derivadas de células T CD4⁺ “virgens” que se diferenciam, principalmente, sob a influência das citocinas produzidas no momento do reconhecimento antigênico. Outros fatores têm sido associados à diferenciação de células T CD4⁺ como, por exemplo, o tipo de célula apresentadora de antígeno envolvida na ativação (Mosmann, T. R. & Sad, S., 1996), a natureza e concentração do antígeno (Fitch, F. W., *et al.*, 1993) e o tipo de molécula co-estimuladora envolvida na ativação (Thompson, C. B., 1995). Entretanto, as citocinas parecem ser os elementos críticos na determinação da diferenciação funcional. Se as citocinas IL-12 e IFN- γ forem predominantes no microambiente da ativação, ocorrerá à diferenciação em Th1, enquanto IL-4 favorece a diferenciação em Th2 (Mosmann, T. R. & Sad, S., 1996; Gollob *et al.*, 1996). IFN- γ é a principal citocina efetora de células Th1, seguida por IL-2 e linfotóxina. As citocinas características de células Th2 são IL-4 e IL-5 (Mosmann, T. R. & Coffman, R. L., 1989; Gollob, K. J., *et al.*, 1996), além de IL-13 (Mckenzie, A. N., *et al.*, 1993; Karulin, A. Y., *et al.*, 2000). Em humanos, a IL-10, uma importante citocina imunomoduladora pode ser secretada tanto por células Th1 como Th2 e células T reguladoras (Assenmacher, M., *et al.*, 1994; Openshaw, P., *et al.*, 1995). As células T reguladoras expressam um fator de transcrição característico dessas células, o FOXP3, e são produtoras de IL-10 (Takahata, Y., *et al.*, 2004), já as células Th3 produzem uma importante citocina capaz

de modular respostas inflamatórias, o TGF β (Fukaura, H., *et al.*, 1996; Poszepczynska, E., *et al.*, 2000).

Uma nova linhagem de células T CD4⁺ efectoras caracterizada pela produção de interleucina 17 (IL-17), a linhagem Th17, foi identificada baseada nas suas características de diferenciação e funcionais distintas das linhagens Th1 e Th2 clássicas (Langrish, C. L., *et al.*, 2005). Em humanos, células T CD4⁺ produtoras de IL-17 necessitam de diferentes fatores para a diferenciação inicial para a sub-população Th17. Como no modelo murino, o TGF- β e a IL-6 são fatores de diferenciação para essa sub-população em humanos, mas cogita-se que outras citocinas como a IL-21, que é produzida pelas próprias Th17, além de agirem por *feedback* para aumentar a frequência dessas células, também atuam na diferenciação dessa sub-população (Mangan, P.R., *et al.*, 2006; Bettelli *et al.*, 2008).

As células T CD8⁺ parecem apresentar perfil de citocinas semelhante às células T CD4⁺ Th1 ou Th2. Estes grupos celulares são chamados Tc1 e Tc2 e já foram identificados no modelo murino e em humanos (Salgame, P., *et al.*, 1991; Coyle, A. J. *et al.*, 1995). As células T CD4⁺ e CD8⁺ funcionalmente distintas são derivadas sob condições similares: IL-12 e IFN- γ levam à diferenciação de precursores em células Th1 ou Tc1, enquanto IL-4 induz a geração de células Th2 ou Tc2 (Mosmann, T. R. & Sad, S., 1996). Adicionalmente à secreção de citocinas, células Tc1 e Tc2 medeiam efeitos citotóxicos. As células Tc2 são tão citotóxicas quanto às células Tc1 e ambos os grupos celulares agem, principalmente, por mecanismo dependente da perforina e granzima ou pela via Fas (Fowler, D. H. & Gress, R. E., 2000). A avaliação da expressão de granzima A como marcador de citotoxicidade tem sido utilizada durante as infecções virais, rejeições de enxerto e doenças auto-imunes. Essa expressão está principalmente associada com células T CD8⁺, mas células T CD4⁺ também expressam essa molécula citotóxica (Frischholz, S., *et al.*, 1994).

Células T duplo negativas CD4⁻CD8⁻ (DN) são uma sub-população de linfócitos T que podem expressar tanto o TCR $\alpha\beta$ quanto o $\gamma\delta$ e sua identificação no sangue periférico foi descrita há vários anos (Porcelli S., *et al.*, 1992; Porcelli S., *et al.*, 1993). O reconhecimento e as atividades efectoras das células T DN que expressam o TCR $\alpha\beta$, ocorrem principalmente por ligação do TCR ao complexo CD1/glicolípide presente nas CAA e esse tipo de resposta tem sido identificada na tuberculose, lepra e doenças auto-imunes (Dutronec, Y. & Procelli, S.A, 2002; Sieling, P. A., *et al.*, 2005). Pesquisadores demonstraram, pela análise de

antígenos de *Mycobacterium*, que as células T DN expressando o TCR $\alpha\beta$ são as principais sub-populações que reconhecem esses antígenos via CD1 (Porcelli S., *et al.*,1993).

Alguns estudos mostraram que a perda dos co-receptores CD4 e CD8 permite que essas sub-populações tolerem estimulação crônica, diferentemente das células T CD4 e CD8 convencionais que recebem sinal de apoptose quando sofrem estimulação crônica, inibindo sua proliferação (Hamad, A.R., *et al.*,2001). Outros trabalhos demonstraram que células T duplo negativas são funcionalmente maduras e podem ser ativadas para produzir citocinas e proliferar (Groh, V., *et al.*,1989). Em humanos, o papel exato dessa sub-população ainda não é muito claro, e células T $\alpha\beta$ duplo negativas representam menos de 1% da sub-população no sangue periférico de indivíduos saudáveis (Porcelli S., *et al.*,1993) e apresentam perfis de ativação, memória e citotoxicidade. Estudos em camundongos também demonstraram que essa rara sub-população de linfócitos expressa marcadores de ativação e memória associados com citotoxicidade e capacidade de secretar a citocina pró-inflamatória IFN- γ (Priatel, J. J., *et al.*, 2001). Outros trabalhos demonstraram a evidência do envolvimento das células T $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ DN em doenças infecciosas causadas por patógenos intracelulares (Kadena, T., *et al.*,1997; Bottrel, R. L., *et al.*,2001). A sub-população de células T DN é importante fonte produtora de IFN- γ na leishmaniose cutânea humana e podem estar envolvidas com perfil inflamatório nesta doença (Bottrel, R. L., *et al.*,2001; Antonelli, L. R. V., *et al.*, 2006).

Outra sub-população de linfócitos T que se desenvolve no timo, são as células NKT. Essa sub-população timo-dependente aparece tardiamente em relação aos outros subgrupos citados acima (Godfrey, D.I & Berzins, S.P., 2007). A seleção positiva de células T convencionais baseia-se no reconhecimento de peptídeo apresentado ao TCR no contexto de MHC I ou MHC II, expressos nas células epiteliais tímicas. Em contraste, a seleção de células NKT necessita de sua ligação a antígenos glicolipídicos apresentados por moléculas CD1d nos timócitos duplo positivos (DP) corticais (Godfrey, D.I & Berzins, S.P., 2007).

A maioria dos estudos no timo, em camundongos, demonstrou que as células NKT expressando o TCR $\alpha\beta$ eram duplo negativas CD4⁻CD8⁻ ($\alpha\beta$ DN) e expressavam o TCR V β 8.2 (Mallevaey T. *et al.*, 2009). A população de células NKT CD4⁺ NK1.1⁺ foi também identificada com características similares às DN no timo. Relatos subsequentes mostraram que ambas sub-populações expressavam o TCR V α 14 J α 281 associado com V β 8.2, V β 2 e V β 7, preferencialmente (Bendelac, A., 1995; Bendelac, A., *et al.*, 1997). Em humanos, células NKT são mais heterogêneas e, como em camundongos, foram identificadas como

células duplo negativas CD4⁻CD8⁻ e CD4⁺. Alguns pesquisadores demonstraram a existência de outra sub-população NKT CD8⁺, tanto no fígado quanto no sangue (Ishihara, S., *et al.*, 1999). Todos esses subgrupos de células NKT expressam, predominantemente, em humanos, as cadeias V α 24 J α 18 associadas preferencialmente com V β 11 do TCR, sendo denominadas semi-invariantes (Bendelac, A., 1995). Assim, células NKT denominadas semi-invariantes, em humanos e camundongos, possuem a região V α do TCR idênticas umas com as outras no nível de aminoácidos, mas apesar de expressarem similares V β , este pode variar, principalmente no nível de aminoácidos (Bendelac, A., *et al.*, 1997).

Na sensibilidade causada pelo contato cutâneo existe uma casacata inicial orquestrada pela imunidade inata que inclui o complemento, mastócitos e plaquetas ativadas via anticorpos IgM Campos, R.A. *et al.* 2006). Essa resposta é necessária para recrutar as células T da imunidade adquirida para o sítio da lesão. Recentemente, Campos e colaboradores (2006), demonstraram que as células NKT em colaboração com linfócitos B-1 induzem o início desse processo, demonstrando a importância das células NKT em processos inflamatórios iniciais.

A imunidade mediada por células T tem um papel central na resposta a patógenos intracelulares tanto diretamente, por mediarem respostas celulares, quanto indiretamente, na regulação da produção de anticorpos. O direcionamento da resposta celular está ainda sobre o controle de quimiocinas e citocinas endógenas. Citocinas são produzidas por diversas células do sistema imune e, no meio ambiente em que a resposta imune está se desenvolvendo, podem levar a homeostase entre ambiente inflamatório *versus* ambiente anti-inflamatório (de Almeida, M. C., *et al.*, 2003).

As citocinas podem ser agrupadas em duas subdivisões principais de acordo com suas funções, pró e anti-inflamatórias. Classicamente, são descritas como citocinas inflamatórias: IL-1, IL-6, IFN- γ , TNF- α , sendo as duas últimas amplamente estudadas em doenças crônicas, cuja patologia associada é de natureza inflamatória. O TNF- α é uma importante citocina pró-inflamatória, produzida por macrófagos, células NK e linfócitos, envolvida em mecanismos de estimulação das células endoteliais, macrófagos e na apoptose (Beutler B., 1995). Atua sinergicamente com o IFN- γ , outra citocina pró-inflamatória, induzindo a ativação de macrófagos e estimulando-os a produzir óxido nítrico. Isso também acontece com citocinas mais ativas na resposta imune inata, como o IFN- α e IFN- β (Aggarwal, B. B. & Eessalu T. E., 1987). Células Th17 podem induzir células a produzirem TNF- α , como também

produzem essa citocina pró-inflamatória (Beklen, A., *et al.*, 2007). O TNF- α pode ter sua produção inibida por outras citocinas como IL-4, IL-13, IL-10 e TGF- β .

O IFN- γ é produzido por células NK e células T e exerce um papel importante na resposta imune celular contra patógenos intracelulares pela ativação de macrófagos, os quais exercem atividade microbicida pela síntese de óxido nítrico (NO) (Rogers, K. A., *et al.*, 2002) e pela produção de um número aumentado de enzimas lisossomais, responsáveis pela destruição do parasita *Leishmania* (Sacks, D. & Noben-Trauth, N., 2002). Essa citocina também auxilia no desenvolvimento mais eficaz da resposta Th1. Além disso, já foi demonstrado que o IFN- γ sozinho modula o desenvolvimento de células T CD4⁺ virgens em direção ao perfil Th1 (Gollob, K. J., *et al.*, 1996).

Uma importante citocina classificada como anti-inflamatória, é a IL-10, produzida por macrófagos e por algumas sub-populações de células T CD4⁺, cuja principal função é modular a resposta imune, inibindo os macrófagos ativados, evitando a exacerbação dessa resposta (Mocci, S. & Coffman, R. L., 1995; Muraille, E. & Leo, O., 1998).

Células T CD4⁺ efectoras podem produzir uma diversidade de citocinas e outra importante citocina é a interleucina 17 (IL-17), produzida por uma linhagem denominada Th17, distintas das linhagens Th1 e Th2 clássicas (Langrish, C. L., *et al.*, 2005). Alguns estudos têm mostrado que as células Th17 são potentes indutoras de auto-imunidade, devido à promoção de inflamação tecidual e mobilização do sistema imune inato. Contudo, em alguns tecidos como o intestino e o fígado (Zenewicz, L. A., *et al.*, 2007), células Th17 podem desempenhar papel modulador e protetor. Outros estudos demonstraram que essa sub-população também pode estar envolvida em doenças infecciosas, auxiliando no início da infecção, pelo recrutamento de neutrófilos (Bettelli, E., *et al.* 2007; Bettelli, E., *et al.*, 2008).

O conhecimento sobre as características funcionais de diferentes sub-populações de linfócitos envolvidos com o desenvolvimento e duração de diversas doenças, do ponto de vista da análise da expressão de moléculas e citocinas, bem como sobre o estudo do repertório nos fornecem importantes informações sobre as ações dessas células durante a doença. Para melhor entendimento da patologia, é de grande importância o estudo funcional de diferentes populações celulares e quais são os mecanismos utilizados por essas populações na erradicação da doença e, principalmente, na sua prevenção.

1.2 Leishmaniose e linfócitos T no modelo experimental e na doença humana

Na grande maioria das pesquisas, o estudo de doenças em modelos experimentais, principalmente em camundongos, tem sido de grande auxílio na descoberta de vários mecanismos imunológicos associados à imunopatologias e imunorregulação. Camundongos *Knockout*, depletados de genes específicos, tem sido bastante utilizados como uma ferramenta na compreensão de certos aspectos imunológicos em diversas infecções experimentais. No entanto, deve-se considerar que a transferência dos dados obtidos em modelos experimentais para a busca do entendimento das doenças humanas deve ser feito com cautela, especialmente considerando-se as características inerentes aos diferentes hospedeiros.

No modelo murino da infecção com *Leishmania major*, a sub-população predominante na resposta ao parasita é composta pelas células T CD4⁺. Este predomínio pode ser devido à co-localização de moléculas MHC de classe II nos vacúolos parasitóforos, sugerindo um mecanismo pelo qual a resposta imune para esse organismo intracelular torna-se dependente de Classe II e CD4 (Reiner, S. L. & Locsley, R., 1995; Rogers, K. A., *et al.*, 2002). Linhagens de camundongos considerados resistentes como CBA, C3H/HeN ou C57BL/6, desenvolvem um padrão da doença que se assemelha à leishmaniose cutânea localizada humana. Durante a infecção, esses animais desenvolvem lesões locais pequenas e são capazes de destruir os parasitas e de montar uma resposta imune protetora evoluindo para a cura espontânea (Rogers, K. A., *et al.*, 2002). Esses modelos que apresentam resistência mostram um perfil de resposta celular do tipo Th1, que é determinada pela produção de IL-12 por macrófagos e células dendríticas. A IL-12 induz a secreção de IFN- γ , necessário para o controle do parasita, que é produzido por células NK e células T previamente ativadas (Reiner, S. L. & Locsley, R., 1995; Sacks, D. & Noben-Trauth, N., 2002).

Em animais susceptíveis a infecção por *L. major*, como camundongos BALB/c, o perfil de resposta de células T é do tipo Th2, em que ocorre a produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que inibem a proliferação de células Th1 e síntese de IL-12 e IFN- γ (Reiner, S. L. & Locsley, R., 1995; Sacks, D. & Noben-Trauth, N., 2002). A resposta Th2 nesses animais é caracterizada por inibição dos macrófagos e proliferação do parasita devido à regulação negativa da subunidade $\beta 2$ do receptor de IL-12 com inibição da produção de IFN- γ e NO (óxido nítrico) (Rogers, K. A., *et al.*, 2002). Estudos em nosso laboratório demonstraram que camundongos dessa linhagem infectados com *L. major*, tratados com N-acetilcisteína (NAC), um agente precursor da glutatona, apresentam menor destruição e parasitismo tecidual,

modulando a resposta imune, com melhora da cinética da produção da infecção, indicando assim, que a glutathiona é importante para o controle da progressão da leishmaniose no modelo murino. Estes estudos mostraram ainda que a modulação da resposta foi associada a produção de TNF- α e IFN- γ (Rocha-Vieira, E., *et al.*, 2003). De forma interessante, os perfis de resistência e susceptibilidade, no modelo experimental, estão associados ao parasita, de modo que uma cepa resistente a *L. major* pode ser sensível a outra espécie de *Leishmania* (Afonso, L. C. & Scott P., 1993). Desta forma, além do *background* genético do hospedeiro, fatores associados ao parasita devem ter um papel importante no desenvolvimento da doença.

No que se refere à participação de distintas subpopulações celulares, evidências apontam para a contribuição das células T CD8⁺ no controle da leishmaniose cutânea murina (Millon *et al.*, 1986; Titus, R. G., *et al.*, 1987; Muller I., *et al.*, 1993). Durante infecção experimental com *L. major*, um maior número dessas células é detectado em camundongos resistentes quando comparados aos susceptíveis (Millon *et al.*, 1986). Além disso, a administração de anticorpos monoclonais anti-CD8 causam a exacerbação das lesões cutâneas tanto nos camundongos susceptíveis quanto nos resistentes (Titus, R. G., *et al.*, 1987). Acredita-se que a função protetora associada às células T CD8⁺ na leishmaniose cutânea experimental esteja relacionada à sua capacidade de produzir IFN- γ além da sua atividade citolítica capaz de destruir os macrófagos parasitados (Muller, I., *et al.*, 1993; Belkaid Y., *et al.*, 2002).

Estudos em modelos murinos, mostraram que as células T CD4⁻CD8⁻ (DN) exibem marcadores de ativação, atividade citolítica *ex vivo* e capacidade de secretarem rapidamente IFN- γ . Além disso, elas podem competir por IL-2 produzida por linfócitos T auxiliares, inibindo a expansão de células T CD8⁺ (Priatel, J. J., *et al.*, 2001). A ativação de células NKT por glicolípides pode melhorar a resistência em vários modelos de doenças infecciosas, incluindo infecções por vírus, bactérias e parasitas (Hayakawa, Y., *et al.*, 2001; Parekh, V. V., *et al.*, 2005). Estudos em doenças parasitárias mostraram que a alfa/galactosil ceramida, um glicolípide sintético capaz de ativar células NKT, mostrou induzir resistência à malária, tripanosomíase e toxoplasmose (Duthie, M. S. & Kahn, S. J., 2002; Ronet, S.C., *et al.*, 2005). Estudos têm demonstrado que células NKT, além de terem características Th1 e Th2, também apresentam perfil Th17 (Niemeyer, M., *et al.*, 2008). Pesquisadores têm mostrado, em modelos murinos, que a principal fonte de IL-17 nas células NKT, foram as sub-populações NKT CD4⁻CD8⁻ duplo negativas (DN), e que essas sub-populações produzem altos níveis de IL-17 após 2-3 horas de ativação (Coquet, J.M., *et al.*, 2008; Michel, M.L., *et al.*, 2008).

Em humanos, a resposta imune à *Leishmania* e as propriedades do parasita são muito importantes para se determinar o resultado da infecção (Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996; Murray, H. W., *et al.*, 2005). Fatores capazes de alterar a intensidade e natureza da resposta imune celular controlam o estabelecimento e a progressão da resposta do hospedeiro a agentes patogênicos. Muitos destes fatores já foram estudados, incluindo aspectos relacionados ao agente patogênico, como a influência do tipo de patógeno (Williams, O., *et al.*, 1995) e a prévia exposição do hospedeiro a este agente. Além disso, aspectos relacionados ao hospedeiro, como o repertório de células T e *background* genético do indivíduo, também têm sido alvo de inúmeros estudos (Sornasse, T., *et al.*, 1996; Dutra *et al.*, 2009). Neste contexto, dependendo do resultado da relação entre os fatores do hospedeiro e do agente patogênico, a dinâmica da resposta celular pode levar ao estabelecimento da patologia ou à cura da infecção (Weigle, K. & Saravia, N.G., 1996; Murray, H. W., *et al.*, 2005).

A leishmaniose é considerada como uma doença emergente e re-emergente devido a um aumento preocupante da sua incidência nas últimas duas décadas, em certos lugares do mundo, relacionada com a migração de pessoas da área rural para as zonas urbanas, devido a oportunidades de trabalho, migração como consequência da guerra, distúrbios do meio ambiente por causa das mudanças climáticas e intervenção humana, deterioração de condições sócio-econômicas e presença de co-infecção com o vírus do HIV (Dejeux, P., 2004; Goto, H. & Lindoso, J. A. L., 2010). A leishmaniose compreende as formas visceral e tegumentar, incluindo as formas cutâneas e mucocutâneas. A leishmaniose tegumentar é prevalente em 82 países, e sua incidência é estimada em 1,5 milhões de casos por ano. A maioria dos casos (90%) é relatada na África (principalmente em Marrocos, Etiópia, e Tunísia), no oriente médio (principalmente no Afeganistão, Paquistão, Iran, Iraque, Síria e Arábia Saudita) e na América Latina (principalmente no Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) (Dejeux, P., 2004; Murray, H. W., *et al.*, 2005).

Diferentes linhagens de *Leishmania*, do gênero *Leishmania* e subgênero *Leishmania* ou *Viannia*, incluem aproximadamente 20 espécies que diferem na sua distribuição geográfica. Na Ásia, África e Europa, a leishmaniose tegumentar é causada por *Leishmania (Leishmania) major*, *Leishmania (Leishmania) tropica*, *Leishmania (Leishmania) aethiopica* e alguns zimodemas da *Leishmania infantum*. No novo mundo, principalmente na América Latina, as espécies são numerosas e do subgênero *Leishmania* e *Viannia*. *Leishmania (Viannia) braziliensis* é a mais prevalente, seguida da *Leishmania amazonensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Viannia) panamensis*, embora outras espécies como

Leishmania (Leishmania) mexicana, *Leishmania (Leishmania) pifanoi*, *Leishmania (Leishmania) venezuelensis*, *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Leishmania) shawi* e *Leishmania (Viannia) lainsoni* estão presentes na região do Amazonas e na América Central (Goto, H. & Lindoso, J. A. L., 2010). No velho mundo *Leishmania (Leishmania) donovanni*, pode causar a forma clínica cutânea, durante ou após a leishmaniose visceral e é conhecida como leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC) (Murray, H. W., et al, 2005).

A forma visceral ou calazar é predominantemente causada por *L. donovani* ou *L. infantum* no velho mundo. No novo mundo é causada por *L. chagasi*, e já foi notificada em pelo menos 12 países da América Latina (Desjeux, P., 1996).

A leishmaniose tegumentar americana apresenta manifestações clínicas diferentes, que podem ser classificadas como: leishmaniose cutânea localizada, leishmaniose mucosa, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose disseminada e leishmaniose recidiva cútis (Goto, H. & Lindoso, J. A. L., 2010). Na leishmaniose tegumentar, a forma clínica mais freqüente é a leishmaniose cutânea localizada, tendo como característica o desenvolvimento de lesões únicas ou múltiplas na derme, que usualmente respondem à terapia antimonial (Carvalho, E. M. et al., 1985; Carvalho, E. M., et al., 1994; Cabello, P. H. et al., 1995). Pode haver comprometimento de linfonodos regionais (Barral, A., et al., 1995; Sousa, A. Q., et al., 1995; Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996), levando a um quadro de linfadenite granulomatosa, que geralmente antecede a lesão cutânea. O período de incubação da *Leishmania* pode levar poucos dias ou meses. Uma pequena pápula vermelha aparece no sítio da picada, mostrando uma infiltração de células tais como: linfócitos, macrófagos e granulócitos (Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996; Murray, H. W., et al., 2005). Uma fina crosta usualmente se desenvolve, encobrindo a úlcera. A cura espontânea pode ocorrer entre dois meses e um ano, contudo lesões secundárias podem surgir (Dowlati, Y., 1996; Cunningham, A. C., 2002).

A espécie *L. braziliensis* é a mais freqüente e mais amplamente difundida no Brasil, ocorrendo por todo o país, exceto ao norte do rio Amazonas (Coutinho, S. G., et al., 1996). Essa espécie pode causar a doença tanto na forma cutânea, quanto na forma mucosa. Nesta última forma, a lesão primária ocorre no sítio inicial da picada na pele, sendo similar as outras espécies de *Leishmania*, mas a infecção também envolve as mucosas das cavidades nasal e oral, causando degeneração dos tecidos moles e cartilagosos. Essas ulcerações são desfigurantes nos lábios, nariz, palato mole e duro e cordas vocais (Castes, M. et al., 1984; Castes, M., et al., 1993; Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996). A freqüência da leishmaniose mucosa varia de acordo com a localização geográfica. No Brasil, varia de 0,4% no sul do país,

a 1,4% na região central e 2,7% no nordeste (Jones, T. C., *et al.*, 1987; Goto, H. & Lindoso, J. A. L., 2010). Outras espécies que estão também relacionadas a esta forma clínica são: *L. panamensis* e *L. guyanensis* no novo mundo e no velho mundo *L. major* e *L. donovani* e *L. infantum* em pacientes imunossuprimidos (Desjeux, P., 1996; Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996).

O tratamento da leishmaniose mais utilizado atualmente é baseado no uso de compostos de antimônio, principalmente os antimoniais pentavalentes (Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996; Desjeux, P., 1996; de Almeida, M. C. *et al.*, 2003). A utilização dessas drogas apresenta alguns efeitos colaterais e pode levar a sérios problemas durante o tratamento ou, em alguns casos, se utilizadas por muito tempo. Apesar da pesquisa envolvida para a descoberta de terapias eficazes anti-*Leishmania* ser uma preocupação mundial, o progresso nesse campo não tem sido muito expressivo. A vacinação aparece, então, como uma possível maneira de se controlar a leishmaniose. Entretanto, até agora, poucas foram as estratégias de imunização, em humanos, que tiveram algum sucesso (de Almeida, M. C., *et al.*, 2003). Avanços no conhecimento imunológico da leishmaniose trarão novas respostas que poderão contribuir para maior entendimento que pode levar em desenvolvimento de melhores terapêuticas ou até mesmo na cura da doença.

Pacientes infectados pela espécie *L. braziliensis* que apresentam a forma clínica cutânea, em sua maioria, evoluem para a cura após o tratamento (Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996). Um bom prognóstico para leishmaniose cutânea está relacionado ao predomínio de resposta Th1, nos momentos iniciais da infecção, já que isso leva a produção de IFN γ , TNF α e ativação de macrófagos infectados pelo parasita (Liew, F. Y., *et al.*, 1999). Magalhães em 1986, quando analisou lesões de pacientes com leishmaniose cutânea antes e após a terapia com Glucantime e Anfotericina B., apesar do infiltrado inflamatório não ter sido modificado pelos diferentes tipos de tratamento, o autor salientou que o fenômeno de necrose constitui um dos mecanismos eficazes de redução do parasitismo (Magalhães 1986). Assim, na fase inicial, a maioria das formas amastigotas seria eliminada, juntamente com as células necróticas, e na fase posterior ocorreria a eliminação dos parasitas pelas células que os albergam. Por razões ainda desconhecidas, em algumas ocasiões, a doença pode evoluir para forma clínica mucosa causando lesões mais graves, e pode estar associada a um tipo exacerbado de resposta Th1, pouco controlado em estágios mais tardios da infecção (Bacellar, O. *et al.*, 2002; Faria, D. R., *et al.*, 2005). Enquanto que respostas Th1 medeiam à proteção contra patógenos intracelulares, como a *Leishmania*, seu controle durante a evolução da

resposta parece ser fundamental para evitar a destruição tecidual. Embora a resposta Th1 tenha sido bastante estudada na doença humana, o papel de células produtoras de outra citocina pró-inflamatória, a IL-17, e seus mecanismos ainda são pobremente compreendidos na leishmaniose humana.

Estudos realizados em nosso laboratório em células mononucleares de sangue periférico (CMSP) de indivíduos com leishmaniose cutânea demonstraram que, um antígeno de *L. braziliensis* denominado SLA (antígeno solúvel de *Leishmania*), foi capaz de aumentar a frequência de linfócitos produtores de IFN- γ e TNF- α , e que as sub-populações de células T CD4⁺, seguidas de CD4⁺CD8⁻ (DN) e CD8⁺ são as maiores produtoras de IFN- γ . Em pacientes com leishmaniose cutânea, não foram observadas frequências detectáveis de células produtoras de IL-4 e IL-5 após estímulo com SLA (Bottrel, R. L. *et al.*, 2001). Outro trabalho, realizado também pelo nosso grupo, verificou, utilizando a técnica de microscopia confocal, que as lesões de pacientes com leishmaniose cutânea possuem alta frequência de células expressando IFN- γ e que no sítio da lesão as células T CD4⁺ também são a principal fonte produtora desta citocina (Faria, D. R., *et al.*, 2005).

Antonelli e colaboradores em 2004, utilizando a técnica de citometria de fluxo, analisaram CMSP de pacientes com LC, estimuladas com SLA. Este estudo demonstrou a existência de uma correlação positiva entre as células produtoras das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α com a citocina anti-inflamatória IL-10. Na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, esta citocina age como imunomoduladora, regulando outras citocinas e auxiliando a evitar uma resposta imune exacerbada (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004). Gaze e colaboradores (2005), analisando CMSP de pacientes com LC, após serem estimuladas com SLA, também demonstraram uma correlação positiva entre a frequência de linfócitos produtores das citocinas IFN- γ e TNF- α , ou seja, quando os linfócitos aumentaram a produção de IFN- γ , também ocorre o aumento de produção TNF- α nessas mesmas células.

Dados da literatura demonstraram que o infiltrado inflamatório de lesões de pacientes com a forma clínica cutânea é composto predominantemente por células T e por uma baixa ocorrência de macrófagos e linfócitos B (Esterre *et al.*, 1994; Ribeiro-de-Jesus *et al.*, 1998, Faria, D. R., *et al.*, 2005). Da-Cruz e colaboradores em 1994, avaliaram as frequências de células T no sangue periférico de pacientes infectados por *Leishmania braziliensis*. Anteriormente ao tratamento, foi observado o predomínio de células T CD4⁺ sobre as células T CD8⁺, no entanto, após o tratamento com antimônio houve uma redução das células CD4⁺,

com conseqüente aumento de células CD8⁺. Estes autores sugeriram a participação destas células no processo de cura da doença. Outro trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo investigou se diferentes antígenos de *Leishmania amazonensis*, encontrados nas lesões ativas comparadas com lesões curadas, seriam relevantes para os mecanismos de ativação diferencial das células T CD4⁺ e CD8⁺, e que uma redução da carga parasitária pelo uso da terapia antimonial, pode alterar as respostas ao antígeno (Coutinho, S. G., *et al.*, 1996). Já em 2005, pesquisando lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, mucosa e disseminada, Da-Cruz e colaboradores não observaram alteração no padrão da frequência dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando as lesões dos pacientes foram avaliadas antes e após tratamento com antimônio.

Na leishmaniose humana, porém, o papel das células CD8⁺ parece estar relacionado com a produção da citocina inflamatória IFN- γ , que é uma importante indutora da atividade citotóxica de linfócitos T CD8⁺, que está diretamente correlacionada à granzima A e TIA-1 (Machado *et al.*, 2002). Já foi descrito que em pacientes com a forma clínica cutânea, as lesões possuem um grande número de células TIA-1⁺ e que esta população é heterogênea, composta principalmente de linfócitos T CD8⁺ e células NK (Anderson *et al.*, 1990; Barral-Netto *et al.*, 1995; Machado *et al.*, 2002). Portanto, os linfócitos T CD8⁺ podem desempenhar um proeminente papel no estabelecimento e manutenção de uma resposta imune contra a infecção por *Leishmania*. (Da-Cruz *et al.*, 2005).

Nosso grupo demonstrou que a grande maioria das células T DN circulantes nos pacientes com a forma cutânea da leishmaniose expressam o TCR $\alpha\beta$, característica essa que não é vista no grupo de indivíduos controle. Estas células apresentam um perfil hiper-ativado *ex vivo*, baseado na expressão de CD69, e expressam maiores quantidades de IFN- γ e TNF- α comparadas com as células T DN $\gamma\delta$. Já as células T DN $\gamma\delta$ expressam maiores quantidades de IL-10 comparadas com as DN $\alpha\beta$ em pacientes com LC (Antonelli, L. R., *et al.*, 2006).

Estudos sobre as células NKT na leishmaniose humana não estão bem estabelecidos e ainda precisam ser mais explorados. Na leishmaniose visceral, pesquisadores demonstraram que em camundongos BALB/c deficientes em CD1d, ocorreu aumento da susceptibilidade à infecção por *L. donovanni*, sugerindo que as células NKT são importantes para um eficiente controle deste parasita. Esse trabalho também demonstrou que glicoconjugados de lipofosfoglican, como também, fosfolípidos glicoinositóis se ligaram com alta afinidade a CD1d e induziram uma resposta de IFN- γ dependente de CD1d em linfócitos “naive”

intrahepáticos (Amprey, J. L., *et al.*, 2004). Células NKT CD4⁺ também estão implicadas na proteção contra infecção por *L. major* nos estágios iniciais da doença cutânea em camundongos geneticamente resistentes, sendo as principais células efetoras nesse estágio da doença. Já em camundongos susceptíveis BALB/c, a frequência de células NKT CD4⁺ era baixa nos linfonodos, o que poderia estar mais associada com a maior gravidade da doença (Ishikawa H., *et al.*, 2000).

Existe uma complexidade dos fatores envolvidos no estabelecimento da resposta imune quando a rede imunológica sofre uma perturbação, como a chegada de um agente infeccioso. Um trabalho intenso de células e moléculas é iniciado visando a eliminação do parasita e o retorno ao ponto de equilíbrio. A infecção pela *Leishmania* representa um “distúrbio” nesta rede equilibrada e a reatividade decorrente da infecção, enquanto procura restabelecer o equilíbrio acaba por desencadear, muitas vezes, um quadro patológico.

Embora os mecanismos responsáveis pela patologia da leishmaniose não tenham sido completamente desvendados, a participação do sistema imunológico do hospedeiro, especialmente linfócitos T, na imunopatologia dessa doença é incontestável (Bottrel, R. L., *et al.*, 2001; Antonelli, L. R., *et al.*, 2006)

A **hipótese** que norteou a elaboração deste trabalho é a de que *sub-populações de linfócitos T, especificamente os CD4⁺, $\alpha\beta$ DN e NKT estão envolvidas com a resposta imune na forma cutânea da leishmaniose, e possuem características funcionais que são essenciais no desenvolvimento de resposta protetora ou patogênica nessa doença.*

Uma abordagem também muito importante é a realização de um estudo longitudinal com os mesmos pacientes. A comparação entre subtipos celulares citados acima antes e após o tratamento pode ser importante em direcionar análises futuras no que diz respeito ao real papel dessas pequenas sub-populações e na importância do reconhecimento antigênico via moléculas CD1.

Acreditamos que esse trabalho poderá abrir novos campos para a pesquisa na imunorregulação da leishmaniose e caracterização das populações celulares de grande importância na doença, para a melhor compreensão da resposta imune, podendo contribuir para a descoberta de vacinas em outras doenças infecciosas.

2 JUSTIFICATIVA

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por várias espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. A leishmaniose é classificada como doença tropical e apresenta quatro formas clínicas principais, dependendo da espécie do parasita e do sistema imunológico do paciente. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que 350 milhões de indivíduos estejam expostos ao risco de infecção, a existência de doze milhões de casos de leishmaniose em todo mundo e uma incidência anual de 1,5 a 2 milhões de novos casos. O impacto da leishmaniose na saúde pública foi subestimado por muitos anos, porém, recentemente, tem se tornado óbvio que esta doença merece uma atenção devido à sua incidência e extensa distribuição geográfica (World Health Organization, 2009). Diante do enorme contingente de indivíduos infectados ou em risco de adquirir a infecção, estudos que permitam a compreensão dos mecanismos imunológicos associados ao estabelecimento de respostas potencialmente patogênicas ou protetoras são absolutamente justificados.

No Brasil, a espécie de *Leishmania* mais comum é a *Leishmania braziliensis*, que pode causar duas diferentes formas clínicas: a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose mucosa (LM) (Coutinho, S. G., et al., 1996). Em humanos, a resposta imune à *Leishmania*, o *background* genético do hospedeiro e as propriedades do parasita são muito importantes para se determinar o resultado da infecção (Weigle, K. & Saravia, N. G., 1996; Murray, H. W., 2005). Como em outras doenças parasitárias, as reações imunes em resposta à infecção pelos parasitas do gênero *Leishmania* podem ser associadas tanto com a exacerbação como com o controle da infecção. Estas diferenças podem estar relacionadas com a existência de diferentes sub-populações de clones de células T efetoras distintas quanto à expansão em relação ao TCR expresso na superfície dessas células e quanto à produção de citocinas e moléculas co-estimuladoras (Uyemura, K. C., et al., 1993).

A imunidade mediada por células T tem um papel central na resposta intracelular a patógenos, tanto diretamente, por mediar respostas celulares, quanto indiretamente, na regulação da produção de anticorpos. O direcionamento da resposta celular está ainda sobre o controle de quimiocinas e citocinas endógenas (de Almeida, M. C., et al., 2003). Apesar dos importantes achados, questões sobre as populações celulares responsáveis pelo desenvolvimento do tipo de resposta imune, os antígenos responsáveis pela ativação celular e sua manutenção, além do repertório envolvido, ainda não estão bem estabelecidas.

Uma das abordagens para avaliar a interação entre parasito-hospedeiro e seus efeitos sobre a resposta imune é a análise do padrão dos receptores antigênicos expressos pelos linfócitos que participam ativamente das respostas específicas contra esses agentes. Técnicas moleculares, como a reação em cadeia de polimerase (PCR), e imunológicas, como citometria de fluxo, tornam possível a análise da expressão dos receptores TCR de células T e suas cadeias α e β . As análises do repertório também nos fornecem informações importantes sobre a existência ou ausência de uma resposta de

célula T direcionada, que podem sugerir a existência ou a ausência de peptídeos dominantes ou de atividades superantigênicas envolvidas na reatividade das células T frente a um agente infeccioso. Determinando este repertório em uma resposta de células T, podem-se adquirir informações novas sobre como a *Leishmania* relaciona-se com o sistema imune do hospedeiro. A identificação desses clones e, posteriormente, dos antígenos envolvidos no seu estímulo, poderá ter reflexos práticos na formulação de estratégias de tratamento.

Vários pesquisadores têm se dedicado ao estudo das células T CD4⁻ CD8⁻ (DN). Já foi visto que, em humanos, estas células expressam moléculas associadas à ativação, memória e citotoxicidade, e que seu repertório de TCR é diferente daquele apresentado pelas células T CD4⁺ ou CD8⁺, sugerindo que elas reconheçam ligantes únicos. Células NKT também são importantes sub-populações que ligam a imunidade inata e adquirida e podem contribuir para o desenvolvimento da resposta imune na leishmaniose cutânea. Nosso grupo, utilizando citometria de fluxo, demonstrou que nas CMSP de pacientes com leishmaniose cutânea, os linfócitos DN são a segunda fonte mais abundante de células produzindo IFN- γ seguidos das células T CD4⁺ (Bottrel, R. L., *et al.*, 2001). Além disso, nós demonstramos que a população de células T DN possui um perfil hiper-ativado e inflamatório quando comparado com as células T DN de indivíduos não infectados (Antonelli, L. R., *et al.*, 2006). Estudos sobre o papel de células NKT e suas sub-populações na LC causada por *L. braziliensis* são ainda escassos e necessitam de um melhor aprofundamento. Deste modo, para melhor compreender o papel que estas populações podem ter na resposta imune humana contra a *Leishmania*, estudos mais detalhados caracterizando o estado de ativação, o perfil de citocinas, e atividades funcionais das células T DN e NKT, tanto antes como após o tratamento, como também de células T CD4⁺ expressando distintos V β s foram realizados em um grupo bem definido de pacientes com leishmaniose cutânea e em um grupo de indivíduos saudáveis. Nossa expectativa é que as informações adquiridas pela realização deste trabalho ampliem nossos conhecimentos na área de imunopatologia da leishmaniose humana e levem ao desenvolvimento de novos estudos que possam beneficiar diretamente a população de indivíduos infectados por *Leishmania*.

3 OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Estudar as características funcionais das sub-populações de linfócitos T CD4⁺, $\alpha\beta$ DN e NKT, determinando seu repertório, expressão de moléculas de ativação, citotoxicidade e memória, assim como citocinas, em pacientes com a forma clínica cutânea da leishmaniose, antes e após tratamento específico.

Objetivos específicos

1- Em relação aos linfócitos T CD4⁺ os objetivos específicos foram:

- Avaliar a frequência da expressão de diferentes famílias de regiões variáveis da cadeia β do TCR (V β -TCR), nas células T CD4⁺ isoladas de pacientes com leishmaniose cutânea, antes e após o estímulo com SLA, comparando com indivíduos saudáveis.
- Analisar a expressão dos marcadores de ativação celular/memória (CD69, HLA-DR, CD45RO) e citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-10) nas sub-populações de células T CD4⁺ com expressão diferencial de V β de indivíduos não infectados e em pacientes com leishmaniose cutânea, antes e após o estímulo com SLA,
- Avaliar a existência de correlação entre a produção de diferentes citocinas por sub-populações de células T CD4⁺ com expressão diferencial de V β em pacientes com leishmaniose cutânea, após serem estimuladas com SLA.
- Avaliar a existência de correlação entre tamanho da lesão e sub-populações de células T CD4⁺ com expressão diferencial de V β de pacientes com leishmaniose cutânea.

2- Em relação ao estudo das lesões provenientes de pacientes cutâneos, o objetivo específico foi:

- Determinar a porcentagem das células T CD4⁺ expressando distintas regiões V β no sítio da lesão de pacientes com leishmaniose cutânea.

3- Em relação aos linfócitos NKT, os objetivos específicos foram:

- Determinar a contribuição relativa das células NKT expressando as regiões invariantes V α 24 do TCR no perfil total de células T de pacientes com a forma cutânea da leishmaniose, avaliando seu estado de ativação e sua capacidade citotóxica em células T isoladas a fresco e submetidas a estímulo *in vitro* com antígenos derivados do parasita.
- Estudar a resposta das células NKT, provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea frente ao estímulo com antígenos do parasita, pela avaliação da expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ , TNF- α e IL-17 e da citocina anti-inflamatória IL-10.
- Comparar as distintas sub-populações de células NKT, ou seja, NKT CD4⁻CD8⁻ duplo negativas e NKT CD4⁺ provenientes de indivíduos não infectados e pacientes com LC, no que diz respeito à frequência total dessas sub-populações, como também a expressão dos marcadores de ativação e memória, assim como, citocinas pró (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e anti-inflamatórias IL-10.

4- Em relação aos linfócitos T duplo negativos CD4⁻CD8⁻ expressando o TCR $\alpha\beta$, os objetivos específicos foram:

- Determinar a contribuição relativa das células T CD4⁻CD8⁻ (DN) expressando as regiões $\alpha\beta$ do TCR, no perfil total de células T em pacientes com a forma clínica cutânea da leishmaniose, antes e após o tratamento com antimônio, avaliando seu estado de ativação/memória e sua capacidade citotóxica em células isoladas a fresco, e submetidas a estímulo *in vitro* com antígenos derivados do parasita
- Realizar um estudo comparativo nos pacientes apresentando a forma clínica cutânea, relacionados com as frequências de células T $\alpha\beta$ CD4⁻CD8⁻ (DN) e linfócitos NKT semi-invariantes, no que diz respeito a mudanças na expressão de moléculas de ativação, memória, e citotoxicidade, antes e após o tratamento.
- Comparar as sub-populações de células T CD4⁻CD8⁻ (DN) e linfócitos NKT semi-invariantes, provenientes de pacientes com LC, antes e após o tratamento, no que diz respeito à expressão das citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e da citocina moduladora IL-10.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção dos pacientes

Esse estudo foi realizado em três fases. Na primeira fase, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas a partir de cinco indivíduos não infectados com idade variando entre 23-33 anos (média de 27.6 ± 3.97) e doze indivíduos com leishmaniose, apresentando a forma clínica cutânea, com idade variando entre 14-50 anos (média de 25.08 ± 11.15). Os indivíduos não infectados eram provenientes de Salvador, e foram submetidos a uma anamnese detalhada, não apresentando nenhum relato de caso de leishmaniose e nenhuma característica clínica da doença. Os pacientes com LC eram provenientes da área endêmica de Corte de Pedra (Bahia, Brasil) e apresentaram uma ou mais lesões cutâneas ulceradas entre oito dias e quatro meses de duração.

Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram voluntariamente da pesquisa. O diagnóstico da doença foi baseado em achados clínicos e teste de Montenegro. O teste de Montenegro (MST) é um teste de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) e é utilizado como método diagnóstico de leishmaniose tegumentar, tornando-se muito empregado em estudos epidemiológicos para a identificação de indivíduos expostos, saudáveis e curados (Mayrink, W., *et al.*, 1989). Este teste possui uma sensibilidade entre 86-100% e 100% de especificidade, e tem sido usado como um marcador de resposta imune e proteção contra leishmaniose em indivíduos vacinados (Mayrink, W., *et al.*, 1989; Jose, F. F., *et al.*, 2001; Follador, I., *et al.*, 2002).

Nenhum dos indivíduos foi tratado anteriormente para leishmaniose e não relataram infecções anteriores às descritas. As amostras foram coletadas antes da administração de qualquer tratamento. Após coletadas, as amostras de sangue tanto dos indivíduos não infectados quanto dos pacientes com LC, foram processadas no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos em Salvador, Bahia.

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea estudados na primeira fase do trabalho

LTCP	Sexo	Idade	Área da lesão (mm²)^a	Teste de Montenegro (MST) (mm²)^b	Tempo da lesão (dias)^c
17370	masculino	18	48	ND	60
17374	masculino	16	255	255	120
17378	masculino	14	ND	420	60
17380	masculino	21	272	240	60
17387	feminino	50	ND	72	15
17392	masculino	28	16	225	8
17399	masculino	29	220	210	60
17401	masculino	29	90	910	120
17416	masculino	18	12	270	35
17417	masculino	18	ND	442	35
17423	masculino	22	270	121	35
17424	masculino	21	180	462	120

a,b – Área da lesão ou MST

c – tempo da lesão relatado pelos pacientes

ND- não determinado

Nas segunda e terceira fases desse trabalho, leucócitos do sangue periférico foram obtidos a partir de seis indivíduos não infectados com idade variando entre 18-47 anos (média de 31.16 ± 9.51) e treze ou onze indivíduos com leishmaniose, apresentando a forma clínica cutânea, com idade variando entre 17-46 anos (média de 27.4 ± 8.6). Os indivíduos não infectados foram submetidos a uma anamnese detalhada, não apresentando nenhum relato de caso de leishmaniose e nenhuma característica clínica da doença. Os pacientes com LC eram provenientes da área endêmica de Corte de Pedra (Bahia, Brasil) e apresentaram uma ou mais lesões cutâneas ulceradas entre quinze dias e três meses de duração. Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram voluntariamente da pesquisa. O diagnóstico da doença foi baseado em achados clínicos e teste de Montenegro. Nenhum dos indivíduos foi tratado anteriormente para leishmaniose e não relataram infecções anteriores às descritas. Após coletadas, as amostras de sangue tanto dos indivíduos não infectados quanto dos pacientes com LC, foram processadas no Serviço de Imunologia do Hospital Universitário Professor Edgar Santos em Salvador, Bahia. Para análise dos dados da segunda fase do trabalho, as amostras foram coletadas antes da administração de qualquer tratamento. Para análise dos dados da terceira fase do trabalho, as amostras dos mesmos pacientes avaliados na segunda fase, foram processadas após 5 meses do tratamento com administração de medicamento glucantime durante 20 dias após o diagnóstico inicial.

Tabela 2: Características clínicas dos pacientes com leishmaniose cutânea estudados nas segunda e terceira fases do trabalho

LTCP	Sexo	Idade	Área da lesão (mm²)^a	Teste de Montenegro (MST) (mm²)^b	Tempo da lesão (dias)^c
19415	masculino	30	156	49	19
19292	masculino	37	600	108	40
19406	masculino	17	180	63	30
19441	masculino	29	204	288	15
19431	masculino	25	ND	320	30
19407	masculino	31	354	210	90
19434	masculino	19	255	300	55
19409	feminino	36	185	210	20
19410	feminino	46	66	144	30
19436	masculino	20	432	493	25
19438	feminino	18	63	132	60
19417	feminino	24	150	120	30
19432	masculino	25	270	380	30

a,b – Área da lesão ou MST

c – tempo da lesão relatado pelos pacientes

ND- não determinado

4.2 Antígeno de *L.braziliensis*

O antígeno solúvel de *Leishmania* (SLA) de *L. braziliensis* utilizado na primeira fase do trabalho foi gentilmente fornecido pelo laboratório de leishmaniose (ICB/UFMG/Brazil, Dr. W. Mayrink) e o SLA de *L. braziliensis* utilizado nas segunda e terceira fases do trabalho, foi gentilmente fornecido pelo Serviço de Imunologia do Hospital Edgar dos Santos em Salvador-BA. A preparação antigênica foi mantida a -80°C até a sua utilização.

Resumidamente, promastigotas de *L. braziliensis* (MHOM/BR/75M2903) ou (MHOM/BR/2001/Jolival) foram lavados e ajustados na concentração de 10^8 promastigotas/ml em PBS seguidos por repetidos ciclos de congelamento e descongelamento e uma ultrasonicação final. Após a centrifugação o sobrenadante foi coletado e a concentração de proteína foi medida pelo método de Lowry. O antígeno foi testado usando CMSP de pacientes infectados com *L. braziliensis*. Utilizou-se a concentração de 10µg/ml nos experimentos.

4.3 Obtenção de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Para obtenção de CMSP, aproximadamente 50 mL de sangue heparinizado foram centrifugados em Ficoll-hypaque (Pharmacia), 200 x g, 25°C, 40 minutos. O anel de CMSP, formado após a centrifugação, foi recolhido e lavado 2 vezes em salina (200 x g, 4°C, 10 min). O precipitado de células foi, em seguida, suspenso em 1 mL de salina e a contagem de células foi obtida da seguinte maneira: em um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml de capacidade foram adicionados 190 µl de azul de tripan e 10µl da solução de células. Da solução final obtida, 10 µl foram colocados em câmara hemocitométrica de Neubauer e, ao microscópio óptico, contou-se a quantidade de células vivas nos quatro quadrantes e, finalmente calculou-se sua média que foi multiplicada pelo fator de correção da câmara (10^4) e pelo fator de diluição (20). As células foram novamente centrifugadas e suspensas em RPMI (SIGMA) suplementado com 5% de soro humano (SIGMA) inativado, L-glutamina (100mM), e coquetel antibiótico/antimicótico (GIBCO) (RPMI completo), na concentração de 1×10^7 células/mL.

4.4 Obtenção de leucócitos para análise *ex vivo* ou após cultura com antígeno derivado do parasita

Células sanguíneas de indivíduos não infectados ou de pacientes com LC foram processadas e aproximadamente 20 ml de sangue heparinizado foram utilizados. Leucócitos foram obtidos pela lise de hemácias (RBC Lyses Buffer-Ebioscience, San Diego, CA, USA). Células foram lavadas uma vez com PBS (200 x g, 4°C, 10 min). Os Leucócitos obtidos foram resuspendidos em um volume 10 vezes menor do que colocado em cada tubo (2ml total/200µl finais) e utilizados para análise *ex vivo* e *in vitro*. As culturas foram realizadas na ausência ou presença de SLA (10 µg/ml) e incubadas por aproximadamente 20 horas.

4.5 Imunofluorescência para análise da porção Vβ do TCR de células T (repertório celular) em células T CD4⁺, e análise de células T duplo negativas CD4⁻CD8⁻ e NKT, expressando marcadores de superfície e intracelulares

Utilizando-se placa estéril de 96 poços, adicionaram-se 25 µl da suspensão de células, ou seja, $2,5 \times 10^5$ células em cada poço conjuntamente com 175 µl de RPMI suplementado ou 25 µl de células, 25 µl de SLA, juntamente com 150 µl de RPMI suplementado e colocou-se em incubação. Após a incubação por 16 horas, adicionou-se, aos poços, brefeldina A (1µg/ml) e a deixava agir por quatro horas em estufa de CO₂. A brefeldina A age “desorganizando” a estrutura do complexo de Golgi impedindo, deste modo, que haja exportação de proteínas para o meio extracelular. Ao final das quatro horas, retirou-se a placa da estufa e centrifugou-se por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e as células eram suspensas por agitação. Em seguida adicionou-se os anticorpos anti-marcadores de superfície, já diluídos, conforme titulação anteriormente padronizada no nosso laboratório, num volume final de 40µl. Na primeira fase do trabalho, relacionada ao estudo do repertório, foram utilizados um conjunto de três anticorpos de superfície marcados com diferentes fluorocromos, cada um dirigido contra uma dada molécula de superfície, a saber: anti-Vβ 2, 3, 5.1, 5.2, 8, 11,12 ,17 ou 24 marcados com isotiocianato de fluoresceína (FITC), anti-CD69, anti- HLA-DR e anti CD45RO marcados com ficoeritrina (PE) e anti-CD4 marcado com ficoeritrina cycrome5 (PECy5). Nas segunda e terceira fases, relacionadas ao estudo das células T αβ DN e NKT, foram utilizados um conjunto de cinco anticorpos de superfície

marcados com anti-6B11 (NKT) FITC, anti-CD69 PE, anti-CD45RO PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PeCy5, anti-CD8 PE Cy7, anti-CD4 APC.

Após adição dos anticorpos, a placa foi incubada a 4°C por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, procedeu-se a lavagem das células adicionando 150 μ l de PBS gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada durante 10 minutos a 4°C. Ao final da centrifugação, verteu-se a placa para retirar o sobrenadante e, em seguida, a placa foi agitada a fim de suspender as células. De posse das células já suspendidas, adicionou-se, finalmente, 100 μ l de PBS e 100 μ l de solução de formaldeído 4%. Após adição da solução de formaldeído, deixávamos as células fixando por 20 minutos à temperatura ambiente.

Após remover a solução de fixação por centrifugação e lavar as células com 150 μ l de PBS, seguiu-se a permeabilização celular, incubando as células por 10 minutos com solução de saponina 0,5% à temperatura ambiente. Ao final do período de incubação, a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4°C. Desprezou-se o sobrenadante e a placa foi agitada. Em seguida, adicionou-se sobre as células, 40 μ l da solução de anticorpos anti-citocinas (IFN- γ , TNF- α , IL-17, IL-10), como também anti-Granzima A, marcados com o fluorocromo PE, adequadamente diluídos em solução de saponina 0,5%. As amostras foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente. Após este período, as células foram lavadas, por centrifugação adicionando a cada poço, 150 μ l da solução de saponina. Repetiu-se por duas vezes esta operação sendo que, na última vez, as células foram lavadas com WashB. Finalmente, após desprezar o sobrenadante e agitar a placa, as células foram diluídas em 100 μ l de PBS e 100 μ l de solução de formaldeído 4%. O volume final de 200 μ l de solução contendo as células marcadas foi transferido para tubos próprios para leitura no citômetro de fluxo. As células foram mantidas a 4°C, ao abrigo da luz para que as fluorescências não fossem perdidas até a leitura no citômetro, o que acontecia, no máximo dentro de dois dias.

4.6 Aquisição e análise dos dados por citometria de fluxo

A citometria de fluxo é uma tecnologia que foi criada na década de 70, com o objetivo de separar e/ou analisar separadamente linfócitos B e T a fim de se conhecer mais profundamente a biologia dessas células imunológicas. Atualmente, ainda é utilizada com este objetivo seja pela análise fenotípica destas células por suas moléculas de superfície, e/ou por suas características funcionais, analisando moléculas intracitoplasmáticas como citocinas,

como também para a análise de outros tipos celulares e algumas de suas moléculas expressas. Essa técnica se expandiu mundialmente e atualmente é também utilizada para fins diversos como análise de apoptose, diagnóstico de câncer como a leucemia, análise de ciclo celular, entre outras, ou seja, é uma técnica muito sensível e eficaz.

As preparações celulares marcadas com os anticorpos monoclonais fluorescentes foram avaliadas em citômetro de fluxo - FACS_{CAN} ou FACS_{CANTO} (Becton & Dickinson) imediatamente após a coloração, já descrita. Durante a aquisição dos dados foram coletados 40000 eventos na primeira fase do estudo e 100000 eventos nas segunda e terceira fases do estudo.

Os dados coletados foram analisados utilizando os programas de computador *Cell Quest* (Becton & Dickinson) e *Flowjo* (Tree Star). A primeira etapa do processo de análise consistiu na determinação da população celular de interesse. Isto foi feito baseando-se no perfil de tamanho e granulosidade das populações adquiridas e da expressão de marcadores fenotípicos (Figura 2).

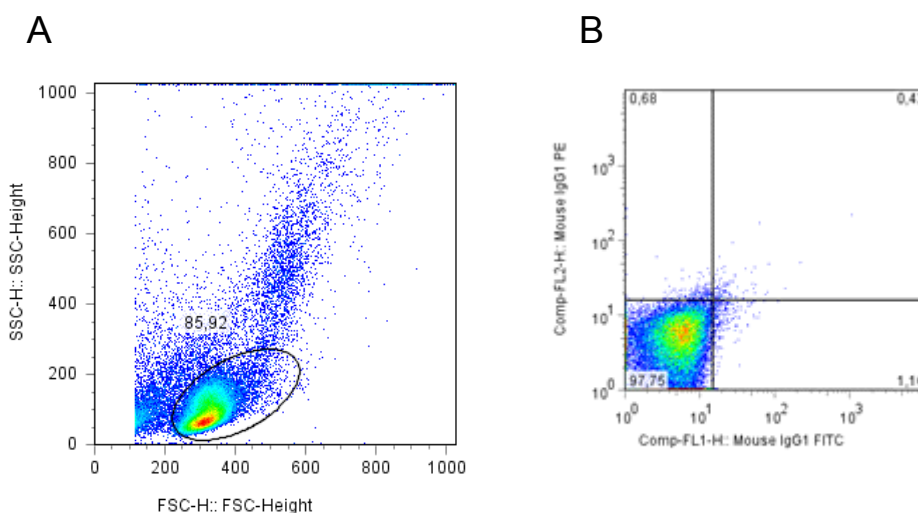


Figura 2: Perfil da distribuição de células mononucleares do sangue periférico no gráfico de tamanho *versus* granulosidade e controle de isotipo. CMSP foram obtidas conforme descrito acima. (A) A região delimitada foi a de linfócitos totais, baseada em conhecimento prévio do posicionamento destas células no gráfico de tamanho x granulosidade, de acordo com as sub-populações de interesse em diferentes situações de análise. (B) Distribuição representativa em “dot-plot” obtida pela marcação de CMSP com anticorpos monoclonais não relacionados marcados com FITC e PE (controles isotípicos).

Uma vez definidas as populações celulares de interesse, procedeu-se às análises de fluorescência. Para isto, foram montados gráficos pontuais de fluorescência. A delimitação dos quadrantes foi definida a partir do posicionamento de células marcadas com os controles de isotipo (imunoglobulina de camundongo do mesmo isotipo dos anticorpos utilizados nas marcações para as análises de fluorescência, conjugados com os fluorocromos). Nestas marcações, os quadrantes foram posicionados de forma que, no mínimo 97-99 % das células estavam no quadrante inferior esquerdo. A partir do posicionamento das células nestes gráficos, foi possível determinar a frequência de células simples-positivas, presentes no quadrante superior esquerdo (UL) e inferior direito (LR); a frequência de células duplo-positivas, presentes no quadrante superior direito (UR), e a frequência de células negativas posicionadas no quadrante inferior esquerdo (LL). Definido o posicionamento dos quadrantes, o *Cell Quest* e/ou o *Flowjo* forneceram uma análise estatística dos dados, baseada na percentagem ou no número absoluto de células posicionadas em cada quadrante, dentro das regiões definidas. Na figura 3, pode-se observar um exemplo de como a análise para o estudo do repertório foi realizada.

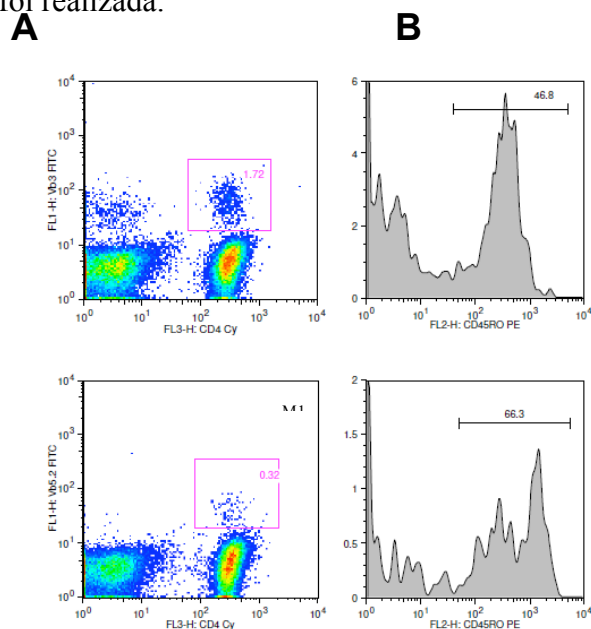


Figura 3: “Dot plots” e histogramas representativos das células T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões V β do TCR e expressão de CD45RO. (A) Perfil puntual representativo de células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea marcadas com anticorpos anti-V β 3 e anti-V β 5.2 FITC e anti-CD4-PECy5. (B) Histograma ilustrativo referente à expressão de CD45RO, marcador de memória/experiência dentro da janela V β ⁺CD4⁺, dentro de cada sub-população avaliada.

Na figura 4, observa-se um exemplo de análise das células NKT CD4⁻CD8⁻ duplo negativas (NKT DN) e CD4⁺ (NKTCD4⁺), selecionadas no gráfico tamanho X granulosidade, na região de linfócitos totais, como descrito na figura 2.

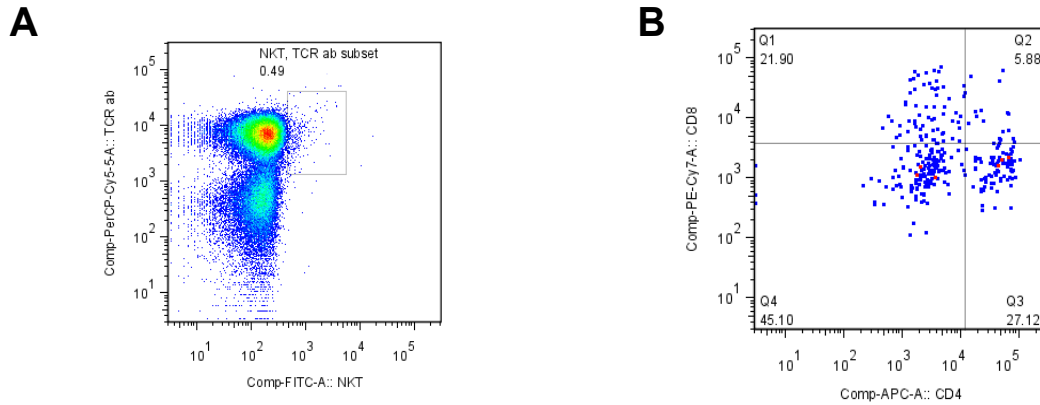


Figura4: “Dot-Plots” representativos para análise de células NKT semi-invariantes expressando o TCR α 24. Leucócitos foram obtidos como descrito acima. (A) “Dot-plot” demonstrando a seleção de sub-populações NKT⁺TCR α β ⁺. (B) “Dot-plot” demonstrando as sub-populações NKT duplo negativas (Q4) e NKT CD4⁺ (Q3), geradas a partir do “dot-plot” representado na letra A.

Na figura 5, observa-se um exemplo de análise das células CD4⁻CD8⁻ duplo negativas expressando o TCR α β e a expressão de granzima A dentro dessa sub-população, selecionadas no gráfico tamanho X granulosidade na região de linfócitos totais.

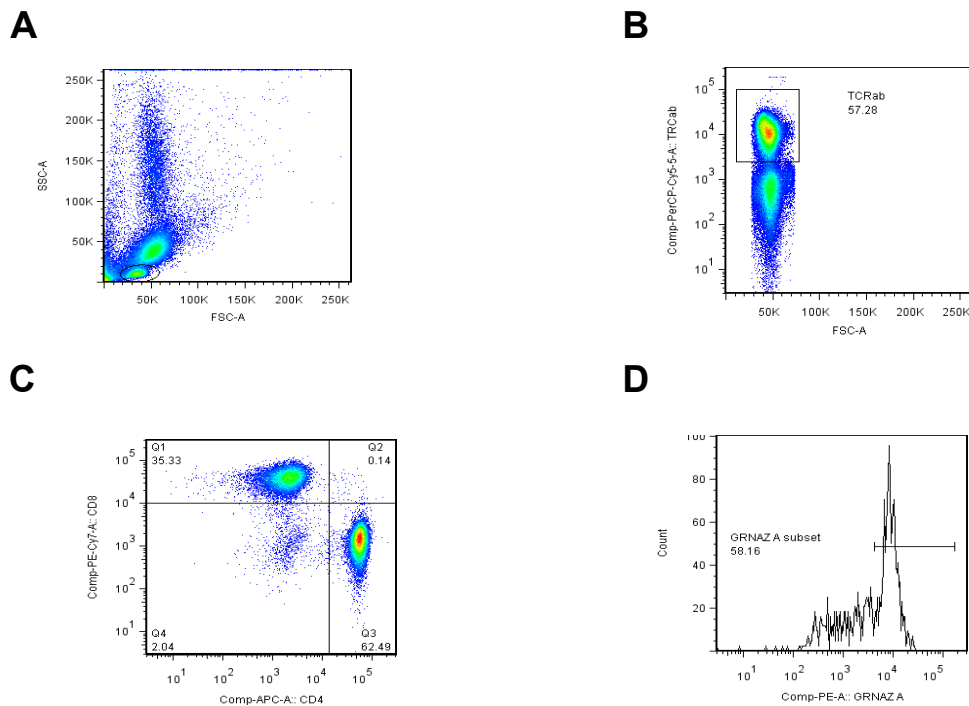


Figura5: “Dot-Plots” representativos para análise de células duplo negativas CD4⁺CD8⁻ expressando o TCR $\alpha\beta$. Leucócitos foram obtidos conforme descrito acima. (A) região delimitada foi a de linfócitos totais, baseada em conhecimento prévio do posicionamento destas células no gráfico de tamanho x granulosidade, de acordo com as sub-populações de interesse em diferentes situações de análise. (B) “Dot-plot” representativo demonstrando a seleção de sub-populações de células T expressando o TCR $\alpha\beta$ (C) “Dot-plot” representativo demonstrando a seleção de sub-populações CD4⁺CD8⁻TCR $\alpha\beta$ ⁺(DN) (Q4). (D) Histograma representativo demonstrando a expressão de granzima A nas células DN $\alpha\beta$.

4.7 Obtenção de material para análise do repertório em lesões de pacientes com a forma clínica cutânea da leishmaniose

Nos pacientes com leishmaniose cutânea, foram realizadas biópsias de 4 mm de diâmetro das bordas das lesões ativas após aplicação de anestesia local, utilizando “punch”. Após a coleta das biópsias, retirou-se um pequeno fragmento para confirmação da infecção por *Leishmania* através da técnica de PCR (realizado no Serviço de Imunologia, Hospital Universitário Edgar Santos, UFBA). Outro fragmento foi reservado para este estudo.

As biópsias de pacientes com leishmaniose cutânea foram embebidas, por 30 minutos, em solução de sacarose 30% a 4°C. Logo após, as amostras foram transferidas para o meio de inclusão Tissue-Tek e imediatamente colocadas em gelo seco. Após aproximadamente 8 horas, as amostras foram transferidas para freezer -70°C, onde permaneceram até o processamento. Fragmentos de 4-5 μm obtidos no criostato foram colocados em lâminas siliconadas da marca *Micro Slides* (Empresa VWR Scientific) e fixados em acetona a 4°C por 10 minutos.

4.8 Coloração histológica

Para certificarmos da qualidade e preservação do tecido, um fragmento de cada corte obtido em criostato foi submetido à coloração histológica por hematoxilina (Merck)/eosina (Vetec). Os cortes foram submetidos a três banhos de água corrente por 5 minutos cada e, posteriormente, foram corados com hematoxilina. Em seguida, as lâminas passaram por um banho de água corrente por 15 minutos e, então, corados com eosina. Foi realizado uma seqüência de banhos em álcool (Synth) 70%, 80%, 85% e três banhos com álcool (Synth) 95% para que os cortes fossem desidratados. Em seguida, foram passados por três banhos de xilol (Synth) para diafanização, e finalmente, as lâminas foram montadas com *Entellan* (Merck).

4.9 Reações de imunofluorescência

Após a realização dos cortes em criostato e montagem das lâminas, foram realizadas as reações de imunofluorescência, utilizando uma metodologia semelhante à utilizada por Barbosa e colaboradores (1999).

Os cortes para imunofluorescência foram submetidos a uma seqüência de cinco banhos com duração de três minutos cada, em PBS. Para reduzir as marcações inespecíficas, os cortes foram incubados com PBS/BSA 2% durante 40 minutos. Em seguida, foram adicionados os anticorpos monoclonais com diferentes fluorocromos (anti- V β FITC ou anti-CD4 PERCy5), diluídos em PBS/BSA 2%, para a dupla coloração. Os cortes foram incubados *overnight* (\cong 15 horas) a 4°C. Posteriormente, foram realizadas seqüências de cinco banhos, com duração de três minutos cada, em PBS, e secagem de lâminas. Foi adicionado, então, 1 μ l de DAPI (*4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride* – SIGMA), diluído em PBS/BSA 2%. As amostras foram incubadas durante 15 minutos e uma nova etapa de cinco banhos em PBS com duração de três minutos cada foi realizada. As lâminas foram montadas com *Hydromount* (National Diagnostics) e permaneceram a 4°C, protegidas da luz por, no máximo, 72 horas, até que fosse realizada a aquisição das imagens no microscópio confocal a laser (Zeiss). Em uma lâmina separada para cada paciente, foram adicionados anticorpos não imunes (controle de isotipo - CTL) para descartar a marcação inespecífica.

4.10 Microscopia Confocal

As imagens foram obtidas por microscopia confocal (Zeiss) utilizando o programa LSM Image Examiner (LSMIX) acoplado a um microscópio Zeiss (Axiovert 100) com objetiva de imersão em óleo (60X). Os lasers UV (488nm) ou laser criptônio/argônio foram usados para excitar as preparações (através das linhas de 488nm ou 633nm), e a luz emitida foi selecionada utilizando filtros (505/35 para FITC e DAPI; LP 700 para PECy5). O processamento e análise das imagens foram realizados utilizando os programas LSMIX (Zeiss), Adobe Photoshop 7.0 e Image Tool.

Foram capturados três ou cinco campos em microscopia confocal para cada lâmina, utilizando-se comprimentos de onda específicos para V β FITC, CD4 PECy5 e DAPI.

4.11 Análises das Imagens

Três ou cinco imagens de campos de cada indivíduo foram capturadas aleatoriamente em microscópio de fluorescência (Zeiss) com filtros específicos para FITC/PECy5 e DAPI. Este procedimento foi realizado com a colaboração da Dra Daniela Rodrigues de Faria do laboratório de Biologia de Interações Celulares (ICB). Os núcleos foram contados e a fluorescência foi quantificada utilizando-se programa específico (*Image Tool*[®] 2.03).

Para determinarmos o número total de células nos infiltrados inflamatórios, a quantificação foi feita através da contagem dos núcleos que apresentavam fluorescência azul (DAPI). As células foram contadas em três ou cinco campos e, posteriormente, foi realizada a média por número de campos.

Em relação à análise da expressão de cada marcador (revelados pela fluorescência emitida pelo FITC ou PECy5), as células que apresentavam fluorescência FITC ou PECy5 foram quantificadas utilizando programa específico (*ImageTool*[®] 2.03). As células foram contadas em três ou cinco campos e, posteriormente, foram calculadas as médias por número de campos. Nas análises para dupla marcação (FITC e PECy5), as células que apresentavam fluorescência FITC e PECy5 simultaneamente foram quantificadas utilizando programa específico - *ImageTool* 2.03 (também foram analisados três ou cinco campos e calculada a média de células por campo). Os resultados foram expressos em forma de média \pm desvio padrão do número de células em lesões de pacientes com a forma clínica cutânea.

4.12 Análises estatísticas

As análises estatísticas referentes à primeira fase do trabalho, no que diz respeito ao estudo dos V β , foram realizadas separadamente. Para comparação individual das médias entre indivíduos não infectados e LC, teste t de student foi aplicado para cada população expressando V β . Para a comparação de células T CD4⁺ expressando V β , entre Meio e SLA, teste t pareado foi utilizado conjuntamente com a correção de Bonferroni. Para comparações da frequência de células expressando diferentes marcadores (CD69, HLA-DR, CD45RO e citocinas), foi realizado ANOVA Tukey-Kramer, utilizando o programa estatístico JMP (SAS Institute Inc.). Todas as correlações foram realizadas utilizando o coeficiente de correlação Spearman do programa estatístico JMP (SAS Institute Inc.).

Na segunda fase do trabalho, ao compararmos indivíduos não infectados com pacientes com LC, utilizamos teste t de student. Para os demais resultados da segunda e terceira fases do trabalho, utilizamos o teste t pareado. Os dados foram considerados estatisticamente diferentes quando $p \leq 0,05$. Utiliza-se para tais análises o programa JMP (SAS software).

5 RESULTADOS (1ª parte)

Apresentaremos os resultados dessa tese em três partes, referentes aos diferentes grupos de objetivos específicos.

5.1 Determinação do repertório de células T CD4⁺ pela análise de expansão preferencial de regiões V β do TCR em indivíduos não infectados e em pacientes com leishmaniose, apresentando a forma clínica cutânea.

5.1.1 Pacientes com leishmaniose cutânea mostraram um aumento na frequência de células T CD4⁺ expressando V β 5.2 quando comparados com indivíduos não infectados

Células T CD4⁺ possuem a capacidade de reconhecer antígenos pela interação do TCR em sua superfície com o complexo MHC/peptídeo presente nas células apresentadoras de antígeno.

Devido ao papel que as células T exercem no controle da leishmaniose cutânea, a identificação das sub-populações de células T CD4⁺ que podem expressar preferencialmente determinadas regiões V β do TCR é de grande importância. Para isso, CMSP de indivíduos não infectados e de pacientes com leishmaniose cutânea foram coletadas, antes e após o estímulo com SLA. O repertório de células T CD4⁺ foi analisado, utilizando o protocolo de marcação com anticorpos fluorescentes anti-V β (FITC) associados à anti-CD4 (PECy5), conforme descrito em materiais e métodos.

A figura 6 mostra a análise comparativa da frequência média de células T CD4⁺ expressando diferentes regiões V β do TCR, nos indivíduos não infectados e nos pacientes com leishmaniose cutânea, antes do estímulo com SLA. A análise revelou heterogeneidade nas células T CD4⁺ expressando as regiões V β do TCR, tanto em indivíduos não infectados quanto nos pacientes com leishmaniose, na forma clínica cutânea (figura 6).

Observou-se que, ao compararmos as frequências de expressão de diferentes V β nesses diferentes grupos de indivíduos antes do estímulo com SLA, a média da frequência de células T CD4⁺ expressando o V β 5.2 foi maior nos pacientes com LC do que nos indivíduos não infectados (p=0.0006).

Não houve diferença na frequência das células T CD4⁺ com expressão das regiões Vβ 2, 5.1, 8, 11, 12, 17 e 24 do TCR, quando indivíduos não infectados foram comparados com os pacientes (figura 6).

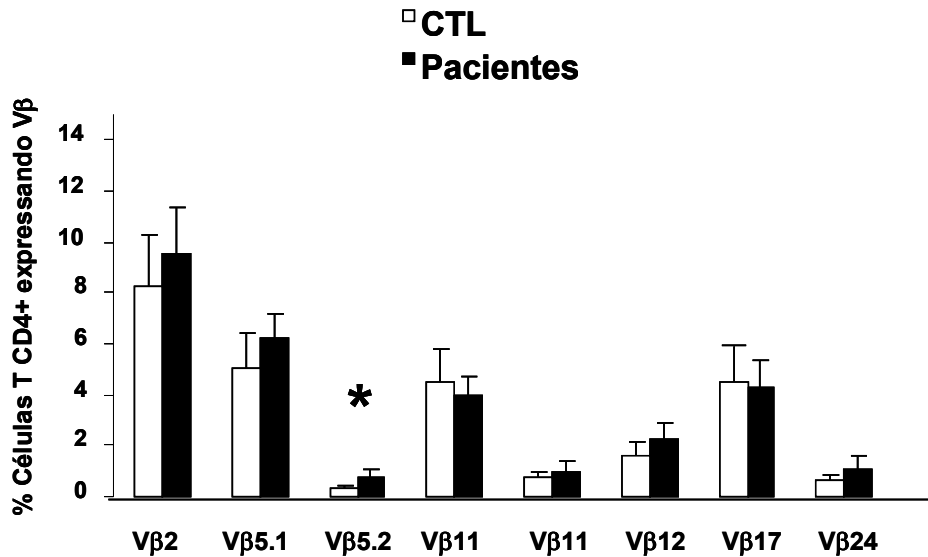


Figura 6: Análise comparativa da frequência *in vitro* da expressão diferencial das regiões Vβ do TCR em linfócitos T CD4⁺, entre indivíduos não infectados e pacientes com leishmaniose cutânea. CMSP de pacientes com LC (barras pretas) ou indivíduos não infectados (barras brancas), foram mantidas em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-Vβ e anti-CD4 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. A frequência de células T CD4⁺ com expressão preferencial das regiões Vβ 5.2 nos pacientes com leishmaniose cutânea foi maior comparada a indivíduos não infectados. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada por teste t de student com um $p \leq 0,007$ (aplicando correção de Bonferroni) e (*) representa diferença significativa entre as médias do controle e pacientes com LC.

5.2 Análise comparativa da média da frequência das células T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões Vβ do TCR, tanto na presença quanto na ausência de estímulo com SLA.

Com o objetivo de detectar células T envolvidas na resposta anti-*Leishmania* nos pacientes com LC, nós comparamos o repertório de células T CD4⁺ *in vitro* antes e após estímulo com SLA, tanto entre os indivíduos não infectados, quanto entre os pacientes. Esse tipo de análise é capaz de auxiliar na visualização de uma expansão específica nos pacientes com LC.

Analisou-se a frequência de células T CD4⁺ expressando os Vβs 2, 3, 5.1, 5.2, 8, 11, 12, 17 e 24. Análises pareadas da expressão de Vβ em indivíduos não infectados não mostraram nenhuma diferença significativa nem antes nem após estímulo com SLA (dados não mostrados).

De acordo com a figura 7, o estímulo com SLA induziu uma expansão de subpopulações de células T CD4⁺ dos pacientes com LC, expressando preferencialmente as regiões Vβ 5.2, 11, 12 e 17. Já a frequência das células T CD4⁺ com expressão das regiões Vβ 2, 3, 5.1, 8, e 24 não foi alterada pelo estímulo com SLA (Figura 7).

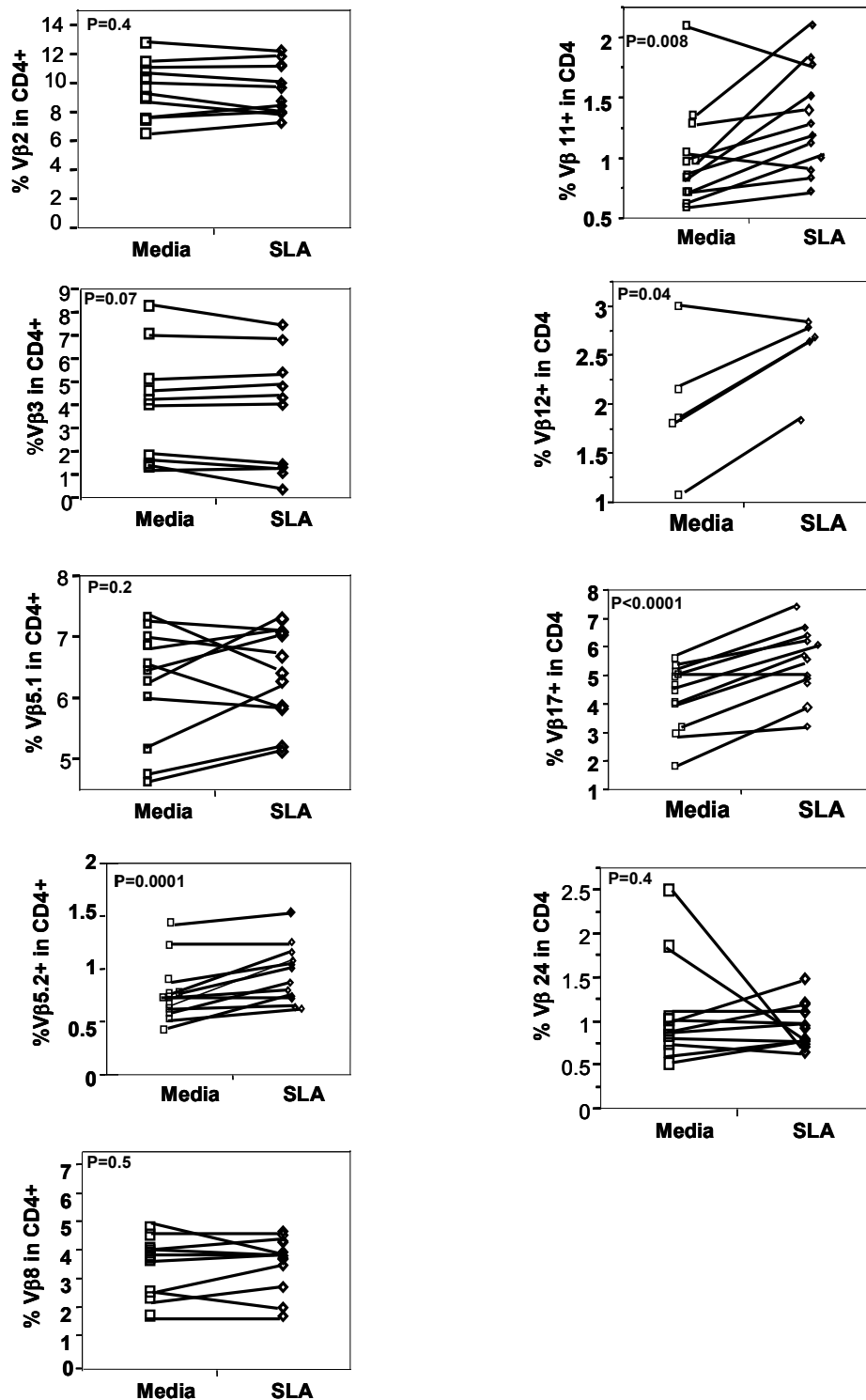


Figura 7: Freqüência de células T CD4⁺ expressando diferentes regiões Vβ do TCR após estímulo com SLA. CMSP de pacientes com LC foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) ou estimuladas com 10 µg/ml de SLA. Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-Vβ-FITC e anti-CD4-PECy5 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. SLA induziu um aumento de expressão das regiões Vβ 5.2, e 17 nas células T CD4⁺ dos pacientes com leishmaniose cutânea com $p \leq 0,007$. Células T CD4⁺ expressando Vβ 11 apresentaram $p = 0,008$. Pacientes com LC (n=12), exceto para Vβ12 (n=6). Significância com $p \leq 0.007$ utilizando correção de Bonferroni.

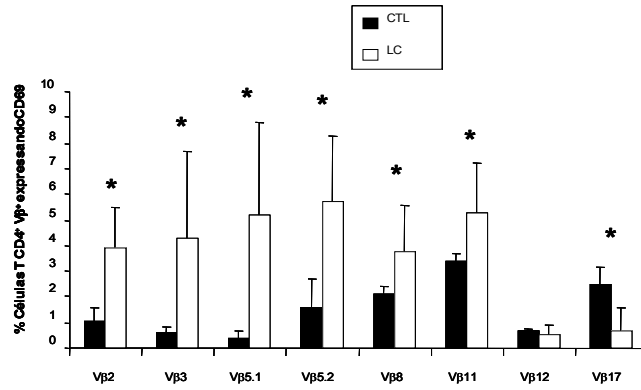
5.3 Análise da média de frequência de expressão de moléculas de ativação e memória em linfócitos T CD4⁺ com expressão diferencial da região V β do TCR.

5.3.1 - Pacientes com LC tem perfil de ativação e memória aumentado nas células T CD4⁺ expressando diferentes regiões V β do TCR comparados aos indivíduos não infectados

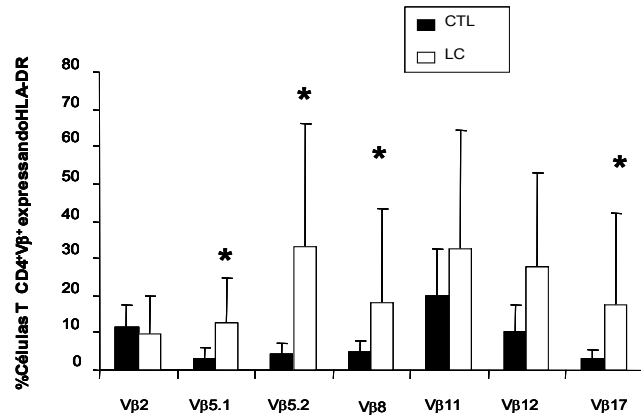
Após a análise da expressão dos diversos V β do TCR de células T CD4⁺ nos diferentes grupos analisados, foi realizada a análise da expressão das moléculas de ativação CD69, HLA-DR, como também a análise da expressão de CD45RO, uma molécula relacionada com a experiência e memória em células do sistema imune, em linfócitos T CD4⁺ expressando as diferentes regiões V β .

Com o objetivo de compreender o perfil de ativação e memória dos linfócitos T CD4⁺ de pacientes com LC, comparou-se a frequência de marcadores de ativação e memória nas células T CD4⁺ expressando diferentes regiões V β do TCR, entre indivíduos não infectados e pacientes com LC, tanto antes quanto após o estímulo com SLA. Nas análises antes do estímulo com SLA, observou-se que a maioria das sub-populações de células T CD4⁺ nos pacientes com LC expressando V β estavam mais ativadas do que as mesmas sub-populações de células nos indivíduos não infectados, tanto para a expressão do marcador de ativação recente CD69, quanto para a expressão do marcador de ativação tardia, HLA-DR (Figuras 8 A e B). Ao comparar a frequência do marcador de experiência CD45RO nas células T CD4⁺ expressando os diferentes V β entre os indivíduos não infectados e pacientes com LC, observou-se que a sub-população de células T CD4⁺ expressando V β 5.2 apresentou maior expressão de CD45RO nas células dos pacientes do que dos indivíduos não infectados, antes do estímulo com SLA (Figura 8C). O SLA não induziu mudança no perfil dos marcadores analisados (CD69, HLA-DR e CD45RO), comparando entre pacientes com LC e indivíduos não infectados (dados não mostrados).

A



B



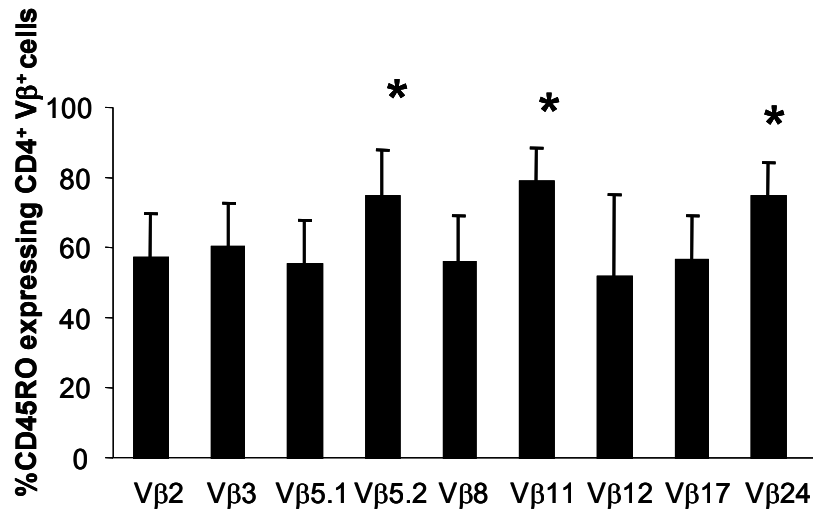
C

Figura8: Expressão de CD69, HLA-DR e CD45RO está aumentada nas células T CD4⁺ expressando distintas regiões Vβ provenientes de pacientes com LC. CMSP de indivíduos não infectados (n=5) ou pacientes com LC (n=20), exceto para Vβ12 (n=6), foram mantidas em cultura sem estímulo (meio) por 20 dias de cultura, as células foram marcadas com anticorpos anti-β, anti-CD69, anti-CD45RO e anti-CD4 e analisadas utilizando a técnica de fluxo citométrico. A diferença foi significativa entre a frequência de expressão de CD69 (A); HLA-DR (B); CD45RO (C) nas células T CD4⁺ expressando distintas regiões Vβ entre indivíduos não infectados e pacientes com LC. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada por teste t de student para a expressão dos marcadores nas células CD4⁺ expressando os distintos Vβ com um valor de p ≤ 0,05.

5.3.2 – Células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2, 11 e 24 apresentam perfil de ativação e memória aumentado comparado com as células T CD4⁺ expressando os demais Vβ nos pacientes com LC.

Com a finalidade de determinar o estado de ativação e a experiência antigênica anterior das células T CD4⁺ expressando as distintas regiões Vβ do TCR nos pacientes com LC, avaliou-se a expressão das moléculas de ativação tardia (HLA-DR), como também a expressão de CD45RO, um marcador de memória/experiência, dentro de cada sub-população expressando diferentes regiões Vβ. A proporção das células T CD4⁺ expressando HLA-DR e CD45RO foi comparada entre as várias populações de células T expressando Vβ sem estímulo *in vitro*, como medida de experiência *in vivo* de pacientes ativamente infectados. Sub-populações de células T CD4⁺ definidas pelos Vβ 5.2, 11 e 24, expressaram maior frequência de CD45RO quando foram comparadas com todas as outras sub-populações de células T CD4⁺ expressando Vβ (Figura 9 A). Além disso, as mesmas três sub-populações de células expressando Vβ 5.2, 11 e 24 também tiveram a expressão de HLA-DR maior quando comparadas com as células T CD4⁺ expressando Vβ 2 e 5.1. Todas as outras sub-populações mostraram frequências estatisticamente equivalentes comparando-se uma com a outra (Figura 9 B).

A



B

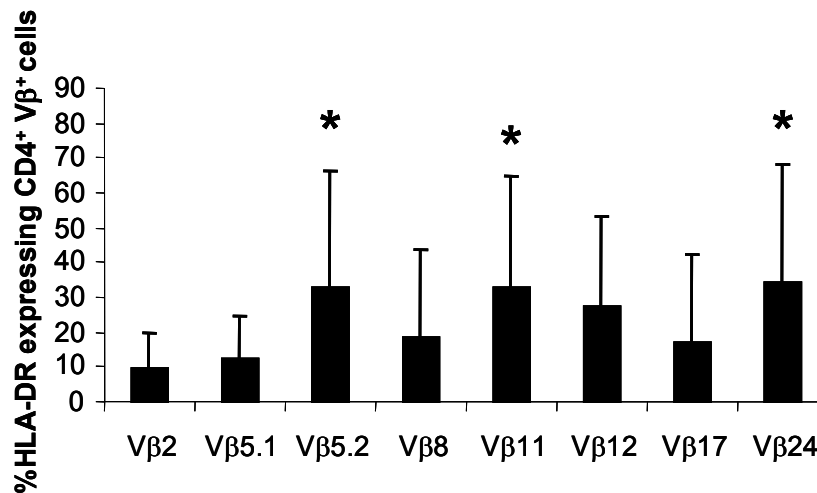


Figura9: Expressão de CD45RO e HLA-DR nas células T CD4⁺ expressando distintas regiões Vβ de pacientes com LC. CMSP de pacientes com LC (n=12), exceto para Vβ12 (n=6), foram mantidas em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-Vβ, anti-HLA-DR, anti-CD45RO e anti-CD4 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência de CD45RO (A), HLA-DR (B) dentro das células T CD4⁺ expressando diferentes regiões Vβ do TCR em pacientes com LC. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada por ANOVA Tukey-Kramer para a expressão dos marcadores nas células T CD4⁺ expressando os distintos Vβ com um valor de $p \leq 0,05$.

5.4 Análise da média de frequência de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-10), em linfócitos T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões V β do TCR, na presença ou ausência de estímulo, nos pacientes com leishmaniose cutânea.

5.4.1 As mesmas sub-populações de células T CD4⁺ (V β 5.2, 11 e 24) que apresentaram um fenótipo de ativação e memória, também apresentaram uma frequência aumentada de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias após estímulo antigênico, quando comparadas com as outras sub-populações de células T CD4⁺ V β específicas.

Resposta efetora de células T CD4⁺ e subsequente produção de citocinas é crítica para a cura e, possivelmente, para a exacerbação da leishmaniose humana. Nós demonstramos anteriormente que as células T CD4⁺ Th1 estão associadas com a LC, e que essas células também produzem IL-10 (Bottrel, R. L. *et al.* 2001). Em adição a co-regulação de células produtoras de IFN- γ e TNF- α , nós também identificamos co-regulação de células produtoras de IL-10 (Bottrel, R. L., *et al.* 2001). Surpreendentemente, maiores frequências de células produtoras de IFN- γ estão também associadas com o tamanho da lesão (Antonelli, L. R., *et al.*, 2005). Dessa forma, com o objetivo de identificar possíveis sub-populações de células que poderiam estar envolvidas nessas respostas, foi realizada análise da frequência de células T CD4⁺ expressando V β a nível individual, produtoras de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ), como também produtoras da citocina anti-inflamatória IL-10, tanto antes como após o estímulo com SLA.

A análise da frequência de células T CD4⁺ antígeno específicas produtoras de TNF- α dentro de cada sub-população expressando os distintos V β , revelou-nos um arranjo diversificado, o que já era esperado, devido à natureza complexa de peptídeos antigênicos provenientes de *Leishmania*, contidos na preparação do SLA. Contudo, de todas sub-populações de células T CD4⁺ analisadas V β específicas, três (V β 5.2, 11 e 24) mostraram significativamente maior frequência de expressão de células produtoras de TNF- α , comparadas com todas as outras sub-populações (Figura 10 A). A sub-população de células T CD4⁺ expressando o V β 12 apresentou maior frequência de produção de TNF- α comparadas com as CD4⁺ expressando o V β 2 e 5.1 (Figura 10 A).

Surpreendentemente, o mesmo perfil geral foi visto para a frequência de células T CD4⁺ Vβ específicas expressando IFN-γ, com as células que expressam Vβ 5.2 e 24 comprometidas com essa produção, quando comparadas com ao menos quatro outras sub-populações expressando diferentes famílias de Vβ (Figura 10 B). As células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2 e 24 tiveram maior produção de IFN-γ do que as Vβ 2, 5.1, 8 e 17. Além disso, as células T CD4⁺ expressando o Vβ 11 tiveram essa produção maior do que as Vβ 2, 5.1 e 17. As sub-populações das células T CD4⁺ expressando os Vβ 8 e 12, tiveram maior produção de IFN-γ, comparadas com as Vβ2.

Finalmente, devido aos nossos dados publicados anteriormente, mostrando uma produção de IL-10 conjuntamente com TNF-α e IFN-γ (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004), nós analisamos a frequência de células produtoras de IL-10 entre as mesmas sub-populações de células T CD4⁺ expressando Vβ (Figura 10 C). Novamente, as mesmas células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2, 11 e 24 apresentaram maior produção de IL-10 antígeno específica. As células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2 tiveram maior expressão de IL-10 do que as (Vβ 2, 5.1, 8 e 17) seguidas pelas células T CD4⁺ expressando o Vβ11 e 24, que tiveram maior expressão de IL-10 do que as Vβ 2, 3, 5.1, 8, 12 e 17. Em todos os casos, foi relatado somente as sub-populações expressando Vβ que mostraram uma frequência significativamente maior de células produtoras de citocinas, comparadas com ao menos 50% das outras sub-populações.

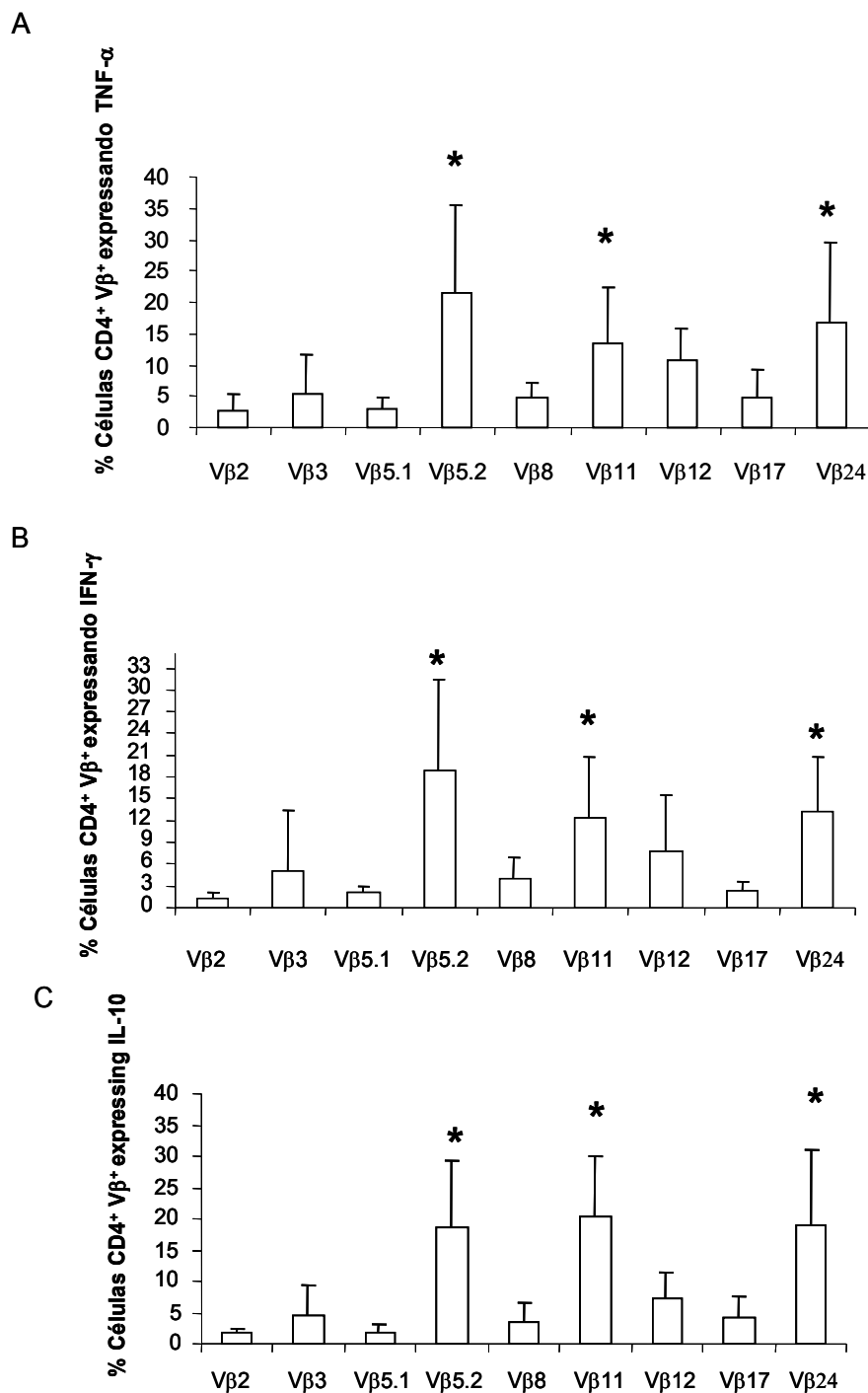


Figura10: Estímulo antígeno específico aumenta expressão das citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-10 nas células T CD4⁺ expressando distintas regiões Vβ do TCR. CMSP de pacientes com LC foram mantidas em cultura estimuladas com 10 μg/ml de SLA. Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-Vβ, anti-TNF-α, anti-IFN-γ e anti-IL-10 e anti-CD4 e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo. Os gráficos representam a frequência de TNF-α (A), IFN-γ (B) e IL-10 (C) dentro das células T CD4⁺ expressando diferentes regiões Vβ do TCR. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão para cada região Vβ com SLA (barras brancas). Todos os grupos de Vβ apresentam (n=12), exceto para Vβ12 (n=6). O * representa p ≤ 0.05 para as sub-populações Vβ comparadas com ao menos quatro das outras sub-populações utilizando o teste ANOVA Tukey-Kramer.

5.5 Análise das correlações entre as frequências de células expressando diferentes citocinas, nas células T CD4⁺ com expressão diferencial das regiões Vβ do TCR, estimuladas com SLA, em pacientes com leishmaniose cutânea.

5.5.1 Correlação positiva entre células T CD4⁺ expressando distintos Vβ produtoras de IFN-γ e TNF-α, concomitantemente.

Para investigar a possibilidade de que sub-populações de células T CD4⁺ específicas definidas pela expressão de dado Vβ podem estar envolvidas na formação de uma resposta co-regulada entre células T produtoras de IFN-γ e TNF-α, como já foi demonstrado anteriormente por nós na população total de células T CD4⁺ (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004), análises de correlação foram realizadas entre a frequência de células T CD4⁺ expressando distintos Vβ produtoras de IFN-γ e TNF-α, seguida de estímulo com SLA.

Os resultados mostraram que, das três sub-populações Vβ específicas que tiveram maior produção de IFN-γ e TNF-α antígeno específica, quando comparadas com as outras sub-populações Vβ, houve correlação entre a frequência de células Vβ 5.2 e Vβ11, expressando IFN-γ e TNF-α (Figuras 11 A e B). De todas as sub-populações analisadas em adição a essas duas, somente células T CD4⁺ expressando o Vβ8 e o Vβ17 também apresentaram essa correlação (Figuras 11 C e D). Interessante que células T CD4⁺ expressando Vβ17 sofreram expansão após estímulo com SLA nos pacientes com LC (Figura 7), mas não apresentaram perfil de ativação e produtor de citocina maior do que as outras células expressando diferentes regiões Vβ (dados não mostrados).

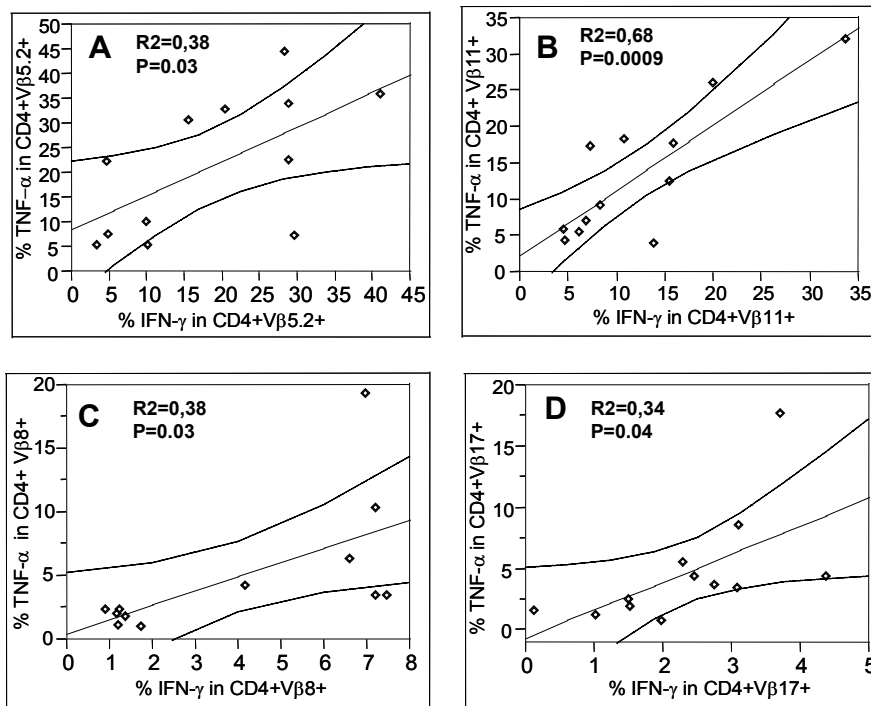


Figura11: Expressão de IFN- γ e TNF- α está correlacionada positivamente nas células T CD4⁺ expressando regiões V β 5.2, 8, 11 e 17, após estímulo com SLA. Correlação entre as frequências de IFN- γ e TNF- α em células T CD4⁺ de pacientes com leishmaniose cutânea (n = 12) expressando distintas regiões V β do TCR analisadas *in vitro*, após estímulo com SLA. Correlação positiva entre os níveis de expressão de IFN- γ e TNF- α nas células T CD4⁺ expressando o V β 5.2 (A), V β 11 (B), V β 8 (C) e V β 17 (D). A análise de correlação foi realizada utilizando o software JMP e os resultados foram considerados significativos quando o valor de P menor ou igual a 0,04.

5.5.2 Citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) estão positivamente correlacionadas com a citocina anti-inflamatória IL-10 nas células T CD4⁺ expressando os V β 5.2 e 24.

Em pacientes com leishmaniose cutânea, células produtoras de citocinas podem estar relacionadas à cura ou exacerbação da doença e podem estar associadas com uma resposta imune celular regulada ou não. Em nosso estudo anterior, demonstramos uma co-regulação das células T CD4⁺ inflamatórias com essas mesmas células anti-inflamatórias na doença cutânea (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004). A fim de melhor compreender o papel de sub-populações CD4⁺ específicas para distintos V β , na doença cutânea, análises de correlação foram realizadas entre a frequência de células produtoras de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10), para cada uma das sub-populações de células T CD4⁺ específicas para determinado V β , após estímulo com SLA.

Dentre as três famílias V β que demonstraram maior frequência de produção de TNF- α , IFN- γ e IL-10, duas delas, V β 5.2 e 24 demonstraram forte correlação positiva entre a

freqüência de células produtoras de IL-10 e TNF- α ou IFN- γ , todos com $p \leq 0,03$ (Figura 12). De todas as sub-populações V β analisadas, apenas essas duas tiveram correlações significativas.

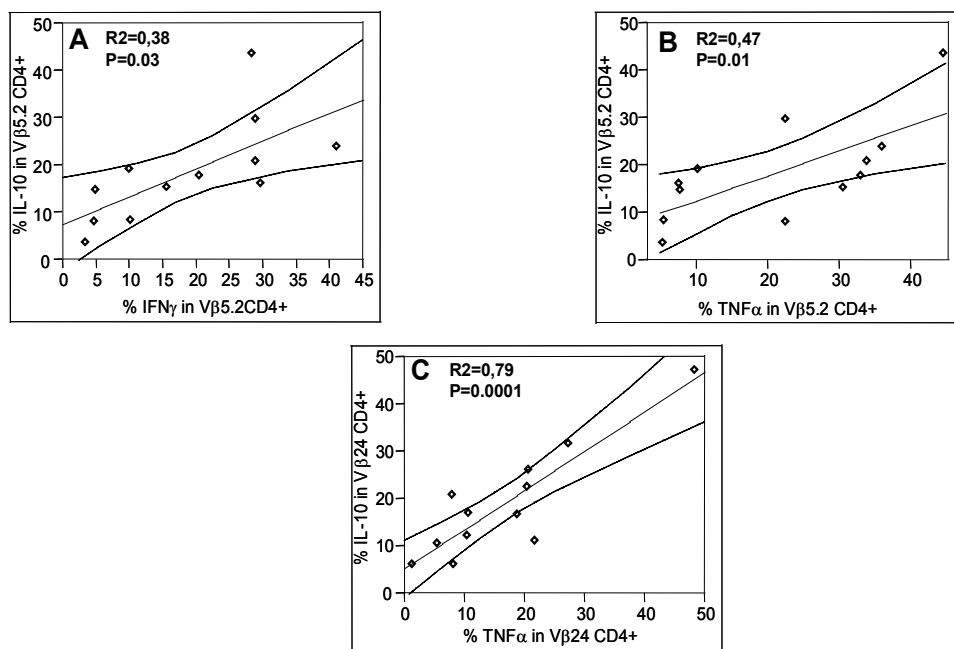


Figura 12: Expressão de IL-10 está correlacionada positivamente com a expressão de IFN- γ e TNF- α nas células T CD4⁺ expressando regiões V β 5.2 e 24, após estímulo com SLA. Correlação entre a freqüência de IFN- γ ou TNF- α e IL-10 nas células T CD4⁺ de pacientes com LC (n=12) expressando V β analisadas *in vitro*, após estímulo com SLA. (A) Correlação positiva ente os níveis de expressão de IFN- γ e IL-10 nas células T CD4⁺ expressando V β 5.2. (B) Correlação positiva ente os níveis de expressão de TNF- α e IL-10 nas células T CD4⁺ expressando V β 5.2. (C) Correlação positiva ente os níveis de expressão de TNF- α e IL-10 nas células T CD4⁺ expressando V β 24. A análise de correlação foi realizada utilizando o software JMP e os resultados foram considerados significativos quando o valor de P menor ou igual a 0,03.

5.5.3 Células T CD4⁺ expressando distintas regiões V β estão correlacionadas com características clínicas.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram uma correlação direta entre a freqüência de ambas as células T ativadas e produtoras de IFN- γ com o tamanho de lesões cutâneas ulceradas em pacientes com LC (Antonelli, L. R., *et al.*, 2005). Dessa forma, foi de grande interesse verificar se alguma das sub-populações CD4⁺ V β específicas também se correlacionariam com o tamanho da lesão, como um método de possível identificação de

células T envolvidas com a resposta imune local e danos ao tecido. Dado a existência de um tráfico intenso de linfócitos dos linfonodos drenantes através do sangue e de lesões, a migração de linfócitos para o sítio da lesão pode ser muito importante para o desenvolvimento de diferentes respostas na LC e doença da mucosa (Bacellar, O., *et al.*, 2002; Rocha-Vieira, E., *et al.*, 2003; Antonelli, L. R., *et al.*, 2004; Faria, D. R., *et al.*, 2005; Gaze, S. T., *et al.*, 2006). Curiosamente, análise de correlação revelou uma correlação positiva entre frequência de células T CD4⁺ Vβ5.2 e maior área da lesão (Figura 13).

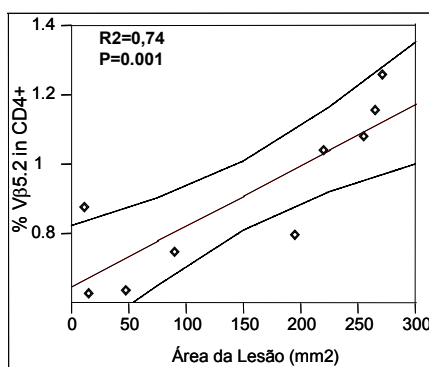


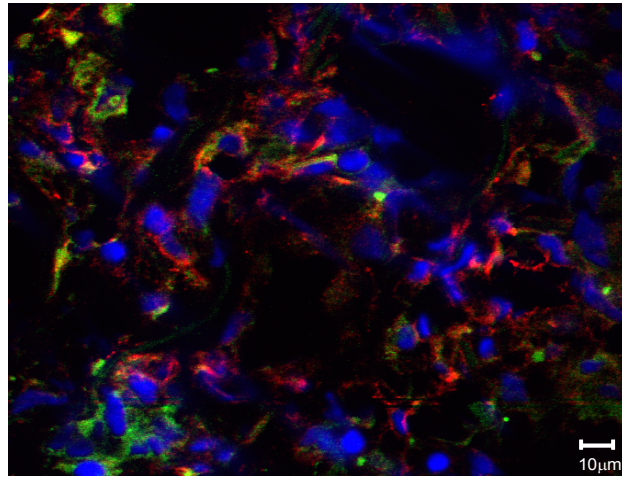
Figura 13: A frequência de células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2 correlaciona-se positivamente com o tamanho da lesão de pacientes com leishmaniose cutânea. Correlação entre a área de lesão (mm²) e as frequências *in vitro* de células T CD4⁺ expressando região Vβ 5.2 do TCR, após o estímulo com SLA. As análises de correlação foram realizadas utilizando o software JMP e os resultados foram considerados significativos quando o valor de P igual 0,001. LC (n = 9)

5.6 Determinação da frequência de células T CD4⁺ expressando distintos Vβ em lesões de pacientes com leishmaniose cutânea.

5.6.1 Lesões de pacientes com LC apresentam alta frequência de células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2.

A frequência de células T CD4⁺ expressando os diferentes Vβ analisados nesse trabalho foi avaliada também utilizando a técnica de microscopia confocal, como descrito em materiais e métodos. Análises pré-liminares mostraram que a maioria das células T CD4⁺ presentes no sítio da lesão de pacientes com LC, expressa a região Vβ 5.2 do TCR (Figura 14 A). Avaliações de outros Vβs no sítio da lesão mostraram uma frequência muito baixa desses Vβs ou praticamente inexistente na lesão de pacientes com LC (Figura 14 B).

A



B

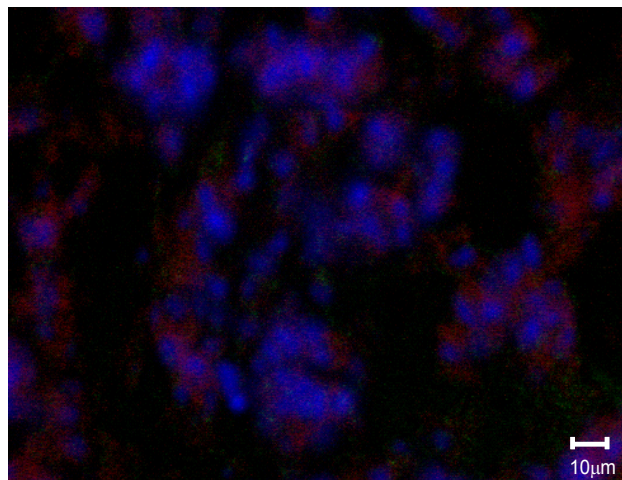


Figura 14: Frequência de células T CD4⁺ expressando Vβ em lesões de pacientes com LC. Imagens representativas de análise de microscopia confocal para determinação do número de células T CD4⁺Vβ5.2⁺ em lesões de pacientes com LC. Secções de tecido foram marcadas com anti Vβ5.2 (A, barra de 10 μm) (A) ou anti-Vβ 2 FITC (B, barra de 10 μm) (B) e com anti CD4 PEcy5 e foram contadas pela marcação com DAPI, como descrito em materiais e métodos. Células Vβ⁺ são mostradas em verde e CD4⁺ em vermelho e DAPI em azul, mostra o núcleo das células nas lesões.

5 RESULTADOS (2ª parte)

5.7 Análise comparativa da média da frequência total das células NKT semi-invariantes com expressão preferencial da região V α 24 do TCR, entre indivíduos não infectados e pacientes com LC

5.7.1 Sub-populações NKT provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea possuem menor frequência média total comparada às sub-populações de indivíduos saudáveis *ex vivo*

O sistema imunológico inato é caracterizado por respostas rápidas aos patógenos e mediado por diferentes células. Em contrapartida, o sistema imune adquirido, composto de linfócitos T e B, é caracterizado por memória secundária ou respostas imunes antígeno específicas. Dentre os tipos de células que têm sido postuladas para ligar esses dois braços do sistema imunológico, as células NKT semi-invariantes são candidatas atraentes por serem capazes de responder rapidamente ao estímulo antigênico e, posteriormente, ativar outros tipos celulares (Weaver, C. T. & Murphy, K. M., 2007). A real conexão entre os sistemas imune inato e adquirido na leishmaniose humana ainda está sendo estudada e o mecanismo detalhado do papel das células NKT não está bem estabelecido, até o momento. Com a finalidade de estudar o possível envolvimento que esta sub-população desempenha na doença cutânea, foi realizada uma análise detalhada do perfil funcional de células NKT semi-invariantes CD4⁻CD8⁻ duplo negativas (DN) e CD4⁺, dentro da sub-população NKT total, tanto em indivíduos saudáveis quanto nos pacientes ativamente infectados com *L. braziliensis*.

Pesquisadores demonstraram que as células NKT são uma sub-população pouco frequente no sangue periférico, com frequência média variando de 0,2% a 1% (Berzins, S.P., *et al.*, 2004; Kronenberg, M., 2005). Nossos dados demonstraram que a sub-população total de células NKT nos pacientes com LC apresentaram frequência *ex vivo* diminuída comparada com os indivíduos saudáveis, variando de 0,2% a 0,7% (média de 0,34%) e 0,42% a 1,04% (média de 0,6%), respectivamente (Figura 15).

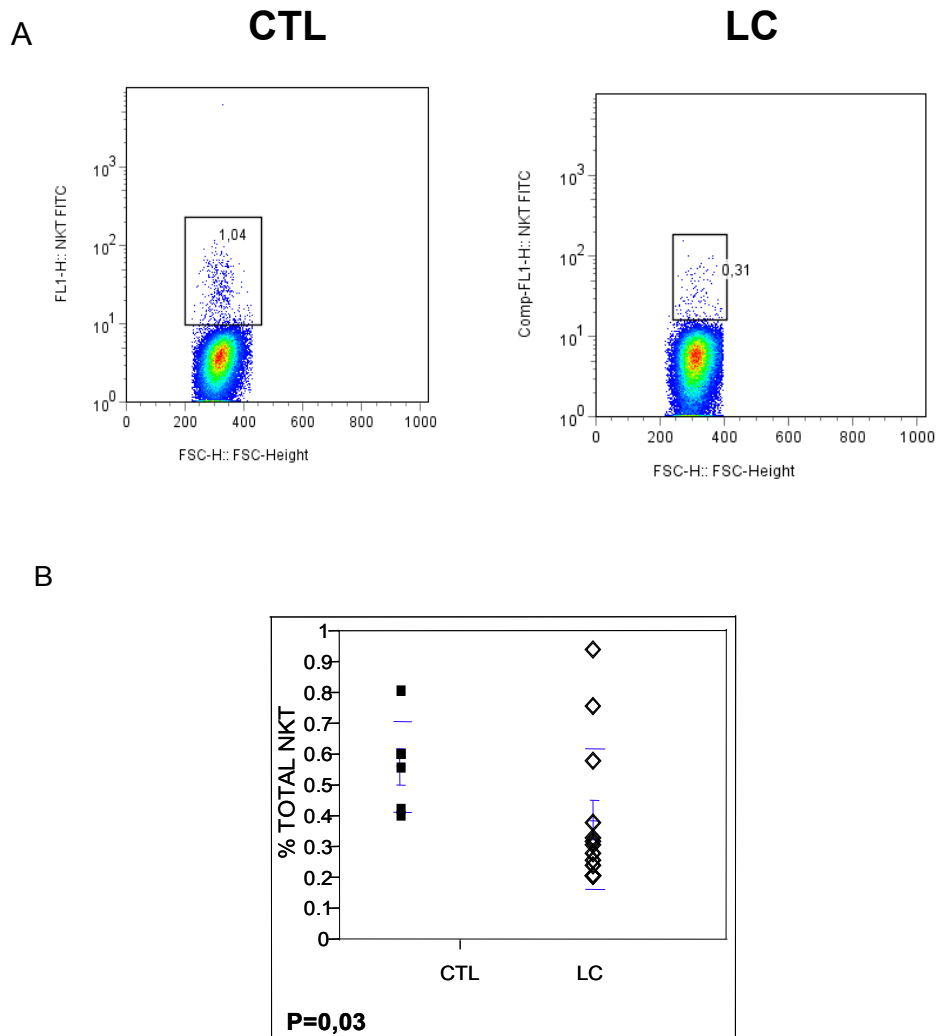


Figura 15: Análise da frequência média de células NKT totais do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea ou indivíduos não infectados. Leucócitos de pacientes com LC (n=13) ou indivíduos saudáveis (n=6) foram analisados *ex vivo* e marcados com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. Os gráficos representam a frequência total de células NKT dentro da região de linfócitos totais, como descrito em materiais e métodos. (A) “Dot-Plots” representativos da frequência total de células NKT de indivíduos saudáveis (CTL) e pacientes com LC. (B) Os gráficos representam a média de frequência de células NKT totais *ex vivo* expressando a região V α 24. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada por teste t de student com um valor de $p \leq 0,05$.

5.7.2 Sub-populações de células NKT CD4⁻CD8⁻ duplo negativas e NKT CD4⁺ de pacientes com LC avaliadas *ex vivo*, apresentaram perfil de ativação aumentado em comparação com indivíduos não infectados.

Células NKT sofrem constante ativação *in vivo* e NKT isoladas a fresco expressam marcadores de ativação como o CD69 e o CD44. A explicação para essa situação pode ser dada pela constante ativação por ligantes próprios endógenos (Brigl M, *et al*, 2004). Com o objetivo de estudar moléculas de ativação e memória dessas sub-populações de células NKT, nós comparamos essas células isoladas a fresco do sangue periférico, no que diz respeito a expressão de CD69 e CD45RO, entre pacientes com LC e indivíduos não infectados.

Nossos achados mostraram que ambas sub-populações analisadas *ex vivo* de células NKT, ou seja, NKT DN e NKT CD4⁺, não apresentaram diferenças significativas na expressão de CD45RO, quando compararam-se os dois grupos de indivíduos. Já quando comparamos essas sub-populações de células NKT em relação à expressão do marcador de ativação recente CD69, tanto as células NKT DN quanto as células NKT CD4⁺ de pacientes com LC, apresentam um perfil hiperativado comparando com as mesmas sub-populações de indivíduos não infectados (Tabela 3).

Tabela 3. Células NKT de pacientes com leishmaniose cutânea expressam um perfil hiperativado comparadas a indivíduos não infectados.

Exvivo *	NKT DN		NKT CD4	
	CD69**	CD45RO	CD69**	CD45RO
Não infectados	14,5±9,4	52,5±22,7	15±8,1	75±22,3
Pacientes com LC	26±7,1	55,5±15,6	29±14,2	50,7±16,2

*Resultados expressos como média ± desvio padrão

** Valor da frequência média da expressão de CD69 menor nos indivíduos não infectados (n=6) comparados aos pacientes com LC (n=13). A diferença foi significativa e determinada por teste t de student com um valor de $p \leq 0,05$.

5.8 Análise da média de frequência de expressão de moléculas de ativação, memória e citotoxicidade em linfócitos semi-invariantes NKT DN e CD4⁺ com expressão diferencial da região V α 24 do TCR, em pacientes com LC

5.8.1 Sub-populações de células NKT DN apresentam perfil de ativação aumentado comparadas às células NKT CD4⁺ após cultura nos pacientes com LC.

Objetivando caracterizar melhor as sub-populações de células NKT semi-invariantes DN e CD4⁺, nós analisamos, em pacientes com LC antes do tratamento, as moléculas de ativação recente CD69 e memória CD45RO, comparando essas duas distintas sub-populações, após serem ou não estimuladas com o SLA.

Nossos resultados demonstraram que as células NKT DN são mais ativadas do que as NKT CD4⁺, tanto antes (Figura 16), quanto após estímulo com o SLA (dados não mostrados). Em relação à expressão do marcador de memória CD45RO, ambas sub-populações não apresentaram diferenças significantes na expressão desta molécula, com média de 54.3 \pm 20.8 para NKT DN e 74.6 \pm 12.3 para as NKT CD4⁺, antes do estímulo com SLA. Após serem estimuladas com o SLA, essa frequência de CD45RO não se alterou (dados não mostrados).

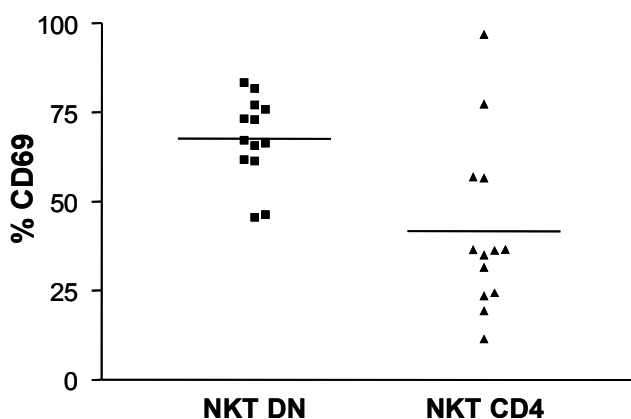


Figura 16: Análise da frequência média de células NKT DN e CD4⁺ expressando CD69 após cultura. Leucócitos de pacientes com LC (n=13) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti-CD69PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de CD69 dentro das sub-populações de células NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.8.2 Sub-populações de células NKT DN apresentam perfil de citotoxicidade aumentado comparadas com células NKT CD4⁺ após cultura nos pacientes com LC.

Células NKT compartilham características tanto com as células NK da imunidade inata, quanto com as células T convencionais da imunidade adquirida, fazendo esse *link* entre essas duas imunidades (Godfrey, D. I., *et al.*, 2000). Dessa forma, nós avaliamos a molécula granzima A nas sub-populações de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺), relacionada com citotoxicidade, uma característica bem marcante das células NK, nos leucócitos de pacientes com LC, tanto antes quanto após o estímulo com SLA.

A figura 17, mostra que a sub-população de células NKT DN possui expressão significativamente elevada de granzima A quando comparada a sub-população NKT CD4⁺, antes do estímulo com SLA. Após o estímulo, esse perfil não é alterado (dados não mostrados).

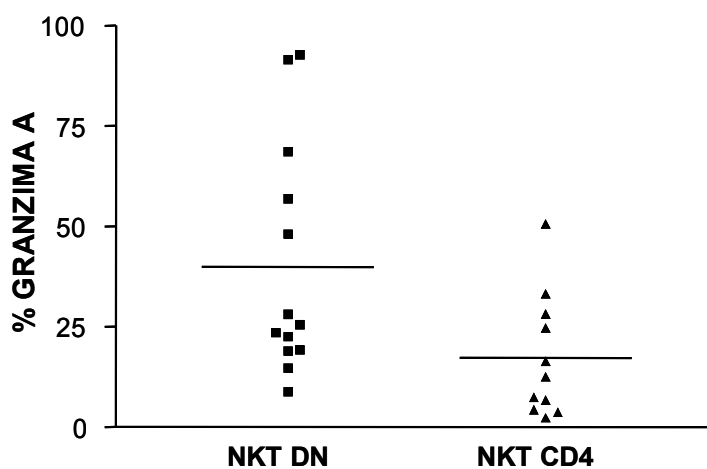


Figura 17: Análise da frequência média de expressão de granzima A nas células NKT DN e CD4⁺. Leucócitos de pacientes com LC (n=13) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura na presença de meio as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti-granzimaA PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de granzima A dentro das sub-populações de células NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.9 Análise da média de frequência de expressão de citocinas pró e anti-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-10), em sub-populações de células NKT semi-invariantes, na presença ou ausência de estímulo, nos pacientes com leishmaniose cutânea.

5.9.1 Sub-populações de células NKT DN e NKT CD4⁺ apresentam perfil espontâneo inflamatório nos pacientes com LC.

Células NKT são capazes de liberar rapidamente grandes quantidades de citocinas como o IFN- γ , e são importantes na iniciação e regulação da resposta imune. Contudo, embora a produção de IFN- γ pelas células NKT seja crucial para indução de uma resposta protetora contra patógenos, os mecanismos precisos e eventos iniciais para que essa resposta aconteça ainda não estão bem caracterizados.

Com o objetivo de entender melhor o papel das distintas sub-populações de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺) na leishmaniose cutânea humana, nós analisamos o perfil de expressão de citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e da citocina anti-inflamatória IL-10 dentro de cada sub-população de células NKT, tanto antes quanto após estímulo com SLA.

Análises da expressão de citocinas mostraram que as células NKT DN são maiores produtoras de TNF- α do que as NKT CD4⁺. Curiosamente, as células NKT CD4⁺ apresentam maiores frequências de produção de IFN- γ do que as células NKT DN. Em relação a expressão da citocina anti-inflamatória IL-10, ambas as sub-populações expressam frequências semelhantes (Figuras 18 A, B e C). Todas essas análises foram realizadas antes do estímulo com SLA. Após as células serem estimuladas, o SLA não modificou o perfil da expressão das diferentes citocinas, em ambas sub-populações de células NKT (dados não mostrados).

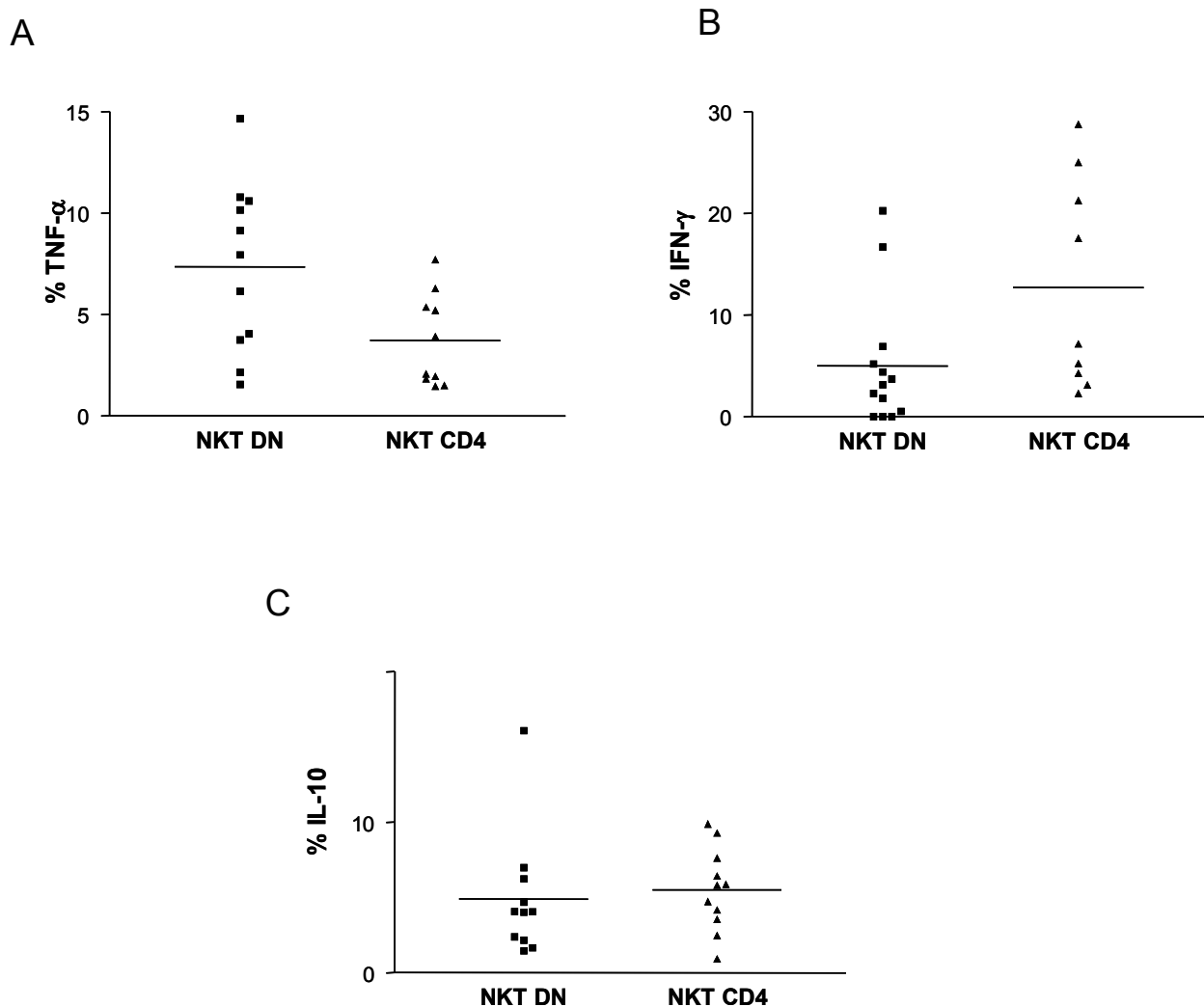


Figura 18: Células NKT DN e NKT CD4⁺ expressam citocinas inflamatórias distintas. Leucócitos de pacientes com LC (n=13) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti-IFN γ PE, anti-TNF- α PE, anti IL-10 PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. Os gráficos representam a frequência média de expressão de TNF- α (A), IFN γ (B) e IL-10 (C) dentro das sub-populações de células NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/-desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.9.2 SLA induziu aumento na expressão de IL-17 nas células NKT DN de pacientes com LC.

Células NKT possuem característica de produção de IFN- γ na periferia e IFN- γ /IL-4 no timo (Godfrey, D. I., *et al.*, 2000). Pesquisas recentes em modelo murino, demonstraram que as células NKT compartilham características não somente com sub-populações Th1 e

Th2, mas também com células Th17, e que essas células pertencem ao grupo de células NKT CD4⁻ (Niemeyer, M., *et al.*, 2008, Coquet, J. M., 2008; Michel, M. L., *et al.*, 2008).

Com a finalidade de melhor entender e caracterizar a produção de IL-17 nas sub-populações de células NKT, nós avaliamos a expressão dessa citocina por células NKT DN e NKT CD4⁺ provenientes de pacientes LC com a doença ativa, antes e após serem estimuladas com o SLA.

Nossos resultados indicam que realmente as células NKT DN, compartilham características com as células Th17. O SLA induziu um aumento na frequência de IL-17 na sub-população de células NKT DN, quando comparadas com as NKT CD4⁺ (Figura 19).

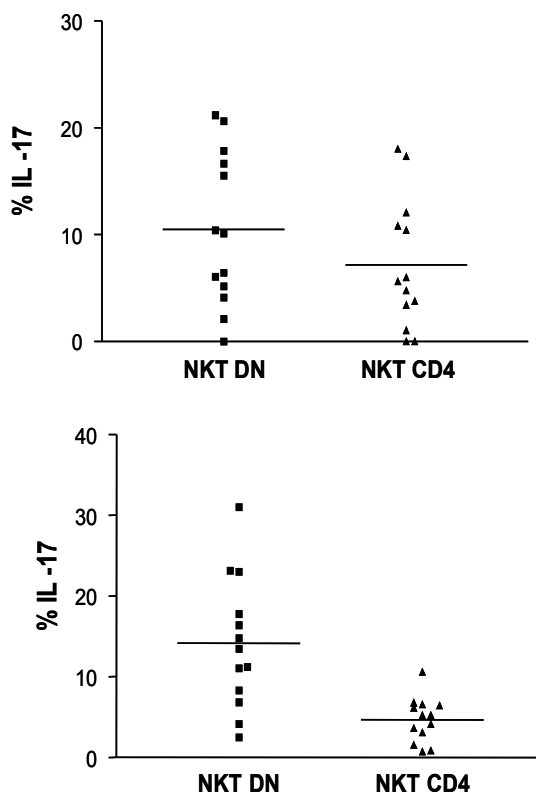


Figura 19: SLA induziu aumento de células NKT DN produtoras de IL-17. Leucócitos de pacientes com LC (n=13) foram mantidos em cultura não estimulados (MEIO) ou estimulados com 10 µg/ml de SLA. Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti IL-17 PE, anti-TCRαβ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de IL-17 dentro das sub-populações de células NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), Meio (A) e SLA (B). Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de p=0,0004.

5 RESULTADOS (3ª parte)

5.10 Análise comparativa *ex vivo* das sub-populações de células T CD4⁺CD8⁻ duplo negativas expressando os TCR $\alpha\beta$ e NKT em pacientes com LC, antes e após o tratamento da doença

Recentemente, nossa compreensão de como a patologia causada por uma resposta imune exacerbada desencadeada por organismos infecciosos evolui tem avançado consideravelmente. Nosso grupo demonstrou recentemente o papel de uma população de células T, que apesar de representar uma minoria, possui tanto potencial inflamatório quanto modulador, que foram as células T CD4⁺CD8⁻ duplo negativas expressando os TCR $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ (Antonelli, L. R., *et al.* 2006). Ambas as sub-populações desempenham papéis diferentes em pacientes com LC ativa. Sendo que a primeira apresentou um caráter mais inflamatório e a segunda um caráter modulador da resposta imune.

Com base nesses dados, nós avaliamos dentro das sub-populações de células T DN, as células T DN $\alpha\beta$, ou seja, células com perfil inflamatório mais exacerbado na doença ativa, comparando-as com as sub-populações de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺), que também possuem um caráter bastante inflamatório. Além disso, nós também realizamos um estudo longitudinal dos pacientes com LC, avaliando a expressão de marcadores de resposta imunológica dentro dessas mesmas sub-populações linfocitárias, tanto antes quanto após o tratamento da doença, estudo esse muito relevante devido a ser a primeira vez que ocorre esse tipo de comparação entre estes subtipos celulares em fases distintas da infecção.

5.10.1 Sub-populações NKT provenientes de pacientes com leishmaniose cutânea possuem maior frequência média total de expressão de marcadores de ativação e memória, do que as células T DN $\alpha\beta$, antes e após o tratamento da LC

Com a finalidade de caracterizar funcionalmente distintas sub-populações linfocitárias, nós avaliamos *ex vivo*, células T DN $\alpha\beta$ e dois subgrupos de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺), comparando essas sub-populações entre si, antes e após o tratamento da LC.

Observamos na tabela 4, essa análise comparativa. Primeiramente, comparamos as sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT nos pacientes com LC na doença ativa. Outra comparação foi realizada entre as mesmas sub-populações após o tratamento.

Nossos dados mostraram que antes do tratamento da LC, os subgrupos de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺), apresentaram-se mais ativadas do que as células T DN $\alpha\beta$. Interessante notar que esse perfil não foi alterado após o tratamento, comprovando que as células NKT realmente possuem um caráter mais ativado (Tabela 4). Comparação de CD45RO entre as diferentes sub-populações mostrou que as células NKT DN apresentaram maior frequência média de expressão de CD45RO do que as células T $\alpha\beta$ DN, antes do tratamento (Tabela 4).

Tabela4: Comparação entre sub-populações linfocitárias em pacientes com LC antes e após o tratamento

<i>Ex Vivo</i> *	CD69			CD45RO		
	Células T DN $\alpha\beta$	NKT DN**	NKT CD4**	Células T DN $\alpha\beta$	NKT DN***	NKT CD4
Pré tratamento	16,6±4,2	26±7,1	29±14,2	31±12,6	55,5±15,6	50,7±16,1
Pós tratamento	13±7,2	38,4±18,6	44,3±15,6	71,5±12,1	70,8±15,4	55,8±16,2

*Resultados expressos como média \pm desvio padrão

** Valor da frequência média da expressão de CD69 maior nas sub-populações de células NKT comparadas com as células T DN $\alpha\beta$ nos pacientes com LC antes (n=13) e após o tratamento (n=11). A diferença foi significativa e determinada por teste t de student com um valor de $p \leq 0,05$.

*** Valor da frequência média da expressão de CD45RO maior nas sub-populações de células NKT DN comparadas com as células T DN $\alpha\beta$ nos pacientes com LC antes do tratamento (n=13). A diferença foi significativa e determinada por teste t de student com um valor de $p \leq 0,05$.

Outro dado interessante foi a análise da expressão da molécula de memória CD45RO nessas sub-populações. Observamos que tanto as células NKT DN quanto as células T DN $\alpha\beta$, apresentam maior expressão de CD45RO após o tratamento dos pacientes com LC. Já, o subgrupo de células NKT CD4⁺, não apresentou diferença na expressão desse marcador, comparando entre a infecção ativa e após o tratamento da mesma (Tabela 4 e Figura 20 B).

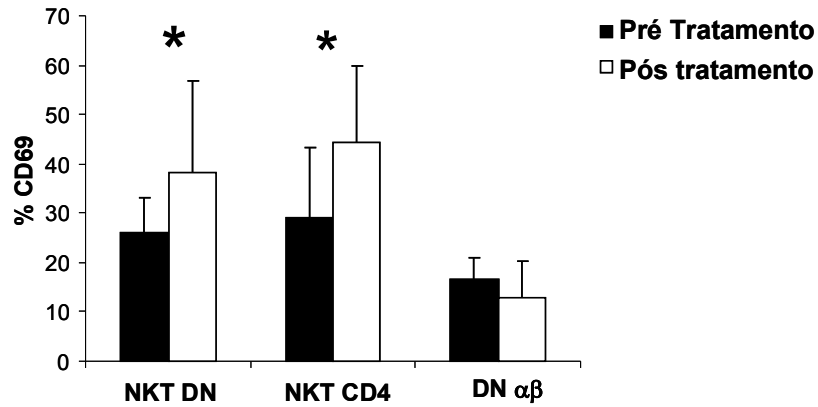
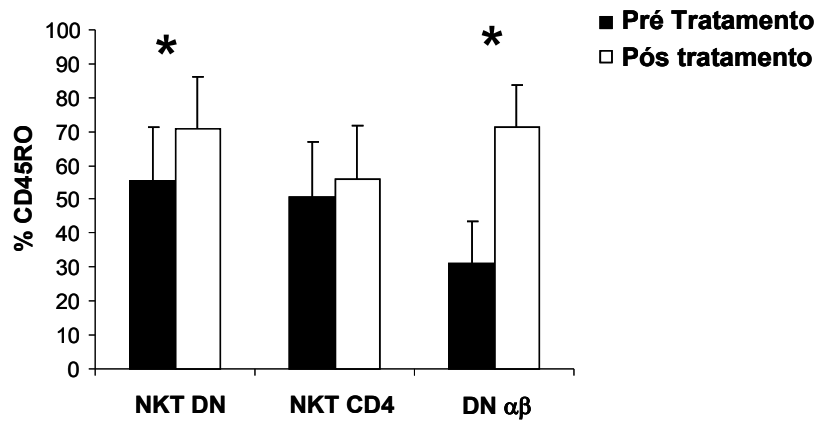
A**B**

Figura 20: Comparação da expressão de CD69 e CD45RO nas células NKT e DN $\alpha\beta$ antes e após o tratamento dos pacientes com LC. Leucócitos de pacientes com LC (n=13 ou n=11) foram analisados *ex vivo*. As células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti-CD69 PE, anti CD45RO PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. Os gráficos representam a frequência média de expressão de CD69 (A), CD45RO (B) dentro das sub-populações de células NKT (NKT DN E NKT CD4⁺) e células T DN $\alpha\beta$. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.11 Comparação *in vitro* da capacidade citotóxica e produção de citocinas pelas sub-populações de células T CD4⁻CD8⁻ DN expressando o TCR $\alpha\beta$ e NKT em pacientes com LC, tanto antes quanto após o tratamento da doença

Após realizarmos a análise *ex vivo* das sub-populações celulares estudadas aqui, comparamos entre esses subgrupos celulares (DN $\alpha\beta$ e NKT), após cultura estimuladas ou não com SLA, analisando a expressão de granzima A, uma molécula citotóxica, e de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ , TNF- α e IL-17) e anti-inflamatória IL-10. Essas comparações foram realizadas entre os subtipos celulares antes, como também após o tratamento da LC.

5.11.1 Análise comparativa da capacidade citotóxica entre as células T DN $\alpha\beta$ e NKT (DN e CD4⁺) antes e após o tratamento da LC.

Nossos dados mostraram que, ao comparamos as células T DN $\alpha\beta$, com os subgrupos de células NKT (DN e CD4⁺), as células T DN $\alpha\beta$ expressaram maior frequência de granzima A do que as células NKT CD4⁺, antes do tratamento. Análises realizadas pós-tratamento, mostraram que esse perfil era mantido, mas que as células T DN $\alpha\beta$ também apresentavam maior expressão de granzima A do que as NKT DN (Tabela 5). Curiosamente, esse perfil era similar tanto antes, quanto após o estímulo com o SLA (dados não mostrados).

Tabela 5- Comparação *in vitro* da expressão de granzima A e citocinas entre sub-populações linfocitárias de pacientes com LC antes e após o tratamento.

<i>In Vitro</i> * Meio	Granzima A**	IFN- γ ***	TNF- α	IL-17	IL-10***
Pré tratamento					
$\alpha\beta$ DN	49 \pm 22,1	5,4 \pm 3,7	9,3 \pm 14,4	13,5 \pm 4,8	3,5 \pm 1,8
NKT DN	40 \pm 29	5 \pm 6,4	7,4 \pm 4,2	10,5 \pm 7,2	5 \pm 4,1
NKT CD4 ⁺	17,2 \pm 15,3	12,7 \pm 10,4	3,7 \pm 2,3	7,2 \pm 6	5,5 \pm 2,7
Pós tratamento					
	Granzima A ⁺	IFN- γ ⁺⁺	TNF- α	IL-17 ⁺⁺	IL-10 ⁺
$\alpha\beta$ DN	72,1 \pm 13,7	7,13 \pm 4	22 \pm 5,2	3,4 \pm 2	16,2 \pm 6,4
NKT DN	45,5 \pm 16,6	11,3 \pm 10,2	21,5 \pm 4,3	11,2 \pm 3,8	9,4 \pm 3,9
NKT CD4 ⁺	19,7 \pm 5,8	15,4 \pm 5,5	13,2 \pm 8	8,5 \pm 3,8	3,5 \pm 2

Resultados expressos como média \pm desvio padrão

** Valor da frequência média da expressão de granzima A maior nas sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ comparadas com as células NKT CD4⁺ nos pacientes com LC antes do tratamento (n=13). A diferença foi significativa e determinada por teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

*** Valor da frequência média da expressão de IFN- γ e IL-10 maior nas sub-populações de células NKT CD4⁺ comparadas com as células NKT DN e DN $\alpha\beta$ nos pacientes com LC antes do tratamento (n=13). A diferença foi significativa e determinada por teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

+ Valor da frequência média da expressão de granzima A e IL-10 maior nas sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ comparadas com as células NKT DN e NKT CD4⁺ nos pacientes com LC após o tratamento (n=8). A diferença foi significativa e determinada por teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

++ Valor da frequência média da expressão de IFN- γ e IL-17 maior nas sub-populações de células NKT DN e NKT CD4⁺ comparadas com as células T DN $\alpha\beta$ nos pacientes com LC após o tratamento (n=8). A diferença foi significativa e determinada por teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.11.2 Análise comparativa entre as células T DN $\alpha\beta$ e NKT (DN e CD4⁺) produtoras de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatória IL-10, antes e após o tratamento da LC.

Após compararmos as características citotóxicas entre as sub-populações linfocitárias estudadas aqui, realizamos comparações entre as células T DN $\alpha\beta$ e as células NKT (DN e CD4⁺), relacionadas com a produção de citocinas pró e anti-inflamatórias.

Observamos que, na doença ativa, as células NKT CD4⁺ são maiores produtoras de IFN- γ e IL-10, do que as células T DN $\alpha\beta$, independentemente do estímulo. Esse resultado é muito interessante, pois, anteriormente mostramos que as células NKT CD4⁺ são maiores produtoras de IFN- γ que as NKT DN. Após o tratamento, o perfil de maior produção de IFN- γ é mantido pelas células NKT CD4⁺, como também as células NKT DN produzem mais IFN- γ do que as DN $\alpha\beta$ (Tabela 5).

O que é mais intrigante ainda, foi que análises dessas sub-populações pós-tratamento, antes do estímulo com SLA, mostraram uma inversão do resultado pré-tratamento no que diz respeito à produção de IL-10, ou seja, as células T DN $\alpha\beta$ e as células NKT DN, são maiores produtoras de IL-10, do que as células NKT CD4⁺. Além disso, células T DN $\alpha\beta$ também expressam mais IL-10 do que as células NKT DN (Tabela 5), após o tratamento. Esses resultados não se alteraram após o estímulo com SLA (dados não mostrados).

Análises comparativas entre as sub-populações linfocitárias estudadas nessa parte do trabalho, não mostraram diferenças significativas em relação à produção de TNF- α , nem antes, nem após o tratamento da LC (Tabela 5), independentemente do estímulo.

5.11.3 Análise comparativa entre as células T DN $\alpha\beta$ e NKT (DN e CD4⁺) produtoras da citocina IL-17, antes e após o tratamento da LC.

O estudo da resposta imune relacionada ao papel da IL-17 na LC ainda é pouco explorado. Nós realizamos análises comparativas entre as sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT (NKT DN e NKT CD4⁺) antes do tratamento, em relação à expressão de IL-17, como também após o tratamento dos pacientes com LC.

Antes do tratamento dos pacientes com LC, observamos que ao compararmos a produção de IL-17 entre as sub-populações DN $\alpha\beta$ e NKT, não obtivemos diferenças

estatisticamente significantes entre elas, tanto antes (Tabela 5), como após o estímulo com SLA (dados não mostrados). Porém, após o tratamento, as células NKT DN, como também as NKT CD4⁺, expressavam maior frequência de IL-17 do que as células T DN αβ (Tabela 5 e figura 21), independentemente do estímulo.

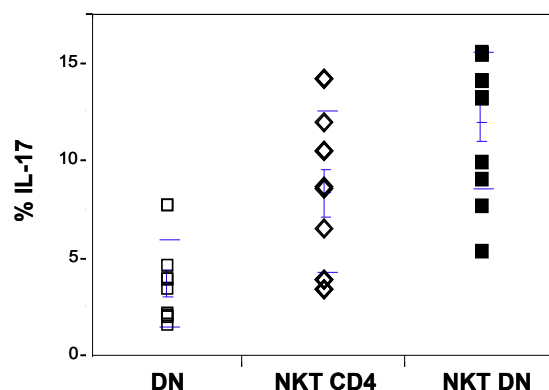


Figura 21: Comparação da expressão de IL-17 entre as células NKT e DN αβ após o tratamento dos pacientes com LC. Leucócitos de pacientes com LC (n=8) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti IL-17 PE, anti-TCRαβ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de IL-17 dentro das sub-populações de células T DN αβ e NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), sem estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.12 Análise individual da expressão de granzima A e citocinas nas sub-populações linfocitárias NKT e DN αβ, antes e após o tratamento da LC, após cultura.

Nos próximos dados iremos demonstrar a diferença na expressão de importantes marcadores imunológicos comparando antes e após o tratamento da LC, as sub-populações de células T DN αβ e NKT individualmente, com a finalidade de avaliar a funcionalidade dessas sub-populações após a cura da doença.

5.12.1 Expressão de granzima A aumenta nas células T DN $\alpha\beta$ após o tratamento da LC.

Nos dados acima, demonstramos que as células T DN $\alpha\beta$ possuem maior frequência de expressão de granzima A do que os subgrupos de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺). Aqui, comparamos a expressão dessa molécula citotóxica nessas mesmas sub-populações antes e após o tratamento de pacientes com LC, tanto antes quanto após estímulo com SLA.

Nossos dados demonstraram que, as células T DN $\alpha\beta$ apresentaram espontaneamente, maior frequência de expressão de granzima A, após tratamento dos pacientes com LC (Figura 22). O estímulo com o SLA manteve o mesmo perfil nas células DN $\alpha\beta$ (dados não mostrados). Já as células NKT DN e NKT CD4⁺, não apresentaram diferenças entre a comparação pré e pós-tratamento, independentemente do estímulo.

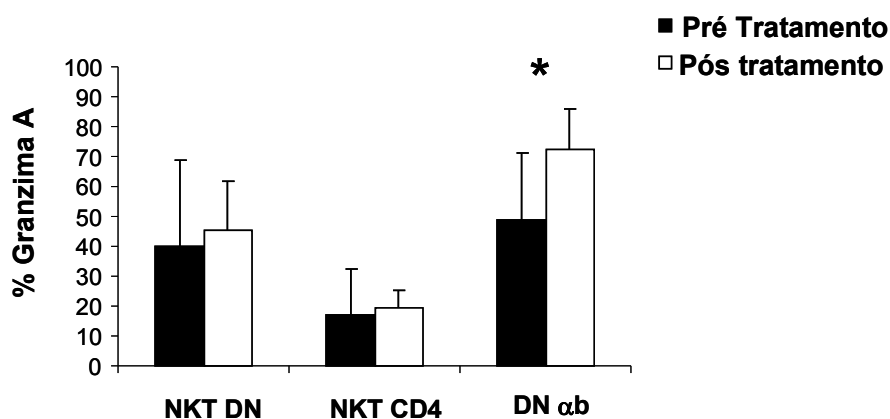


Figura 22: Comparação da expressão de granzimaA nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC. Leucócitos de pacientes com LC (n=13 ou n=8) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti granzima A PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de granzima A dentro das sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.12.2 Frequência média de expressão de IFN- γ e TNF- α está aumentada em pacientes com LC após o tratamento.

Analizamos a expressão de duas importantes citocinas pró-inflamatórias nas células T DN $\alpha\beta$, como também nas células NKT DN e NKT CD4⁺, nos pacientes tratados para leishmaniose cutânea.

Observamos que ocorre aumento de frequência média de expressão de IFN- γ nas células NKT DN dos pacientes com LC, após serem tratados. Em relação às células NKT CD4⁺ e DN $\alpha\beta$, não observamos diferenças relevantes (Figura 23 A). Interessante notar que o SLA induz um aumento da expressão de IFN- γ nos subgrupos de células NKT DN (de 11.33 \pm 10.2 para 17.4 \pm 13.11) e NKT CD4⁺ (de 15.35 \pm 5.5 para 25.5 \pm 10.4), após o tratamento da LC, sugerindo que essas células reagem de forma antígeno específica após entrarem em contato com o parasita.

Curiosamente, a expressão de TNF- α aumenta espontaneamente em todas as sub-populações de células T avaliadas (DN $\alpha\beta$, NKT DN e NKT CD4⁺), após o tratamento da LC (Figura 23 B), não ocorrendo diferença após estímulo com SLA (dados não mostrados).

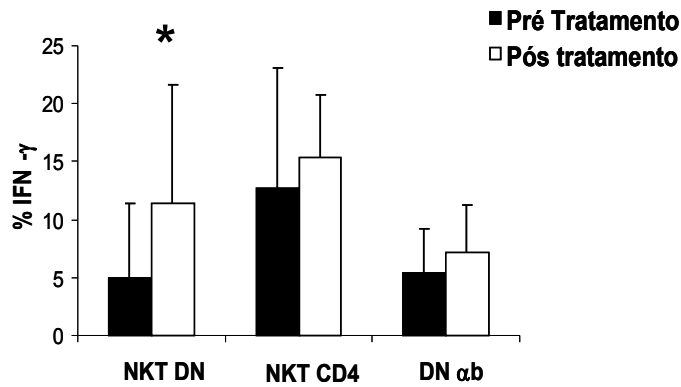
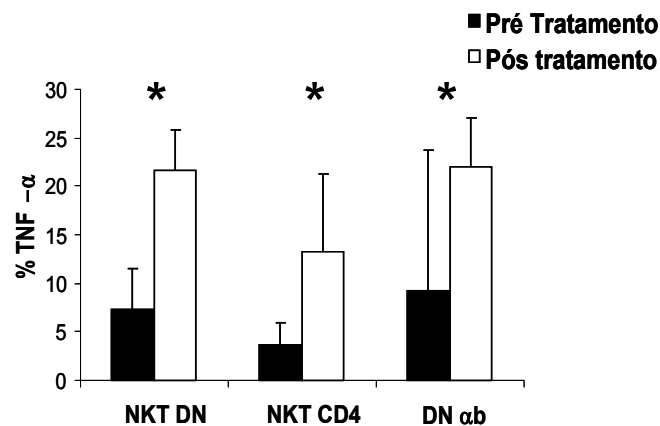
A**B**

Figura 23- Comparação da expressão de IFN- γ e TNF- α nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC. Leucócitos de pacientes com LC (n=13 ou n=8) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti IFN- γ PE e TNF- α PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. Os gráficos representam a frequência média de expressão de IFN- γ (A) e TNF- α (B), dentro das sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

5.12.3 Células T CD4⁺CD8⁻ duplo negativas $\alpha\beta$ diminuem a frequência média de expressão de IL-17 nos pacientes com LC após o tratamento.

Ao avaliarmos a produção de IL-17 nas sub-populações linfocitárias estudadas nesse trabalho após os pacientes com LC serem tratados, observamos que não houve diferença na frequência de expressão de IL-17 nos subgrupos de células NKT (Figura 24) antes de serem estimuladas com SLA. Após o estímulo observamos que o SLA não induziu a mudança de

perfil de expressão de IL-17 nas células NKT CD4⁺ (dados não mostrados). Contudo, o SLA foi capaz de induzir aumento de IL-17 nas células NKT DN pós tratamento, demonstrando novamente a antígeno especificidade desta sub-população NKT para a produção de IL-17 (dados não mostrados).

Analisando a sub-população de células T DN $\alpha\beta$, notamos que após o tratamento, a produção de IL-17 por essas células diminuiu drasticamente, independentemente do estímulo (Figura 24).

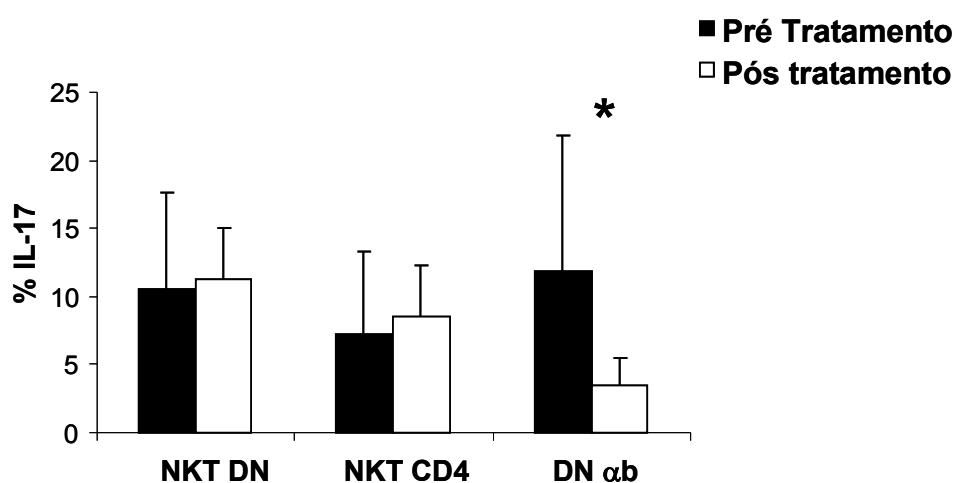


Figura 24- Comparação da expressão de IL-17 nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC. Leucócitos de pacientes com LC (n=13 ou n=8) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti IL-17 PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de IL-17 dentro das sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de p =0,01.

5.12.4 Células T CD4⁺CD8⁻ duplo negativas $\alpha\beta$ e NKT DN aumentam a frequência média de expressão de IL-10, enquanto que as células NKT CD4⁺ diminuem, nos pacientes com LC após o tratamento.

Ao avaliarmos a produção de IL-10, citocina anti-inflamatória, após o tratamento dos pacientes com LC, observamos que ocorre aumento de expressão desta

citocina tanto nas células T DN $\alpha\beta$, quanto nas células NKT DN, independentemente do estímulo, pós tratamento (Figura 25).

Já nas células NKT CD4⁺, ocorre o inverso, ou seja, após o tratamento da LC a produção de IL-10 por estas células diminui, antes de serem estimuladas com o SLA (Figura 25). Após o estímulo com SLA, essas células NKT CD4⁺ aumentam a expressão de IL-10, demonstrando a antígeno especificidade desse subgrupo de NKT (dados não mostrados).

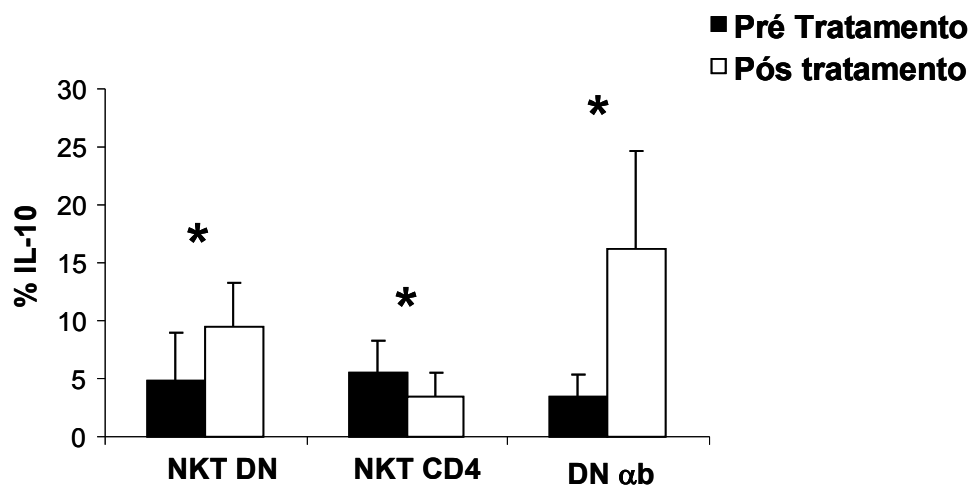


Figura 25- Comparação da expressão de IL-10 nas células NKT e DN $\alpha\beta$ após o tratamento dos pacientes com LC. Leucócitos de pacientes com LC (n=13 ou n=8) foram mantidos em cultura sem estímulo (meio). Após 20 horas de cultura as células foram marcadas com anticorpos anti-NKT (6B11) FITC, anti IL-10 PE, anti-TCR $\alpha\beta$ PECy5, anti-CD8 PECy7 e anti-CD4 APC e analisadas utilizando a técnica de citometria de fluxo e o programa FlowJo. O gráfico representa a frequência média de expressão de IL-10 dentro das sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT (NKT DN E NKT CD4⁺), antes do estímulo com SLA. Os resultados foram mostrados como média e +/- desvio padrão. A diferença foi significativa e determinada pelo teste t pareado com um valor de $p \leq 0,05$.

6 DISCUSSÃO

6.1 Sub-populações específicas de células T CD4⁺ definidas pela expressão da região V β do TCR podem estar associadas com perfil patogênico e tamanho da lesão na leishmaniose humana.

O sistema imunológico reúne uma variedade de componentes que são importantes para a manutenção do equilíbrio geral do organismo. Após a infecção, existe a necessidade do combate ao patógeno, para manter esse equilíbrio, que é fundamental para a saúde do hospedeiro.

A compreensão dos eventos que levam à eficácia da resposta imune celular em humanos infectados com patógenos intracelulares como a *Leishmania* é a chave para o desenvolvimento de vacinas eficazes, métodos de diagnóstico e imunoterapia. Compreender plenamente o papel de células T no estabelecimento e manutenção da resposta imune eficaz contra patógenos é fundamental para estudar a dinâmica de determinadas sub-populações de linfócitos em indivíduos infectados.

Uma maneira poderosa de monitorar a resposta de células T é estudar individualmente sub-populações de células T com base em sua expressão do receptor de células T (TCR). Devido à disponibilidade de um painel de excelentes anticorpos monoclonais anti-TCR V β , juntamente com a citometria de fluxo, somos capazes de acompanhar a progressão das respostas dessas células em pacientes infectados com a esperança de identificação de sub-populações específicas possivelmente mais envolvidas no estabelecimento de uma resposta imune protetora ou patogênica. Nosso trabalho permitiu determinar não só a frequência dessas sub-populações específicas, mas também o status funcional via produção de citocinas e estado de ativação.

Utilizando estudos de repertório de células T podemos detectar respostas dominantes de células específicas contra complexos MHC-peptídeo ou MHC-superantígeno (Herman A., *et al.*,1991; Uyemura, K, *et al.*,1993). Assim, utilizando a técnica de citometria fluxo para identificar sub-populações de células T com base em sua região V β do TCR de indivíduos ativamente infectados, objetivamos determinar o papel das sub-populações específicas na LC humana.

Lohoff e colaboradores em 1994 tentando comprovar, na leishmaniose experimental, se a diferença funcional entre células Th1 e Th2 está relacionada à expressão preferencial do repertório V β , verificaram que ambas as sub-populações celulares expressavam os mesmos V β . Estes dados sugerem que diferentes antígenos dominantes não estão envolvidos no direcionamento de respostas Th1 ou Th2 no desenvolvimento da leishmaniose murina. Apesar da resposta antígeno específica não estar relacionada com a diferenciação dos diferentes perfis de células T, Reiner e colaboradores, em 1993, relacionaram a susceptibilidade de camundongos BALB/c a *Leishmania major* a uma restrita população celular CD4⁺ V α 4⁺V β 8⁺ após interação com um antígeno recombinante deste parasita.

Dentro do vasto território imunológico, existe uma classe de antígenos, que são derivados de diversos microorganismos e são denominados superantígenos, que causam uma forte ativação de linfócitos T CD4⁺ e liberação de citocinas, podendo causar também choque séptico (Gollob, K. J. & Palmer E., 1992; Fraser, J., *et al.*, 2000). No caso dos superantígenos, a especificidade com o complexo MHC-peptídeo e a co-estimulação é dispensada, uma vez que a ativação se dá pela interação desta molécula com a cadeia β do TCR e a molécula de classe II do MHC (Proft, T., *et al.*, 2003). Deste modo, todas as células T pertencentes a dada família V β estarão sujeitas ao reconhecimento deste superantígeno e a sofrer proliferação, que é denominada expansão policlonal (Hong-Geller, E. & Gupta, G., 2003).

O conhecimento sobre as diversas sub-populações de linfócitos envolvidos com doenças parasitárias, expressão de moléculas e citocinas durante o desenvolvimento da doença e também sobre o repertório específico para determinada doença nos fornecem importantes informações. Para melhor entendimento da patologia, a resposta imune contra um agente infeccioso pode ser caracterizada quanto à presença de antígenos convencionais, peptídeos imunodominantes ou superantígenos. O repertório de células T envolvido na resposta a antígenos se caracteriza por sua diversidade, uma vez que distintos epitopos e diferentes antígenos do patógeno podem induzir proliferação de células T com divergentes especificidades. Já a resposta a peptídeos imunodominantes se caracteriza pela expansão preferencial de alguns clones de células T, que são expandidos como consequência da apresentação preferencial de um peptídeo antigênico, caracterizando uma expansão oligoclonal das células T (Bottrel, R. L. *et al.*, 2001).

Um trabalho importante demonstrou que, estímulos por superantígenos levam a uma grande proliferação de populações específicas, seguida de deleção devido à morte por super

ativação (Gollob, K. J. & Palmer E., 1992). Os resultados encontrados neste estudo, até o momento, não demonstram se existe ou não uma atividade superantigênica causada pela *L. braziliensis*. Esse trabalho identificou o envolvimento de várias sub-populações de células T CD4⁺ com expressão diferencial de V β , tanto de citocinas que podem induzir a ativação de células fagocíticas, como por exemplo, os monócitos e os macrófagos, quanto das citocinas imunoreguladoras.

Alguns trabalhos realizados na leishmaniose humana, já demonstraram que a cura da leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* está associada com maior porcentagem de células T CD8⁺ reativas à *Leishmania* e maior produção de IFN- γ , visto nos mesmos pacientes durante a doença ativa (Da-Cruz, A. M., *et al.*, 1994). Outro trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo investigou se diferenças nos antígenos da *Leishmania amazonensis*, encontradas nas lesões ativas comparadas com lesões curadas, seriam relevantes para os mecanismos de ativação diferencial das células T CD4⁺ e CD8⁺, e que uma redução da carga parasitária pelo uso da terapia antimonial, pode alterar as respostas ao antígeno (Coutinho, S. G., *et al.*, 1996).

Em LC causada por *L. braziliensis*, as células T apresentam um forte perfil Th1 com altos níveis de produção de IFN- γ (Bonfim, G. C., *et al.*, 1996), e células T CD4⁺ são a principal fonte de IFN- γ no sangue periférico (Bottrel, R. L., *et al.*, 2001), bem como em lesões de pacientes com LC (Bacellar, O. *et al.*, 2002; Faria *et al.*, 2005).

Análise comparativa do repertório entre indivíduos não-infectados e pacientes com LC foram realizadas no presente estudo. A frequência de células T CD4⁺ expressando sub-regiões V β específicas apresentou grande heterogeneidade nos dois grupos conforme o esperado, com base em estudos anteriores de repertório TCR em humanos (Menezes, C. A. *et al.*, 2004). A maioria das sub-populações V β apresentaram frequências equivalentes entre os controles não-infectados e pacientes infectados com *L. braziliensis*. Contudo, células T CD4⁺ de pacientes com LC expressando V β 5.2 apresentaram frequências aumentadas em relação às mesmas células de indivíduos não infectados (Figura 6). Isso pode indicar que essa sub-população está envolvida na resposta contra *Leishmania* e desempenha um papel importante na LC humana. Em doenças causadas por patógenos agudas, as células T envolvidas na resposta podem desempenhar papéis distintos com relação à sua frequência, dependendo da natureza do estímulo antigênico e do tipo de doença. As células T envolvidas diretamente na

resposta e reconhecimento de um peptídeo antigênico específico ou superantígeno podem estar em uma fase de expansão ou até mesmo em uma fase de eliminação. Ambas as fases

podem ser um reflexo do estímulo antigênico em que podem levar a uma expansão de uma determinada sub-população específica de células T ou até mesmo conduzindo à supressão devido à reestimulação crônica e posterior morte das células T (Fontenot, A. P., *et al.*, 1998; Menezes, C. A., *et al.*, 2004).

Embora estes resultados tenham evidenciado um grupo de células T que podem estar envolvidas na resposta, a determinação da resposta antígeno específica ou superantigênica, também é fundamental para determinar o seu possível papel na resposta contra a *Leishmania*. Assim, nós também realizamos estudos comparativos das células antes e após o estímulo antigênico entre indivíduos não infectados (dados não mostrados) e pacientes com LC (Figura 7). Quando comparamos células T CD4⁺ expressando distintos Vβ nos indivíduos não infectados, antes e após o estímulo com SLA, não observamos diferenças na expressão de Vβ (dados não mostrados). Já quando comparamos essas mesmas sub-populações nos pacientes com LC, nós observamos que SLA induziu um aumento na expressão de Vβ 5,2, 11, 12 e 17 nas células T CD4⁺, o que sugere que elas podem estar envolvidas na resposta contra a *Leishmania*. Juntamente com a comparação dos resultados entre indivíduos não-infectados e pacientes com LC, identificamos várias sub-populações possivelmente envolvidas na resposta contra a *Leishmania*. Uma população, em especial exibiu aumento da frequência quando comparamos pacientes com LC com indivíduos não-infectados, como também quando comparamos células T CD4⁺ de pacientes com LC, após o estímulo antigênico, que foram as células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2, o que sugere que essa sub-população pode desempenhar papel importante na doença.

Nosso grupo, estudando o sangue periférico de pacientes chagásicos, verificou que células isoladas a fresco de pacientes agudos apresentavam frequência diminuída de linfócitos CD4⁺Vβ5⁺, enquanto pacientes crônicos cardíacos apresentavam frequência aumentada desta sub-população, sugerindo que essa sub-população pode possuir um papel importante na doença, após entrar em contato com antígenos do parasita. Além disso, observou-se que o estímulo com tripomastigota induzia a proliferação de células CD8⁺ Vβ5⁺ apenas em cardíacos. Estes resultados revelam uma expressão diferencial de Vβ5 nas células isoladas a fresco de pacientes em diferentes fases da doença de Chagas e que antígenos do parasita estimulam uma porção do repertório com expressão preferencial de Vβ5, sugerindo que essa

sub-população linfocitária pode estar envolvida com perfil patogênico na doença de chagas (Costa, R. P., *et al.*, 2000).

Outro estudo realizado por nosso grupo de pesquisa em doença de Chagas, demonstrou que as sub-populações de células T CD4⁺CD28⁺ e CD4⁺CD28⁻ apresentam expressão diferencial da região Vβ5 e que células T CD4⁺CD28⁺ possuem expressão preferencial da região Vβ 3.1 em todos os grupos de pacientes com doença de Chagas. Já em pacientes chagásicos que apresentavam a forma clínica indeterminada, as células T CD8⁺CD28⁺ apresentaram expansão preferencial da região Vβ 5 do TCR (Menezes, C. A., *et al.*, 2004).

Outro resultado interessante neste estudo foi que, ao compararmos as células T CD4⁺ com expressão diferencial de Vβ entre os pacientes, a frequência das células T CD4⁺ expressando Vβ12 aumentou, após serem estimuladas com o SLA (figura 7). Esse resultado também foi observado por Clarencio e colaboradores (2006), em pacientes que apresentavam LC causada por *L. amazonensis*, sugerindo a existência de antígenos dominantes comuns ou até mesmo de superantígenos, nessas diferentes espécies de *Leishmania* e que esses mesmos antígenos levam a uma expansão similar de sub-populações de células T.

Diferenças nas frequências dessas sub-populações celulares são apenas uma medida possível da participação de uma sub-população específica de células T em uma resposta imune ativa. Existe a possibilidade de que pequenas alterações ou nenhuma mudança global na frequência de sub-populações de células T possam ser notadas devido a um equilíbrio entre expansão e morte de células T respondedoras. No entanto, por determinação da contribuição de uma determinada sub-população comprometida com um fenótipo ativado, de memória, ou com a produção de citocinas específicas, podemos determinar a sua participação relativa e possível papel funcional em uma resposta imune protetora ou patogênica. Assim, foi realizada análise comparativa entre diferentes sub-populações Vβ específicas, que expressam tanto um marcador de ativação celular precoce ou tardia, CD69 e da molécula de classe II, HLA-DR, ou um marcador associado com muitas células T de memória, CD45RO. Estes marcadores foram avaliados *in vitro* sem estímulo antigênico com o objetivo de determinar o seu envolvimento nos pacientes infectados com *Leishmania*.

Ao compararmos pacientes com LC e indivíduos não infectados no que diz respeito a esses marcadores, observamos que a maioria das células T CD4⁺ expressando os distintos Vβ analisados eram mais ativadas nos pacientes do que nos controle tanto para o marcador de

ativação recente CD69, quanto para o marcador de ativação tardia HLA-DR (Figuras 8 A e B). Ao compararmos a molécula de memória nas células T CD4⁺ expressando Vβ nesses dois grupos, observamos que somente a sub-população expressando o Vβ 5.2 apresentou frequência aumentada de CD45RO comparando pacientes com os controle (Figura 8C).

Ao comparamos a expressão dessas mesmas moléculas entre as células T CD4⁺ expressando Vβ nos pacientes com LC, observamos um significativo aumento no perfil de ativação tardia (HLA-DR) e memória (CD45RO) nas sub-populações de células T CD4⁺ expressando três distintos Vβ (Vβ 5.2, 11 e 24) (Figuras 9 A e B).

Assim, por essas três medidas independentes de exposição antigênica prévia, essas sub-populações demonstraram um fenótipo consistente com uma maior participação em uma resposta imune em curso, do que as outras sub-populações de células T. Observação importante foi de que estas duas sub-populações de células T CD4⁺ (Vβ 5.2 e Vβ 11), também exibiram uma expansão, em comparação com indivíduos não-infectados e/ou a expansão *in vitro* antígeno específica (Figuras 6 e 7). Estudos anteriores, demonstraram que células T CD4⁺ CD45RO⁺ de pacientes com LC analisados *ex vivo*, apresentaram uma correlação positiva entre produção de IFN-γ e IL-10 (Antonelli, *et al*, 2004). Este resultado sugere que a nível individual, o aumento na frequência de células T CD4⁺ de memória pode predizer um maior comprometimento de células produtoras de citocinas, SLA específicas, tanto da citocina inflamatória IFN-γ quanto da citocina anti-inflamatória IL-10 (Antonelli, L. R., *et al*, 2004). Estes resultados mostraram que células T CD4⁺ expressando Vβ distintos de pacientes cutâneos são mais ativadas do que as mesmas células do grupo controle e que, mais uma vez, células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2 estão relacionadas com a doença cutânea, devido as suas características de ativação e memória aumentadas comparando com as sub-populações Vβ CD4⁺ específicas.

Para entender melhor o potencial funcional de sub-populações antígeno específicas de linfócitos T CD4⁺ com base na expressão de Vβ, nós medimos o seu comprometimento relativo com a produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN-γ e TNF- α) e anti-inflamatória IL-10.

Curiosamente, o SLA induziu aumento de expressão das citocinas avaliadas nas mesmas três sub-populações de células T CD4⁺ Vβ específicas (Vβ 5.2, 11 e 24), em comparação com a maioria dos outros Vβ (Figura 10).

Um aspecto importante da leishmaniose humana e outras doenças infecciosas é o balanço entre citocinas inflamatórias e as moduladoras. Na leishmaniose mucosa humana causada pela infecção por *L. braziliensis*, é provável que a patologia seja o resultado de uma resposta inflamatória não regulada induzida por várias populações de células T, levando a uma maior produção de IFN-gama, TNF-alfa e possivelmente IL-17 (Bacellar, O., *et al.*, 2002; Gaze, S. T., *et al.*, 2006; Faria et al., 2005; Gomes-Silva, A., *et al.*, 2007; Bacellar, O., *et al.*, 2007). Além disso, na forma clínica mais branda da leishmaniose causada por *L. braziliensis*, a leishmaniose cutânea, ocorre um balanço entre produção dessas citocinas que, frequentemente causa uma imunidade protetora nos indivíduos. Nós recentemente demonstramos uma correlação entre células T produtoras de citocinas inflamatórias e células T ativadas com o tamanho da lesão na doença cutânea (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004; Antonelli, L. R., *et al.*, 2005).

Curiosamente, as mesmas sub-populações de células T CD4⁺ expressando Vβ 5.2 e 11, que mostraram maior proporção de células comprometidas com perfil de ativação e memória, e também mostraram maiores freqüências de células produtoras de citocinas estão entre as que apresentaram co-regulação da produção de IFN-γ e TNF-α. Sub-populações de células T CD4⁺ expressando os Vβ 8 e 17 também apresentaram essa co-regulação (Figura 11). Dessa forma, somente sub-populações de células T CD4⁺ expressando os Vβ 5.2 e 24, apresentaram co-regulação entre citocinas inflamatórias (IFN-γ e TNF-α) e anti-inflamatória IL-10 (Figura 12). Essas mesmas sub-populações mostraram envolvimento na LC, como demonstrado pelos outros marcadores analisados no trabalho (Figuras 6-10). Esses achados corroboram os achados do nosso grupo, que demonstraram co-regulação de células T CD4⁺ produtoras de citocinas nos pacientes com LC, após estímulo com SLA (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004). Esses resultados sugerem que essas sub-populações de células T CD4⁺ Vβ específicas estão significativamente envolvidas na resposta imune durante a infecção ativa com *L. braziliensis*, nos pacientes que apresentam a forma clínica cutânea, podendo até mesmo estar mais envolvidas com o perfil patogênico dessa doença, e reconhecimento de um pato-antígeno.

Pesquisadores têm demonstrado que os mecanismos de cura ou resistência à infecção por *Leishmania* estão associados com células produtoras de IFN-γ e TNF-α, induzindo a produção de radicais livres em macrófagos, levando à erradicação do patógeno (Rogers, K. A., *et al.*, 2002). Estudos em nosso laboratório demonstraram que camundongos da linhagem BALB/c infectados com *L. major*, tratados com N-acetilcisteína (NAC), um agente precursor

da glutathiona, apresentam aumento na produção de IFN- γ e TNF- α , o que levou a menor destruição e parasitismo tecidual, modulando a resposta imune, com melhora da cinética da infecção, indicando assim, que a glutathiona é importante para o controle da progressão da leishmaniose no modelo murino (Rocha-Vieira, E., *et al.*, 2003). Assim, as sub-populações de células T aqui identificadas com base na sua expressão V β são coerentes com o perfil global visto na população de células CD4⁺ T (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004; Gaze, S. T., *et al.*, 2006), tendo significado funcional, que poderia levar a um perfil de controle da doença e, possivelmente, a um perfil patológico na LC humana. Embora a co-regulação das citocinas inflamatórias TNF-alfa e IFN-gama com a citocina anti-inflamatória IL-10 seja vista apenas em uma das sub-populações de células T do V β (Figuras 12 A e B), esta foi uma das populações que demonstrou consistentemente estar envolvida em todos os aspectos da resposta com um aumento na frequência de expressão de marcadores de memória e ativação, assim como a produção de citocinas.

Ao realizar a análise das associações entre a frequência de sub-populações de células T CD4⁺, estimuladas ou não com o SLA, expressando distintas regiões V β do TCR com o tamanho da lesão, apenas a sub-população expressando V β 5.2 mostrou uma correlação com a área de lesão (Figura 13). Ou seja, quanto maior a área da lesão, maior a frequência de células T CD4⁺ expressando V β 5.2 no sítio da lesão. Isso é surpreendente, dado que nenhuma das outras oito sub-populações V β demonstraram essa correlação significativa. Realizamos também análises dessas sub-populações V β específicas no sítio de lesões de pacientes com LC. Observamos novamente a importância das sub-populações de células T CD4⁺ expressando o V β 5.2, pois essas sub-populações estão em maior frequência no sítio da lesão de pacientes com LC (Figura 14). Estes resultados sugerem que essa sub-população V β 5.2 pode estar mais envolvida com o perfil patogênico dessa doença, e até mesmo reconhecimento de um pato-antígeno, devido ao seu envolvimento em todas análises realizadas neste trabalho.

Resumindo, neste trabalho, nós demonstramos a existência de diferentes sub-populações de linfócitos T CD4⁺ definidas por suas regiões V β do TCR, que estão constantemente envolvidas em vários aspectos da resposta imune em indivíduos infectados com *L. braziliensis* e apresentando a forma clínica cutânea da doença. Dado que a grande maioria dos indivíduos com doença tipicamente cutânea resolve a infecção após o tratamento

e têm uma imunidade protetora de longa duração, supomos que algumas dessas células estão envolvidas na formação de uma resposta imune protetora, e que a sub-população de células CD4⁺ expressando o Vβ 5.2 podem também estar associadas com a patologia, no caso da lesão ulcerada. Além disso, nós reforçamos a evidência de que as citocinas moduladoras, tais como IL-10, são co-reguladas com macrófagos ativados por IFN-gama e TNF-alfa. Novos estudos estão em andamento para comparar estas sub-populações de células T no local da lesão com outras formas clínicas de leishmaniose, assim como procurar definir a função dessas células *in situ*. Além disso, o uso desta informação, na tentativa de definir os antígenos responsáveis pela utilização preferencial das sub-populações definidas aqui poderia auxiliar na seleção de antígenos utilizados pela resposta imune humana contra *Leishmania*.

6.2 Células NKT CD4⁻CD8⁻ duplo negativas e CD4⁺ na leishmaniose cutânea humana: Potencial funcional e possível papel na ativação imune *versus* patologia

Os estudos relacionados com essa parte trabalho, caracterizam distintas sub-populações de células NKT semi-invariantes (NKT DN e NKT CD4⁺), demonstrando o papel funcional de cada uma dessas sub-populações na leishmaniose cutânea humana.

Células NKT denominadas semi-invariantes, em humanos e camundongos, possuem a região Vα do TCR idênticas umas com as outras no nível de aminoácidos, mas apesar de expressarem similares Vβ, este pode variar, principalmente no nível de aminoácidos (Bendelac, A., *et al.*, 1997). Em humanos, as células NKT podem ser divididas em três grupos distintos, a saber: NKT CD4⁻CD8⁻duplo negativas, NKT CD4⁺ e NKT CD8⁺, variando com uma frequência aproximada de 40%, 40% e 20% dentro da sub-população NKT total, respectivamente (Ishihara, S., *et al.*, 1999; Berzins, S. P., *et al.*, 2005).

Curiosamente, nossos resultados indicaram que apesar da sub-população de células NKT totais estar diminuídas nos pacientes com leishmaniose cutânea, comparadas com as NKT totais de indivíduos não infectados (Figura 15), essa pequena sub-população apresenta um perfil fortemente ativado e inflamatório durante a infecção ativa causada por *L. braziliensis*. Outros trabalhos também demonstraram diminuição das células NKT totais em outras doenças infecciosas como a tuberculose pulmonar e a SIDA (Godfrey, D. I., *et al.*, 2000; Taniguchi, M., *et al.*, 2003; Snyder-Cappione, J. E., 2007). Uma explicação para que a diminuição desta sub-população na LC é que as células NKT podem estar sendo recrutadas

para o sítio da lesão, linfonodos drenantes ou ainda entrando em apoptose, como um meio de controlar a resposta patológica. Além disso, nós demonstramos que as células NKT, tanto NKT DN quanto as NKT CD4⁺ apresentam um perfil inflamatório com maior produção de citocinas pró-inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) para as NKT CD4⁺ e NKT DN, respectivamente, como também de IL-17, citocina produzida por células NKT DN antígeno específicas. Esses achados sugerem que ambas as sub-populações de células NKT estudadas aqui, podem ter importância no direcionamento da resposta imune inicial em pacientes com LC, o que pode ter importantes implicações no papel ativo de células NKT durante o estabelecimento da doença.

A ativação de células NKT semi-invariantes por glicolípides pode melhorar a resistência em vários modelos de infecção, como infecções virais, bacterianas e parasitárias (Hayakawa, Y., *et al.*, 2001; Parekh, V., *et al.*, 2005). Células NKT parecem ser constantemente ativadas *in vivo* e expressam marcadores que caracterizam bem essa ativação. A explicação para essa situação pode ser uma constante ativação dessas sub-populações em contato com antígenos próprios endógenos (Coquet, J.M., *et al.*, 2008), o que pode sugerir o envolvimento dessas células NKT no controle da homeostase do organismo.

Nesse estudo, após avaliação *ex vivo*, nós estabelecemos de fato que as células NKT semi-invariantes são mais ativadas, e quando comparamos indivíduos não infectados com pacientes com LC, observamos que as NKT de pacientes apresentam maior frequência de ativação dada pelo marcador de ativação recente CD69 (Tabela 1). No nível de ativação, também observamos, que ao compararmos entre as diferentes sub-populações de células NKT de pacientes com LC, que as células NKT DN são hiperativadas comparadas às células NKT CD4⁺ após cultura, independentemente do estímulo (Figura 16). Estudos em modelo murino, também demonstraram que essas sub-populações de células NKT são altamente ativadas e que essa pequena sub-população deve ser importante para o controle da resposta imune contra *Leishmania* (Amprey, J. L., *et al.*, 2004). Apesar de essas células NKT serem mais ativadas, elas não apresentaram diferença na expressão do marcador de memória CD45RO, nem quando comparamos indivíduos não infectados com pacientes, nem quando comparamos as sub-populações dos pacientes com LC (Tabela 1).

Avaliamos também a função citotóxica dessas células NKT, dentro das diferentes sub-populações (NKT DN e NKT CD4⁺) de pacientes com LC, analisando a expressão de granzima A, uma molécula associada à função citotóxica, nessas células. Nossos resultados

sugerem que células NKT DN são mais citotóxicas que as células NKT CD4⁺, como demonstrado pela expressão aumentada de granzima A nessa sub-população (Figura 17). Sabemos que as células NKT compartilham características funcionais com as células NK, e essa expressão de citotoxicidade maior nas NKT DN já era esperado por nós, pois por não expressarem nenhum co-receptor (CD4/CD8), podemos pensar que são mais semelhantes às células NK da imunidade inata. Entretanto, estudos funcionais seriam adequados para confirmarmos esses dados.

Células NKT são caracterizadas por produzirem rapidamente grandes quantidades de citocinas Th1 e Th2, como por exemplo o IFN- γ , citocina importante na iniciação e regulação de várias repostas imune (Berzins, S. P. *et al.*, 2005; VON, S.E & Sunderkotter, C., 2007). Na leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis*, células T apresentam forte perfil Th1 com altos níveis de produção de IFN- γ (Bonfim, G. C., *et al.*, 1996) e que as células T CD4⁺ são a principal fonte produtora dessa importante citocina no sangue periférico (Bottrel, R., *et al.*, 2001). Uma citocina também muito importante na LC é a citocina anti-inflamatória IL-10 (Antonelli, L. R., *et al.*, 2004; Faria, D.R. *et al.*, 2005), já que exibe propriedade de desativar os macrófagos e modula a resposta inflamatória, controlando uma resposta que poderia ser exacerbada devido a produção de citocinas pró-inflamatórias.

Outra população de células T bastante estudada ultimamente, mas pouca caracterizada na LC são as células Th17 CD4⁺ (Langrish, C.L., *et al.*, 2005). Estudos têm mostrado que as células NKT além de possuírem características Th1 e Th2, compartilham também características com as populações Th17, por produzirem essa citocina e expressarem o fator de transcrição relacionado com as Th17, o ROR γ T (Parekh, *et al.*, 2005; Niemeyer, M., *et al.*, 2008). Além disso, pesquisadores demonstraram que a principal fonte de IL-17 dentre as sub-populações NKT semi-invariantes, são as células NKT CD4⁻ (Coquet, J.M., *et al.*, 2008).

Nesse trabalho, além de identificar as células NKT DN como mais ativas e citotóxicas que as NKT CD4⁺, essas sub-populações são também maiores produtoras de TNF-alpha, além de serem maiores produtoras de IL-17 do que as NKT CD4⁺, após estímulo com SLA (Figuras 18 A e 19). Esses resultados corroboraram os achados em modelos murinos, nos quais as células NKT CD4⁻ são maiores produtoras de IL-17 (Coquet, J. M., *et al.*, 2008; Niemeyer, M. A., *et al.*, 2008).

Já as células NKT CD4⁺ também possuem características inflamatórias por serem maiores produtoras de IFN-gamma do que as NKT DN (Figura 18 B). Células NKT CD4⁺

estão também implicadas na proteção em estágios iniciais na leishmaniose murina (Ishikawa H., 2000). Dessa forma, esse grupo de resultados pode sugerir que ambas as sub-populações de células NKT podem ter um importante papel na leishmaniose cutânea humana, sugerindo que possivelmente existe um controle na frequência total dessa sub-população, já que as células NKT apresentam perfil inflamatório aumentado, o que poderia levar a um desenvolvimento de maior gravidade na doença cutânea.

Nossos dados originam a questão de que perfis diferentes nessas duas sub-populações de células NKT, levariam a diferentes funções dessas células na resposta contra a *Leishmania*. Poucos modelos de estudo têm comparado os distintos subgrupos celulares de NKT, mas alguns autores mostraram que células NKT derivadas do fígado são mais numerosas do que em outros órgãos, e que a inibição de IL-4 e IL-10 produzidas por essas células, melhora a capacidade das células NKT do fígado e do timo na rejeição a tumores (Ishihara, S. *et al.*, 1999; Crowe, N. Y., *et al.*, 2005). A produção diferencial de IL-17 pelas sub-populações NKT DN é também caracterizada pela rejeição de tumores (Crowe, N. Y., *et al.*, 2005). Embora os estudos na área de tumor sobre o papel das células NKT estão bem acelerados, isso não se aplica às doenças infecciosas e muito mais precisa ser realizado nessa área com intuito de descobrir como essa pequena sub-população pode ser utilizada no futuro em terapias imunes.

6.3 Distintas sub-populações linfocitárias (DN $\alpha\beta$, NKT DN e NKT CD4⁺) apresentam diferentes perfis funcionais quando comparadas antes e após o tratamento da leishmaniose cutânea.

O balanço do meio ambiente envolvido na resposta imune durante uma infecção é necessário para levar a um perfil de cura na doença.

Células T CD4⁺CD8⁻ duplo negativas são uma pequena sub-população que podem expressar tanto o TCR $\alpha\beta$, quanto o TCR $\gamma\delta$ e sua identificação no sangue periférico do sistema imune de humanos e camundongos tem sido amplamente estudada (Porcelli, S., *et al.*, 1993). Outra pequena sub-população presente no sangue periférico, são as células NKT, que ultimamente têm sido muito exploradas na terapia contra o câncer (Crowe, N. Y., *et al.*, 2005). O reconhecimento e atividade efetora dessas sub-populações linfocitárias ocorre principalmente via CD1 e esse tipo de resposta tem sido identificado na tuberculose, lepra e doenças auto-imune (Dutronic, Y. & Porcelli, S. A., 2002, Sieling, *et al.*, 2005).

Alguns estudos mostraram que a perda de co-receptores CD4 e CD8 permite que sub-população de células T DN tolerem estimulação crônica, ao contrário das células T convencionais CD4 e CD8 (Hamad, *et al.*, 2001). Groh e colaboradores demonstraram que células T DN são experientes e podem ser ativadas para produzirem citocinas e proliferarem. Já as células NKT, são rápidas produtoras de citocinas e ativadas via CD1d (Parekh, V. *et al.*, 2005). Pesquisadores demonstraram que além das células NKT produzirem citocinas com o perfil Th1 e Th2, elas também são capazes de produzirem IL-17 (Yu, J. J., *et al.*, 2007; Coquet, J. M., *et al.*, 2008; Niemeyer, M. *et al.*, 2008).

Estudos em indivíduos saudáveis mostraram que a frequência de células T DN representa menos de 1% dos linfócitos no sangue periférico (Porcelli, S., 1993). Nosso grupo comparou a frequência de células T DN $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$, entre pacientes com leishmaniose cutânea e indivíduos não infectados. Foi demonstrado que ocorre uma inversão na frequência de células T DN $\alpha\beta$ e $\gamma\delta$ nesses grupos de indivíduos. Sub-populações de células T DN de pacientes com LC expressam uma frequência maior do TCR $\alpha\beta$ do que do TCR $\gamma\delta$. Perfil inverso é visto nos indivíduos não infectados (Antonelli, L. R., *et al.*, 2006). Além disso, esses estudos demonstraram que as células DN de pacientes com LC são mais ativadas que as células T DN de indivíduos saudáveis; e que as células T DN $\alpha\beta$ possuem perfil mais inflamatório nos pacientes com LC, do que as células T DN $\gamma\delta$, com produção aumentada de IFN- γ e TNF- α . Já as células T DN $\gamma\delta$ produzem maiores quantidades de IL-10 do que as DN $\alpha\beta$, nos pacientes com LC. Todos esses achados foram avaliados nos pacientes com doença ativa, ou seja, antes dos pacientes receberem qualquer tipo de tratamento (Antonelli, L. R., *et al.*, 2006; Gollob *et al.*, 2008).

Durante o desenvolvimento deste trabalho, nós caracterizamos distintas sub-populações de células T, que apesar de representar uma minoria, possuem potencial inflamatório nos pacientes com leishmaniose cutânea ativa. Em uma doença infecciosa, os mecanismos da resposta imune são essenciais para o controle da carga parasitária. No entanto, a resposta imune inicialmente benigna pode tornar-se patológica se não for subsequentemente controlada. Desta maneira, quais são os componentes da resposta imune envolvidos com a patologia, como esta pode ser prevenida, regulada, revertida após seu estabelecimento e como ocorre a manutenção da memória imunológica decorrente de uma infecção, são importantes questões que precisam ser melhor entendidas. Dessa forma, comparar essas diferentes sub-populações entre si antes e após o tratamento, como também avaliar individualmente cada

uma delas após o tratamento e subsequente cura, é de suma importância para melhor compreender o real papel de cada uma e até mesmo a sua importância durante o curso da infecção.

Primeiramente, nós analisamos *ex vivo* células T DN $\alpha\beta$ e NKT, comparando marcadores de ativação e memória. Essa análise foi seguida de comparação *in vitro* de marcadores de citotoxicidade e citocinas. Realizamos comparações entre essas sub-populações antes e após o tratamento, com o intuito de caracterizar diferenças funcionais entre elas. Outro tipo de análise realizada, foi a comparação individual dessas sub-populações pré e pós-tratamento da LC, objetivando avaliar diferenças entre as expressões de importantes marcadores imunológicos após a cura da doença, o que pode nos levar a caracterizar melhor a função de cada uma dessas células na doença cutânea. Nossos dados mostraram que antes do tratamento da LC, os subgrupos de células NKT (NKT DN e NKT CD4⁺), apresentaram-se mais ativadas do que as células T DN $\alpha\beta$. Interessante notar que esse perfil não foi alterado após o tratamento, comprovando que as células NKT realmente possuem um caráter mais ativado (Tabela 4 e figura 20 A).

Analisando a expressão da molécula de memória CD45RO nessas sub-populações, observamos que tanto as células NKT DN quanto as células T DN $\alpha\beta$, apresentaram maior expressão de CD45RO após o tratamento dos pacientes com LC. Já, o subgrupo de células NKT CD4⁺, não apresentou diferença na expressão desse marcador, comparando entre a infecção ativa e após o tratamento da mesma (Figura 20 B). Apesar de um indivíduo conter um enorme número de células experientes específicas para diferentes antígenos, a expressão do marcador de memória, CD45RO, pode nos sugerir que a infecção com *Leishmania* desencadeia perfil de memória em algumas sub-populações celulares, como visto nesse caso.

Culturas espontâneas *in vitro* podem permitir melhor ativação e produção de citocinas em várias populações celulares, dessa forma, foram realizadas culturas na ausência de estímulo externo (Meio). Células T DN $\alpha\beta$ mostraram ser mais citotóxicas do que as células NKT CD4⁺, comparadas antes do tratamento. Esse perfil foi mantido após o tratamento da LC e, além disso, as células T DN $\alpha\beta$ também eram mais citotóxicas que as NKT DN (tabela5).

Curiosamente, análises individuais de cada sub-população celular, mostraram que pós tratamento as células T DN $\alpha\beta$ apresentam maior frequência de expressão de granzima A (Figura 22). Esse conjunto de resultados nos sugere que no nível de citotoxicidade, essas

células T DN $\alpha\beta$ podem juntamente com células T CD8⁺ convencionais agir eliminando células infectadas com *Leishmania*.

Durante a infecção por *L. braziliensis* sabe-se da importância de citocinas do tipo Th1. O IFN- γ é uma importante citocina ativadora de macrófagos, auxiliando na erradicação do patógeno. Nosso grupo demonstrou que células T CD4⁺ são a principal fonte produtora desta citocina no sangue periférico de pacientes com LC, e que células T CD4⁻CD8⁻ (DN) são a segunda fonte produtora dessa importante citocina (Bottrel, R. L., *et al.*, 2001). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória capaz de modular resposta imune desencadeada por citocinas inflamatórias, e também muito importante na leishmaniose (Antonelli, *et al.*, 2004; Faria, D. R., *et al.*, 2005). Nós observamos que as células NKT CD4⁺ são maiores produtoras de IFN- γ e IL-10 do que as células T DN $\alpha\beta$ antes do tratamento. Além disso, são também maiores produtoras de IFN- γ do que as células NKT DN (Tabela 5). Comparações pós-tratamento mostraram que esse perfil não muda em relação ao IFN- γ , mas que as células T DN $\alpha\beta$ e NKT DN expressam maior frequência de IL-10 do que as células NKT CD4⁺.

Esse grupo de resultados sugere que durante a infecção ativa, as células NKT CD4⁺ são muito importantes devido à maior produção de IFN- γ , e que a concomitante produção de IL-10 pode auxiliar no controle da produção dessa citocina inflamatória, mas que após o tratamento e a cura da doença, as sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKTDN aumentam a produção de IL-10, comparadas as células NKT CD4⁺. Isso é muito intrigante, pois sugere que durante a infecção ativa esse balanço entre a produção de IFN- γ e de IL-10 pode ser importante na resposta imune contra a *Leishmania*, ajudando a desenvolver um perfil de proteção.

Recentemente, foi sugerido que uma taxa menor de IFN- γ /IL-10, pode estar associada com um prognóstico mais favorável na infecção por *L. braziliensis* (Gomes-Silva, A., *et al.*, 2007). Isso é muito importante, pois observamos que pós-tratamento ocorre um aumento de expressão das citocinas pró-inflamatórias IFN- γ e TNF- α , tanto nas sub-populações NKT para o IFN- γ , quanto nas três sub-populações avaliadas aqui (DN $\alpha\beta$, NKT DN e NKT CD4⁺), para o TNF- α (Figura 23). Outro dado interessante foi o aumento de expressão de IL-10 nas sub-populações de células T DN $\alpha\beta$ e NKT DN após o tratamento da LC (Figura 25).

Esses dados são bastante intrigantes e sugerem um controle fino da produção dessas citocinas durante a infecção ativa, para que ocorra o controle da doença. Outro trabalho

demonstrou que indivíduos assintomáticos apresentam menor produção de IFN- γ do que pacientes curados para leishmaniose cutânea. Esse grupo também demonstrou que os indivíduos assintomáticos possuem maior produção de IL-10 do que os curados cutâneos, sugerindo que a ausência da doença pode ser devido a um balanço entre as citocinas imunoreguladora IL-10 e efetora IFN- γ (Bittar, R. C., *et al.*, 2007).

Avaliamos também uma citocina ainda pouco conhecida na leishmaniose cutânea, a IL-17. Pesquisadores demonstraram que a IL-17 possui papéis distintos dependendo da doença e do sítio de produção (Weaver, C. T. & Murphy, K. M., 2007). Nosso grupo demonstrou que pacientes com a forma clínica mucosa da leishmaniose expressa maior frequência de IL-17 do que pacientes cutâneos, no sítio da lesão (Bacellar, O., *et al.*, 2009).

Os dados mais interessantes obtidos por nós no que diz respeito à expressão de IL-17 foi observar, que as células T DN $\alpha\beta$ após o tratamento da LC diminuem consideravelmente a produção desta citocina (figuras 21 e 24). Sabe-se que em algumas doenças auto-imunes, as células T DN são extremamente patogênicas (Hamad, A. R., *et al.*, 2001). Dessa forma, esses dados podem nos sugerir que essa sub-população pode estar envolvida com a exacerbação da LC, durante a doença ativa, o que pode estar relacionado com sua característica de maior citotoxicidade, maior produção de IL-17 e menor expressão de IL-10. Após a cura da doença somente a alta citotoxicidade é mantida em relação aos subgrupos de NKT, pois ocorre diminuição da expressão da IL-17 e aumento da IL10 (Figuras 24 e 25). Já as sub-populações NKT não modificam tanto o seu perfil inflamatório após a cura, o que pode sugerir um perfil mais balanceado destas populações e até mesmo importância para a cura da doença durante a infecção ativa.

Mais do que demonstrar a ativação celular e produção de citocinas por pequenas sub-populações de células T (DN $\alpha\beta$, NKT DN e NKT CD4⁺) envolvidas na resposta imune à *Leishmania*, este trabalho teve a finalidade de ampliar a nossa compreensão da imunorregulação da resposta imune, responsável tanto pela eliminação do parasita, quanto pelo seu próprio controle. Nossa contribuição abrange um detalhado estudo de marcadores fenotípicos, citocinas reguladoras e imunoreguladoras, além da caracterização de uma sub-população de células T potencialmente patogênicas durante a doença.

7 CONCLUSÕES FINAIS

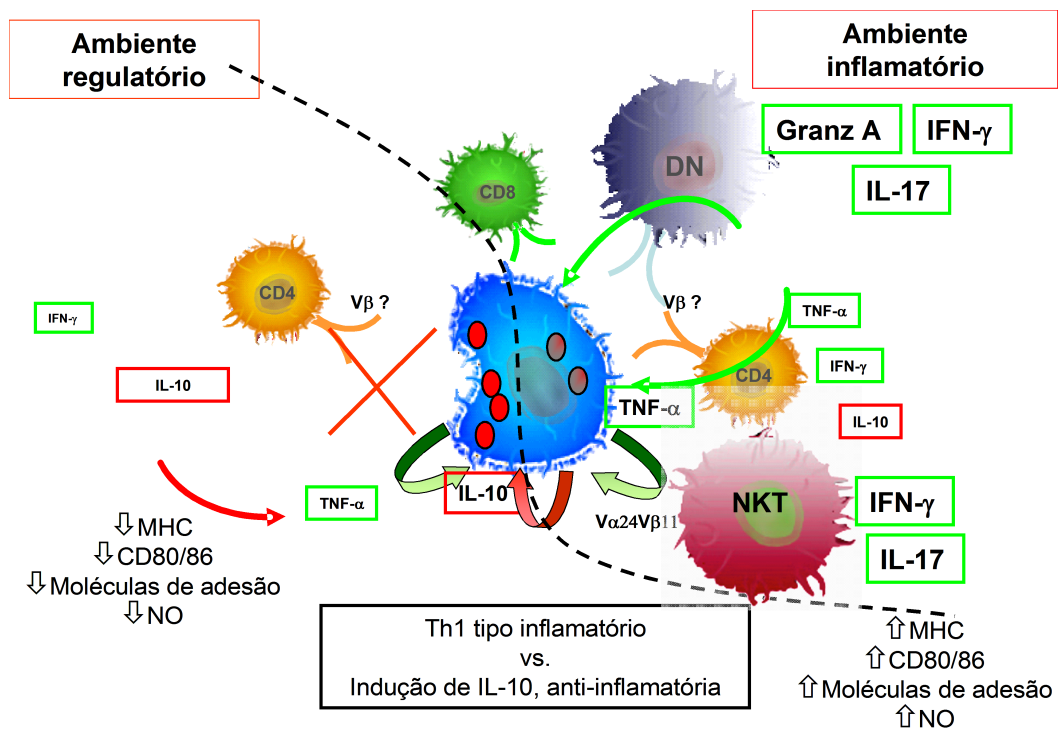
O prognóstico da leishmaniose humana envolve diferentes fatores e as várias formas clínicas observadas se relacionam com tipos distintos de resposta imune desencadeada contra a *Leishmania*. Dessa forma, a própria resposta do hospedeiro pode levar à resolução da infecção sem dano tecidual, como observado na leishmaniose cutânea, ou até mesmo causando um fraco controle do patógeno e/ou patologia, nas formas clínicas mais graves.

Dessa forma, este trabalho nos levou ao aprofundamento do estudo da imunorregulação da leishmaniose cutânea humana. A figura 26 mostra um modelo ilustrativo do resumo dos dados obtidos neste trabalho, sugerindo um modelo de interações na leishmaniose humana. A caracterização de diferentes sub-populações linfocitárias, analisadas aqui nos leva a concluir que existem mecanismos diversos de reconhecimento antigênico e funcionalidade distinta para cada uma delas. Células T CD4⁺ expressando Vβ5.2, 11 e 24 estão envolvidas com vários marcadores imunológicos importantes e podem desempenhar papéis cruciais na doença ativa, no que diz respeito ao desenvolvimento do perfil de cura ou até mesmo na patologia, como visto nas lesões de pacientes com LC relacionadas com maiores freqüências das células T CD4⁺ expressando o Vβ 5.2. Nós também sugerimos uma natureza inflamatória para ambas sub-populações de células NKT avaliadas neste estudo e talvez um papel patogênico para as células T αβ DN na infecção ativa causada por *L. braziliensis*. Assim, podemos observar por este estudo, a existência de uma intrínseca rede celular envolvida na imunorregulação da leishmaniose cutânea e muito há ainda que se percorrer, para conseguirmos atingir o objetivo geral da pesquisa, que é desenvolver melhores tratamentos e quem sabe a cura da doença com vacinas efetivas, melhorando a qualidade de vida dos pacientes.

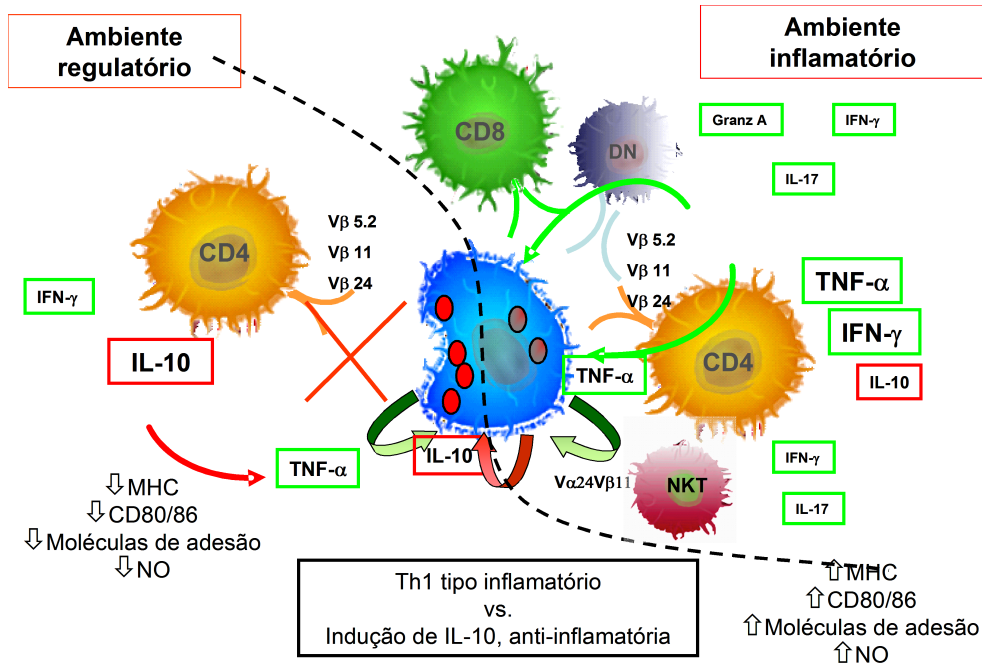
Embora tenhamos contribuído para o conhecimento da imunoregulação na leishmaniose humana, estudando o papel de sub-populações celulares novas no contexto da doença, este trabalho trouxe consigo novos questionamentos. Perguntas importantes ainda precisam ser respondidas como, por exemplo, (1) quais são os antígenos responsáveis pela ativação das células T Vβ5⁺ e das demais populações estudadas neste trabalho? (2) as células T αβ DN desempenham de fato um papel citotóxico na doença? (3) se sim, essa citotoxicidade tem importância na geração de resposta patogênica? (4) a IL-17 participa como uma citocina patogênica na leishmaniose humana? (5) essas populações celulares estão

também associadas a outras formas da leishmaniose? Assim, além da contribuição inerente aos dados gerados neste trabalho, deixamos nossa visão das perspectivas futuras de estudo que visam compreender os mecanismos celulares e moleculares de proteção e patogênia na leishmaniose, esperando, futuramente, beneficiar a população infectada ou em risco de infecção.

A



B



C

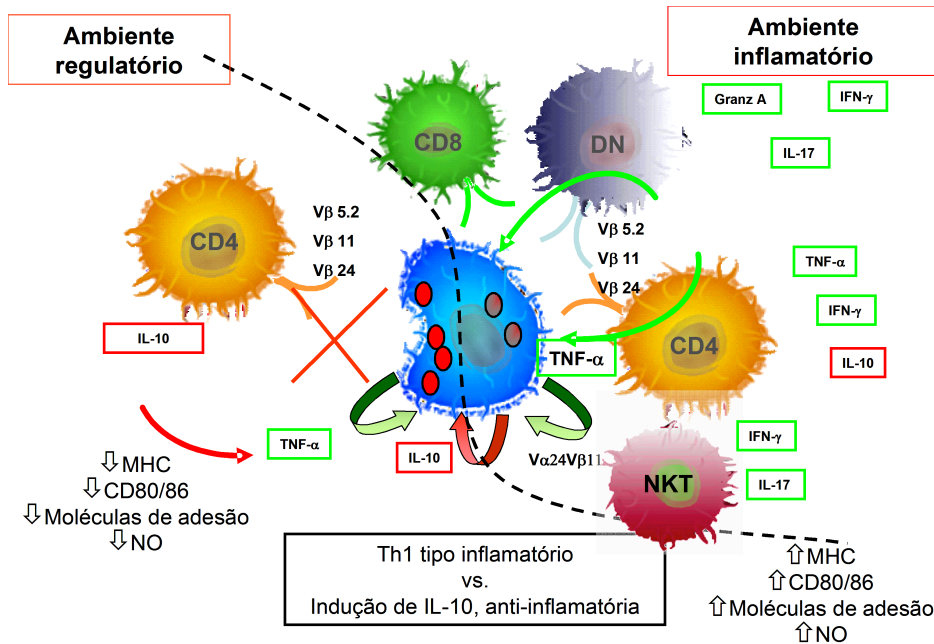


Figura 26: Desenho esquemático sobre o modelo estudado. Células do sistema imune desempenhando distintos papéis na leishmaniose cutânea (LC). Células T $\alpha\beta$ duplo negativas podem contribuir com maior produção de IL-17, podendo gerar um perfil patológico da doença. Sub-populações de células NKT diminuem a frequência na LC e possuem perfil inflamatório devido a maior produção de IFN- γ , o que pode contribuir para o perfil de cura (A). Células T CD4⁺ expressando distintos V β , estão envolvidas com o controle desse ambiente inflamatório X patogênico devido a co-regulação de citocinas inflamatórias (IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatória (IL-10) (B). Após o tratamento, células do sistema imune se encontram em homeostase, desempenhando papéis fisiológicos importantes (C). Essas diferentes sub-populações linfocitárias podem se auto-regular e, no caso da LC, orquestrarem o controle da doença.

REFERÊNCIAS

1. Abbas, A. K., and C. A. Janeway, Jr. 2000. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. *Cell* 100:129.
2. Afonso, L. C., and P. Scott. 1993. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 61:2952.
3. Aggarwal, B. B., and T. E. Eessalu. 1987. Induction of receptors for tumor necrosis factor- α by interferons is not a major mechanism for their synergistic cytotoxic response. *J. Biol. Chem.* 262:10000.
4. Ali, M., M. Weinreich, S. Balcaitis, C. J. Cooper, and P. J. Fink. 2003. Differential regulation of peripheral CD4+ T cell tolerance induced by deletion and TCR revision. *J. Immunol.* 171:6290.
5. Amprey, J. L., J. S. Im, S. J. Turco, H. W. Murray, P. A. Illarionov, G. S. Besra, S. A. Porcelli, and G. F. Spath. 2004. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. *J. Exp. Med.* 200:895.
6. Anderson CL, Shen L, Eicher DM, Wewers MD, Gill JK: Phagocytosis mediated by three distinct Fc gamma receptor classes on human leukocytes. *J Exp Med* 1990, 171(4):1333-1345.
7. Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. P. Almeida, O. Bacellar, and K. J. Gollob. 2004. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. *Clin. Exp. Immunol.* 136:341.
8. Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. R. Oliveira, K. C. Torres, L. H. Guimaraes, O. Bacellar, and K. J. Gollob. 2006. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 74:6317.
9. Antonelli, L. R., W. O. Dutra, R. P. Almeida, O. Bacellar, E. M. Carvalho, and K. J. Gollob. 2005. Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. *Immunol. Lett.* 101:226.
10. Arden, B. 1998. Conserved motifs in T-cell receptor CDR1 and CDR2: implications for ligand and CD8 co-receptor binding. *Curr. Opin. Immunol.* 10:74.
11. Assenmacher, M., J. Schmitz, and A. Radbruch. 1994. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur. J. Immunol.* 24:1097.
12. Bacellar, O., H. Lessa, A. Schriefer, P. Machado, J. A. Ribeiro de, W. O. Dutra, K. J. Gollob, and E. M. Carvalho. 2002. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. *Infect. Immun.* 70:6734.
13. Bacellar, O., D. Faria, M. Nascimento, T. M. Cardoso, K. J. Gollob, W. O. Dutra, P. Scott, and E. M. Carvalho. 2009. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. *J. Infect. Dis.* 200:75.

14. Barbosa J Jr, Massensini AR, Santos MS, Meireles SI, Gomez RS, Gomez MV, Romano-Silva MA, Prado VF, Prado MA: Expression of the vesicular acetylcholine transporter, proteins involved in exocytosis, and functional calcium signaling in varicosities and soma of a murine septal cell line. *J Neurochem* 1999, 73:1881-1893.
15. Barral, A., J. M. Costa, A. L. Bittencourt, M. Barral-Netto, and E. M. Carvalho. 1995. Polar and subpolar diffuse cutaneous leishmaniasis in Brazil: clinical and immunopathologic.
16. Beklen, A., M. Ainola, M. Hukkanen, C. Gurgan, T. Sorsa, and Y. T. Konttinen. 2007. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. *J. Dent. Res.* 86:347.
17. Belkaid, Y., C. A. Piccirillo, S. Mendez, E. M. Shevach, and D. L. Sacks. 2002. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature* 420:502.
18. Bendelac, A. 1995. Positive selection of mouse NK1+ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes. *J. Exp. Med.* 182:2091.
19. Bendelac, A., M. N. Rivera, S. H. Park, and J. H. Roark. 1997. Mouse CD1-specific NK1 T cells: development, specificity, and function. *Annu. Rev. Immunol.* 15:535.
20. Berzins, S. P., M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2005. Working with NKT cells--pitfalls and practicalities. *Curr. Opin. Immunol.* 17:448.
21. Berzins, S. P., A. P. Uldrich, D. G. Pellicci, F. McNab, Y. Hayakawa, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2004. Parallels and distinctions between T and NKT cell development in the thymus. *Immunol. Cell Biol.* 82:269.
22. Bettelli, E., T. Korn, M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2008. Induction and effector functions of T(H)17 cells. *Nature* 453:1051.
23. Bettelli, E., M. Oukka, and V. K. Kuchroo. 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat. Immunol.* 8:345.
24. Beutler, B. 1995. TNF, immunity and inflammatory disease: lessons of the past decade. *J. Investig. Med.* 43:227.
25. Bittar, R. C., R. S. Nogueira, R. Vieira-Goncalves, V. Pinho-Ribeiro, M. S. Mattos, M. P. Oliveira-Neto, S. G. Coutinho, and A. M. Da-Cruz. 2007. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:625.
26. Blank, C., I. Brown, R. Marks, H. Nishimura, T. Honjo, and T. F. Gajewski. 2003. Absence of programmed death receptor 1 alters thymic development and enhances generation of CD4/CD8 double-negative TCR-transgenic T cells. *J. Immunol.* 171:4574.
27. Bomfim, G., C. Nascimento, J. Costa, E. M. Carvalho, M. Barral-Netto, and A. Barral. 1996. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. *Exp. Parasitol.* 84:188.
28. Bottrel, R. L., W. O. Dutra, F. A. Martins, B. Gontijo, E. Carvalho, M. Barral-Netto, A. Barral, R. P. Almeida, W. Mayrink, R. Locksley, and K. J. Gollob. 2001. Flow cytometric determination of cellular sources and frequencies of key cytokine-producing lymphocytes directed against recombinant LACK and soluble *Leishmania* antigen in human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 69:3232.

29. Brenner, M. B., I. S. Trowbridge, and J. L. Strominger. 1985. Cross-linking of human T cell receptor proteins: association between the T cell idiotype beta subunit and the T3 glycoprotein heavy subunit. *Cell* 40:183.
30. Brigl, M., L. Bry, S. C. Kent, J. E. Gumperz, and M. B. Brenner. 2003. Mechanism of CD1d-restricted natural killer T cell activation during microbial infection. *Nat. Immunol.* 4:1230.
31. Cabello, P. H., A. M. Lima, E. S. Azevedo, and H. Krieger. 1995. Familial aggregation of *Leishmania chagasi* infection in northeastern Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 52:364.
32. Call, M. E., and K. W. Wucherpfennig. 2005. The T cell receptor: critical role of the membrane environment in receptor assembly and function. *Annu. Rev. Immunol.* 23:101.
33. Campos, R. A., M. Szczepanik, M. Lisbonne, A. Itakura, M. Leite-de-Moraes, and P. W. Askenase. 2006. Invariant NKT cells rapidly activated via immunization with diverse contact antigens collaborate in vitro with B-1 cells to initiate contact sensitivity. *J. Immunol.* 177:3686.
34. Carvalho, E. M., W. D. Johnson, E. Barreto, P. D. Marsden, J. L. Costa, S. Reed, and H. Rocha. 1985. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. *J. Immunol.* 135:4144.
35. Carvalho, E. M., A. Barral, J. M. Costa, A. Bittencourt, and P. Marsden. 1994. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop.* 56:315.
36. Castes, M., A. Agnelli, and A. J. Rondon. 1984. Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. *Clin. Exp. Immunol.* 57:279.
37. Castes, M., D. Trujillo, M. E. Rojas, C. T. Fernandez, L. Araya, M. Cabrera, J. Blackwell, and J. Convit. 1993. Serum levels of tumor necrosis factor in patients with American cutaneous leishmaniasis. *Biol. Res.* 26:233.
38. Clarencio, J., C. I. de Oliveira, G. Bomfim, M. M. Pompeu, M. J. Teixeira, T. C. Barbosa, S. Souza-Neto, E. M. Carvalho, C. Brodskyn, A. Barral, and M. Barral-Netto. 2006. Characterization of the T-cell receptor Vbeta repertoire in the human immune response against *Leishmania* parasites. *Infect. Immun.* 74:4757.
39. Coquet, J. M., S. Chakravarti, K. Kyparissoudis, F. W. McNab, L. A. Pitt, B. S. McKenzie, S. P. Berzins, M. J. Smyth, and D. I. Godfrey. 2008. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:11287.
40. Costa, R. P., K. J. Gollob, L. L. Fonseca, M. O. Rocha, A. C. Chaves, N. Medrano-Mercado, T. C. raujo-Jorge, P. R. Antas, D. G. Colley, R. Correa-Oliveira, G. Gazzinelli, J. Carvalho-Parra, and W. O. Dutra. 2000. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. *Scand. J. Immunol.* 51:511.
41. Coutinho, S. G., M. P. Oliveira, A. M. Da-Cruz, P. M. De Luca, S. C. Mendonca, A. L. Bertho, L. Soong, and D. Mahon-Pratt. 1996. T-cell responsiveness of American cutaneous leishmaniasis patients to purified *Leishmania pifanoi* amastigote antigens and *Leishmania braziliensis* promastigote antigens: immunologic patterns associated with cure. *Exp. Parasitol.* 84:144.

42. Coyle, A. J., F. Erard, C. Bertrand, S. Walti, H. Pircher, and G. G. Le. 1995. Virus-specific CD8⁺ cells can switch to interleukin 5 production and induce airway eosinophilia. *J. Exp. Med.* 181:1229.
43. Crowe, N. Y., J. M. Coquet, S. P. Berzins, K. Kyparissoudis, R. Keating, D. G. Pellicci, Y. Hayakawa, D. I. Godfrey, and M. J. Smyth. 2005. Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo. *J. Exp. Med.* 202:1279.
44. Cunningham, A. C. 2002. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. *Exp. Mol. Pathol.* 72:132.
45. Da-Cruz, A. M., F. Conceicao-Silva, A. L. Bertho, and S. G. Coutinho. 1994. Leishmania-reactive CD4⁺ and CD8⁺ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. *Infect. Immun.* 62:2614.
46. Da-Cruz, A. M., A. L. Bertho, M. P. Oliveira-Neto, and S. G. Coutinho. 2005. Flow cytometric analysis of cellular infiltrate from American tegumentary leishmaniasis lesions. *Br. J. Dermatol.* 153:537.
47. Danska, J. S. 1989. The T cell receptor: structure, molecular diversity and somatic localization. *Curr. Opin. Immunol.* 2:81.
48. Davis, M. M., and P. J. Bjorkman. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature* 334:395.
49. de Almeida, M. C., V. Vilhena, A. Barral, and M. Barral-Netto. 2003. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98:861.
50. Desjeux, P. 1996. Leishmaniasis. Public health aspects and control. *Clin. Dermatol.* 14:417.
51. Desjeux, P. 2004. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol. Microbiol. Inect. Dis.* 27:305.
52. Dowlati, Y. 1996. Cutaneous leishmaniasis: clinical aspect. *Clin. Dermatol.* 14:425.
53. Duthie, M. S., and S. J. Kahn. 2002. Treatment with alpha-galactosylceramide before *Trypanosoma cruzi* infection provides protection or induces failure to thrive. *J. Immunol.* 168:5778.
54. Dutra, W. O., C. A. Menezes, F. N. Villani, G. C. da Costa, A. B. da Silveira, D. Reis, and K. J. Gollob. 2009. Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1:208.
55. Esterre P, Guerret S, Ravisse P, Dimier-David L, Dedet JP, Grimaud JA: Immunohistochemical analysis of the mucosal lesion in mucocutaneous leishmaniasis. *Parasite.* 1994, 1(4): 305-309.
56. Dutronc, Y., and S. A. Porcelli. 2002. The CD1 family and T cell recognition of lipid antigens. *Tissue Antigens* 60:337.

57. Faria, D. R., K. J. Gollob, J. Barbosa, Jr., A. Schriefer, P. R. Machado, H. Lessa, L. P. Carvalho, M. A. Romano-Silva, A. R. de Jesus, E. M. Carvalho, and W. O. Dutra. 2005. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. *Infect. Immun.* 73:7853.
58. Fitch, F. W., M. D. McKisic, D. W. Lancki, and T. F. Gajewski. 1993. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol.* 11:29.
59. Follador, I., C. Araujo, O. Bacellar, C. B. Araujo, L. P. Carvalho, R. P. Almeida, and E. M. Carvalho. 2002. Epidemiologic and immunologic findings for the subclinical form of *Leishmania braziliensis* infection. *Clin. Infect. Dis.* 34:E54-E58.
60. Fontenot, A. P., B. L. Kotzin, C. E. Comment, and L. S. Newman. 1998. Expansions of T-cell subsets expressing particular T-cell receptor variable regions in chronic beryllium disease. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 18:581.
61. Fowler, D. H., and R. E. Gress. 2000. Th2 and Tc2 cells in the regulation of GVHD, GVL, and graft rejection: considerations for the allogeneic transplantation therapy of leukemia and lymphoma. *Leuk. Lymphoma* 38:221.
62. Fraser, J., V. Arcus, P. Kong, E. Baker, and T. Proft. 2000. Superantigens - powerful modifiers of the immune system. *Mol. Med. Today* 6:125.
63. Frischholz, S., M. Rollinghoff, and H. Moll. 1994. Cutaneous leishmaniasis: co-ordinate expression of granzyme A and lymphokines by CD4+ T cells from susceptible mice. *Immunology* 82:255.
64. Fukaura, H., S. C. Kent, M. J. Pietruszewicz, S. J. Khoury, H. L. Weiner, and D. A. Hafler. 1996. Antigen-specific TGF-beta1 secretion with bovine myelin oral tolerization in multiple sclerosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 778:251.
65. Gaze, S. T., W. O. Dutra, M. Lessa, H. Lessa, L. H. Guimaraes, A. R. Jesus, L. P. Carvalho, P. Machado, E. M. Carvalho, and K. J. Gollob. 2006. Mucosal leishmaniasis patients display an activated inflammatory T-cell phenotype associated with a nonbalanced monocyte population. *Scand. J. Immunol.* 63:70.
66. Godfrey, D. I., K. J. Hammond, L. D. Poulton, M. J. Smyth, and A. G. Baxter. 2000. NKT cells: facts, functions and fallacies. *Immunol. Today* 21:573.
67. Godfrey, D. I., and S. P. Berzins. 2007. Control points in NKT-cell development. *Nat. Rev. Immunol.* 7:505.
68. Goldrath, A. W., and M. J. Bevan. 1999. Selecting and maintaining a diverse T-cell repertoire. *Nature* 402:255.
69. Gollob, K. J., and E. Palmer. 1992. Divergent viral superantigens delete V beta 5+ T lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 89:5138.

70. Gollob, K. J., W. O. Dutra, and R. L. Coffman. 1996. Early message expression of interleukin-4 and interferon-gamma, but not of interleukin-2 and interleukin-10, reflects later polarization of primary CD4⁺ T cell cultures. *Eur. J. Immunol.* 26:1565.
71. Gollob, K. J., L. R. Antonelli, D. R. Faria, T. S. Keesen, and W. O. Dutra. 2008. Immunoregulatory mechanisms and CD4-CD8⁻ (double negative) T cell subpopulations in human cutaneous leishmaniasis: a balancing act between protection and pathology. *Int. Immunopharmacol.* 8:1338.
72. Gomes-Silva, A., B. R. de Cassia, N. R. Dos Santos, V. S. Amato, M. M. da Silva, M. P. Oliveira-Neto, S. G. Coutinho, and A. M. Da-Cruz. 2007. Can interferon-gamma and interleukin-10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection? *Clin. Exp. Immunol.* 149:440.
73. Goto, H., and J. A. Lindoso. 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.* 8:419.
74. Groh, V., M. Fabbi, F. Hochstenbach, R. T. Maziarz, and J. L. Strominger. 1989. Double-negative (CD4-CD8⁻) lymphocytes bearing T-cell receptor alpha and beta chains in normal human skin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 86:5059.
75. Hamad, A. R., A. Srikrishnan, P. Mirmonsef, C. P. Broeren, C. H. June, D. Pardoll, and J. P. Schneck. 2001. Lack of coreceptor allows survival of chronically stimulated double-negative alpha/beta T cells: implications for autoimmunity. *J. Exp. Med.* 193:1113.
76. Hayakawa, Y., K. Takeda, H. Yagita, S. Kakuta, Y. Iwakura, K. L. Van, I. Saiki, and K. Okumura. 2001. Critical contribution of IFN-gamma and NK cells, but not perforin-mediated cytotoxicity, to anti-metastatic effect of alpha-galactosylceramide. *Eur. J. Immunol.* 31:1720.
77. Herman, A., J. W. Kappler, P. Marrack, and A. M. Pullen. 1991. Superantigens: mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. *Annu. Rev. Immunol.* 9:745.
78. Hong-Geller, E., and G. Gupta. 2003. Therapeutic approaches to superantigen-based diseases: a review. *J. Mol. Recognit.* 16:91.
79. Huang, L., and I. N. Crispe. 1992. Distinctive selection mechanisms govern the T cell receptor repertoire of peripheral CD4-CD8⁻ alpha/beta T cells. *J. Exp. Med.* 176:699.
80. Ishihara, S., M. Nieda, J. Kitayama, T. Osada, T. Yabe, Y. Ishikawa, H. Nagawa, T. Muto, and T. Juji. 1999. CD8(+)NKR-P1A (+)T cells preferentially accumulate in human liver. *Eur. J. Immunol.* 29:2406.
81. Ishikawa,H.; Hisaeda,H.; Taniguchi,M.; Nakayama,T.; Sakai,T.; Maekawa,Y.; Nakano,Y.; Zhang,M.; Zhang,T.; Nishitani,M.; Takashima,M.; Himeno,K. 2000 CD4(+) v(alpha)14 NKT cells play a crucial role in an early stage of protective immunity against infection with *Leishmania major*. *Int.Immunol.*12:1267.
82. Jones, T. C., W. D. Johnson, Jr., A. C. Barretto, E. Lago, R. Badaro, B. Cerf, S. G. Reed, E. M. Netto, M. S. Tada, T. F. Franca, and . 1987. Epidemiology of American cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania braziliensis braziliensis*. *J. Infect. Dis.* 156:73.

83. Jose, F. F., S. da, I. M. I. Araujo, R. P. Almeida, O. Bacellar, and E. M. Carvalho. 2001. [Evaluation of the sensitization power of Montenegro skin test]. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 34:537.
84. Kadena, T.; Matsuzaki, G.; Fujise, S.; Kishihara, K.; Takimoto, H.; Sasaki, M.; Beppu, M.; Nakamura, S.; Nomoto, K. 1997. TCR alpha beta+ CD4- CD8- T cells differentiate extrathymically in an Ick-independent manner and participate in early response against *Listeria monocytogenes* infection through interferon-gamma production. *Immunology*, 91:2805.
85. Karulin, A. Y., M. D. Hesse, M. Tary-Lehmann, and P. V. Lehmann. 2000. Single-cytokine-producing CD4 memory cells predominate in type 1 and type 2 immunity. *J. Immunol.* 164:1862.
86. Krangel, M. S. 2003. Gene segment selection in V(D)J recombination: accessibility and beyond. *Nat. Immunol.* 4:624.
87. Kronenberg, M. 2005. Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes. *Annu. Rev. Immunol.* 23:877.
88. Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, and D. J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J. Exp. Med.* 201:233.
89. Lennon, G. P., J. E. Sillibourne, E. Furrie, M. J. Doherty, and R. A. Kay. 2000. Antigen triggering selectively increases TCRBV gene transcription. *J. Immunol.* 165:2020.
90. Liew, F. Y., D. Xu, and W. L. Chan. 1999. Immune effector mechanism in parasitic infections. *Immunol. Lett.* 65:101.
91. Lohoff, M., M. Steinert, A. Weiss, M. Rollinghoff, R. S. Balderas, and A. N. Theofilopoulos. 1994. V beta gene repertoires in T cells expanded in local self-healing and lethal systemic murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 24:492.
92. Machado P, Kanitakis J, Almeida R, Chalon A, Araujo C, Carvalho EM: Evidence of in situ cytotoxicity in American cutaneous leishmaniasis. *Eur J Dermatol* 2002, 12(5):449-451.
93. Magalhaes AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD: Histopathology of tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 3. Cellular reactions in tissues. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986, 28(5): 300-311.
94. Magalhaes AV, Moraes MA, Raick AN, Llanos-Cuentas A, Costa JM, Cuba CC, Marsden PD: Histopathology of cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis braziliensis*. 1. Histopathological patterns and study of the course of the lesions. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1986, 28(4): 253-262.
95. Mallewaey, T., J. P. Scott-Browne, J. L. Matsuda, M. H. Young, D. G. Pellicci, O. Patel, M. Thakur, L. Kjer-Nielsen, S. K. Richardson, V. Cerundolo, A. R. Howell, J. McCluskey, D. I. Godfrey, J. Rossjohn, P. Marrack, and L. Gapin. 2009. T cell receptor CDR2 beta and CDR3 beta loops collaborate functionally to shape the iNKT cell repertoire. *Immunity.* 31:60.

96. Mangan, P. R., L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, and C. T. Weaver. 2006. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 441:231.
97. Mayrink, W., A. P. Schettini, P. Williams, P. Raso, P. A. Magalhaes, A. O. Lima, M. N. Melo, C. A. da Costa, O. Genaro, M. Dias, and . 1989. Histological observations on Montenegro's reaction in man. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 31:256.
98. McKenzie, A. N., J. A. Culpepper, M. R. de Waal, F. Briere, J. Punnonen, G. Aversa, A. Sato, W. Dang, B. G. Cocks, S. Menon, and . 1993. Interleukin 13, a T-cell-derived cytokine that regulates human monocyte and B-cell function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 90:3735.
99. Menezes, C. A., M. O. Rocha, P. E. Souza, A. C. Chaves, K. J. Gollob, and W. O. Dutra. 2004. Phenotypic and functional characteristics of CD28+ and. *Clin. Exp. Immunol.* 137:129.
100. Meuer, S. C., D. A. Cooper, J. C. Hodgdon, R. E. Hussey, K. A. Fitzgerald, S. F. Schlossman, and E. L. Reinherz. 1983. Identification of the receptor for antigen and major histocompatibility complex on human inducer T lymphocytes. *Science* 222:1239.
101. Michel, M. L., D. Mendes-da-Cruz, A. C. Keller, M. Lochner, E. Schneider, M. Dy, G. Eberl, and M. C. Leite-de-Moraes. 2008. Critical role of ROR-gammat in a new thymic pathway leading to IL-17-producing invariant NKT cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105:19845.
102. Millon G, Titus RG, Cerrotini JG, *et al*: Higher frequency of *Leishmania major*-specific L3T4⁺ cells in susceptible BALB/c mice than in resistant CBA mice. *J Immunol* 1986, 136:1467-1471.
103. Mocchi, S., and R. L. Coffman. 1995. Induction of a Th2 population from a polarized *Leishmania*-specific Th1 population by in vitro culture with IL-4. *J. Immunol.* 154:3779.
104. Mosmann, T. R., and R. L. Coffman. 1989. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* 7:145.
105. Mosmann, T. R., and S. Sad. 1996. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* 17:138.
106. Muller, I., P. Kropf, R. J. Etges, and J. A. Louis. 1993. Gamma interferon response in secondary *Leishmania major* infection: role of CD8+ T cells. *Infect. Immun.* 61:3730.
107. Muraille, E., and O. Leo. 1998. Revisiting the Th1/Th2 paradigm. *Scand. J. Immunol.* 47:1.
108. Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies, and N. G. Saravia. 2005. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366:1561.
109. Niemeyer, M., A. Darmoise, H. J. Mollenkopf, K. Hahnke, R. Hurwitz, G. S. Besra, U. E. Schaible, and S. H. Kaufmann. 2008. Natural killer T-cell characterization through gene expression profiling: an account of versatility bridging T helper type 1 (Th1), Th2 and Th17 immune responses. *Immunology* 123:45.

110. Organização Mundial de Saúde (OMS). Disponível em: <http://www.who.int/tdr/disease/leish/diseaseinfo.html>. Acesso em 31/05/2009.
111. Openshaw, P., E. E. Murphy, N. A. Hosken, V. Maino, K. Davis, K. Murphy, and A. O'Garra. 1995. Heterogeneity of intracellular cytokine synthesis at the single-cell level in polarized T helper 1 and T helper 2 populations. *J. Exp. Med.* 182:1357.
112. Padovan, E., G. Casorati, P. Dellabona, C. Giachino, and A. Lanzavecchia. 1995. Dual receptor T-cells. Implications for alloreactivity and autoimmunity. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 756:66.
113. Parekh, V. V., M. T. Wilson, and K. L. Van. 2005. iNKT-cell responses to glycolipids. *Crit Rev. Immunol.* 25:183.
114. Porcelli, S., C. T. Morita, and M. B. Brenner. 1992. CD1b restricts the response of human CD4-8- T lymphocytes to a microbial antigen. *Nature* 360:593.
115. Porcelli, S., C. E. Yockey, M. B. Brenner, and S. P. Balk. 1993. Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4-8- alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain. *J. Exp. Med.* 178:1.
116. Poszepczynska, E., M. Bagot, H. Echchakir, D. Martinvalet, M. Ramez, D. Charue, L. Boumsell, and A. Bensussan. 2000. Functional characterization of an IL-7-dependent CD4(+)CD8alphaalpha(+) Th3-type malignant cell line derived from a patient with a cutaneous T-cell lymphoma. *Blood* 96:1056.
117. Priatel, J. J., O. Utting, and H. S. Teh. 2001. TCR/self-antigen interactions drive double-negative T cell peripheral expansion and differentiation into suppressor cells. *J. Immunol.* 167:6188.
118. Proft, T., S. Sriskandan, L. Yang, and J. D. Fraser. 2003. Superantigens and streptococcal toxic shock syndrome. *Emerg. Infect. Dis.* 9:1211.
119. Reiner, S. L., Z. E. Wang, F. Hatam, P. Scott, and R. M. Locksley. 1993. TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis. *Science* 259:1457.
120. Reiner, S. L., and R. M. Locksley. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu. Rev. Immunol.* 13:151.
121. Ribeiro-de-Jesus A, Almeida RP, Lessa H, Bacellar O, Carvalho EM: Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. *Braz J Med Biol Res* 1998, 31:143-148.
122. Rocha-Vieira, E., E. Ferreira, P. Vianna, D. R. De Faria, S. T. Gaze, W. O. Dutra, and K. J. Gollob. 2003. Histopathological outcome of *Leishmania major*-infected BALB/c mice is improved by oral treatment with N-acetyl-l-cysteine. *Immunology* 108:401.
123. Rogers, K. A., G. K. DeKrey, M. L. Mbow, R. D. Gillespie, C. I. Brodskyn, and R. G. Titus. 2002. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS Microbiol. Lett.* 209:1.

124. Ronet, C., S. Darche, M. M. Leite de, S. Miyake, T. Yamamura, J. A. Louis, L. H. Kasper, and D. Buzoni-Gatel. 2005. NKT cells are critical for the initiation of an inflammatory bowel response against *Toxoplasma gondii*. *J. Immunol.* 175:899.
125. Sacks, D., and N. Noben-Trauth. 2002. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat. Rev. Immunol.* 2:845.
126. Salgame, P., J. S. Abrams, C. Clayberger, H. Goldstein, J. Convit, R. L. Modlin, and B. R. Bloom. 1991. Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science* 254:279.
127. Sieling, P. A., J. B. Torrelles, S. Stenger, W. Chung, A. E. Burdick, T. H. Rea, P. J. Brennan, J. T. Belisle, S. A. Porcelli, and R. L. Modlin. 2005. The human CD1-restricted T cell repertoire is limited to cross-reactive antigens: implications for host responses against immunologically related pathogens. *J. Immunol.* 174:2637.
128. Snyder-Cappione, J. E., D. F. Nixon, C. P. Loo, J. M. Chapman, D. A. Meiklejohn, F. F. Melo, P. R. Costa, J. K. Sandberg, D. S. Rodrigues, and E. G. Kallas. 2007. Individuals with pulmonary tuberculosis have lower levels of circulating CD1d-restricted NKT cells. *J. Infect. Dis.* 195:1361.
129. Sornasse, T., P. V. Larenas, K. A. Davis, J. E. de Vries, and H. Yssel. 1996. Differentiation and stability of T helper 1 and 2 cells derived from naive human neonatal CD4+ T cells, analyzed at the single-cell level. *J. Exp. Med.* 184:473.
130. Sousa, A. Q., M. E. Parise, M. M. Pompeu, J. M. Coehlo Filho, I. A. Vasconcelos, J. W. Lima, E. G. Oliveira, A. W. Vasconcelos, J. R. David, and J. H. Maguire. 1995. Bubonic leishmaniasis: a common manifestation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection in Ceara, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53:380.
131. Starr, T. K., S. C. Jameson, and K. A. Hogquist. 2003. Positive and negative selection of T cells. *Annu. Rev. Immunol.* 21:139.
132. Taniguchi, M., K. Seino, and T. Nakayama. 2003. The NKT cell system: bridging innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* 4:1164.
133. Takahata, Y., A. Nomura, H. Takada, S. Ohga, K. Furuno, S. Hikino, H. Nakayama, S. Sakaguchi, and T. Hara. 2004. CD25+CD4+ T cells in human cord blood: an immunoregulatory subset with naive phenotype and specific expression of forkhead box p3 (Foxp3) gene. *Exp. Hematol.* 32:622.
134. Thompson, C. B. 1995. Distinct roles for the costimulatory ligands B7-1 and B7-2 in T helper cell differentiation? *Cell* 81:979.
135. Titus, R. G., G. Milon, G. Marchal, P. Vassalli, J. C. Cerottini, and J. A. Louis. 1987. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur. J. Immunol.* 17:1429.
136. Uyemura, K., C. Pirmez, P. A. Sieling, K. Kiene, M. Paes-Oliveira, and R. L. Modlin. 1993. CD4+ type 1 and CD8+ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor

137. van der Merwe, P. A., and S. J. Davis. 2003. Molecular interactions mediating T cell antigen recognition. *Annu. Rev. Immunol.* 21:659.
138. Viola, A., and A. Lanzavecchia. 1996. T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds. *Science* 273:104.
139. Von, S. E., and C. Sunderkotter. 2007. [Cutaneous leishmaniasis]. *Hautarzt* 58:445.
140. Weaver, C. T., and K. M. Murphy. 2007. The central role of the Th17 lineage in regulating the inflammatory/autoimmune axis. *Semin. Immunol.* 19:351.
141. Weigle, K., and N. G. Saravia. 1996. Natural history, clinical evolution, and the host-parasite interaction in New World cutaneous Leishmaniasis. *Clin. Dermatol.* 14:433.
142. Williams, O., L. S. Aroeira, and J. Mengel. 1995. T cell-dependent antibody response to staphylococcal enterotoxin B. *Scand. J. Immunol.* 42:305.
143. Yu, J. J., M. J. Ruddy, G. C. Wong, C. Sfintescu, P. J. Baker, J. B. Smith, R. T. Evans, and S. L. Gaffen. 2007. An essential role for IL-17 in preventing pathogen-initiated bone destruction: recruitment of neutrophils to inflamed bone requires IL-17 receptor-dependent signals. *Blood* 109:3794.
144. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity.* 2007; 27:647-59.

ANEXO I

ANEXO II

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS EM CONGRESSOS:

ASTMH Meeting 2009. 58th American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Realizado em Washington D.C. em novembro de 2009.

Apresentação Oral:

Autores: Keesen, T.S.L., Antonelli, L. R., Guimarães, L.H., Machado, P., Carvalho, E, Gollob, K. J. , Dutra, W. O.

Título: CD4⁺ T cells subsets in human cutaneous leishmaniasis have a distinct receptor repertoires and cytokine expression.

Immuno Chile 2009. IX Latin American Congress of Immunology.

Realizado em Vina del Mar no mês de novembro de 2009.

Autores: Vieira, E. L. M. , Keesen, T.S.L., Carvalho, E, Dutra, W. , O Gollob, K. J. .

Título: Toll like receptor 4 maybe down regulation in monocytes from cutaneous leishmaniasis patients.

XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia/X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009.

Realizado em Salvador no mês de setembro de 2009.

Autores: Keesen, T.S.L., Vieira, E. L. M., Guimarães, L.H., Machado, P., Carvalho, E, Dutra, W. O., Gollob, K. J.

Título: Double negative CD4⁻CD8⁻ and CD4⁺ NKT cells in human cutaneous leishmaniasis: Functional potential and their possible role in immune activation VS. pathology

XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia/X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009.

Realizado em Salvador no mês de setembro de 2009.

Autores: Faria, D. R. , Keesen, T.S.L., Guimarães, L.H., Carvalho, E, Gollob, K. J. , Dutra, W. O.

Título: Characterization and phenotyping of cells expressing IL-17 and IL-6 from cutaneous and mucosal humans leishmaniasis patients.

XXXIV Congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia/X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009.

Realizado em Salvador no mês de setembro de 2009.

Autores: Vieira, E. L. M. , Keesen, T.S.L., Guimarães, L.H., Bacellar, O., Carvalho, E, Dutra, W. O., Gollob, K. J.

Título: Differential expression of Toll Like Receptors by monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and non-infected individuals.

Woods Hole Immuno Parasitology Meeting, 2009.

Realizado em Woods Hole no mês de abril de 2009.

Autores: AMORIM, I. F. G., MOURA, E. P., CASTRO, R. S., Keesen, Tatjana de Souza Lima, FIGUEIREDO, M. M., MICHALICK, M. S. M., Gollob, K.J., TAFURI, W. L.

Título: Toll Like Receptors (TLRs) in Canine Visceral Leishmaniasis :a preliminary study.

XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2008

Realizada em Águas de Lindóia no mês de novembro de 2008.

Autores: Keesen, T. S. L., Vieira, ELM, DUTRA, W. O., GOLLOB, K. J.

Título: Immunological function of alpha/beta CD4⁺CD8⁻, double negative (DN) T cells and semi-invariant NKT cells from cutaneous leishmaniasis patients.

XXIV Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia, 2008

Realizada em Águas de Lindóia no mês de novembro de 2008.

Autores: Vieira, E. L. M. , Keesen, T.S.L., Guimarães, L.H., Bacellar, O., Carvalho, E, Gollob, K. J. , Dutra, W. O.

Título: Phenotypic study of peripheral blood monocytes expressing toll like receptors and activation markers in cutaneous leishmaniasis patients.

IX Encontro de Pesquisa do ICB/IV Encontro anual de pesquisa em Bioquímica e Imunologia. , 2008.

Realizado em Belo Horizonte no mês de setembro de 2008.

Autores: : Keesen, T.S.L., Antonelli, L. R., Guimarães, L.H., Machado, P., Carvalho, E, Gollob, K. J. , Dutra, W. O.

Título: Phenotypic and functional study of T cells expressing distinct TCR V beta regions from human cutaneous leishmaniasis patients.

PARTICIPAÇÃO EM CURSOS:

XXXIV Congresso da Sociedade brasileira de Imunologia/X Simpósio Internacional de Alergia e Imunologia Clínica, 2009.

Realizado em Salvador no mês de setembro de 2009.

Título: Genetic control and clinical expression of disease

CURSOS MINISTRADOS:

Participação na disciplina Citometria de Fluxo, programa de Pós-graduação em Biologia Celular, Junho de 2009, ministrando aula de “Análise de dados”

Curso teórico de Citometria de fluxo.

Curso ministrado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte/Natal, Centro de Biociências/ Departamento de Bioquímica/Laboratório de Imunogenética, no mês de setembro de 2007.

Carga Horária: 8 horas.

Curso Prático de Citometria de fluxo e análise de dados.

Curso ministrado na Universidade Federal do Rio Grande do Norte/Natal, Centro de Biociências/ Departamento de Bioquímica/Laboratório de Imunogenética, no mês de setembro de 2007.

Carga Horária: 72 horas.

PRÊMIO:

ASTMH Meeting 2009. 58th American Society of Tropical Medicine and Hygiene.

Realizado em Washington D.C. em novembro de 2009. (Travel award)

Título: CD4⁺ T cells subsets in human cutaneous leishmaniasis have a distinct receptor repertoires and cytokine expression.