



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ



UFBA

Curso de Pós-Graduação em Patologia

FIOCRUZ

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

AVALIAÇÃO *EX VIVO* E *IN VITRO* DA DIVERSIDADE DO REPERTÓRIO $V\beta$ EM LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA

JORGE CLARÊNCIO SOUZA ANDRADE

Salvador - Bahia
2001

616.112



001704

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**AVALIAÇÃO *EX VIVO* E *IN VITRO* DA DIVERSIDADE DO
REPERTÓRIO $V\beta$ EM LINFÓCITOS T DE PACIENTES COM
LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA**

Jorge Clarêncio Souza Andrade

Orientador: Manoel Barral-Netto

Dissertação apresentada para
Obtenção do grau de Mestre
em Patologia Experimental

Salvador-Bahia
2001

Reg.

1348

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Salvador – BA

Clarêncio, J.

C591a - Avaliação *Ex vivo* e *In vitro* da diversidade do repertório $V\beta$ em linfócitos T de pacientes com Leishmaniose Cutânea Localizada / Jorge Clarêncio S. Andrade. - Salvador: Universidade Federal da Bahia / CPqGM / FIOCRUZ, 2001.

85p. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental)
Universidade Federal da Bahia, 1999.

1. Leishmaniose Cutânea. 2. Repertório. 3. Linfócitos T. I.
Título.

CDU 616.993:612.112

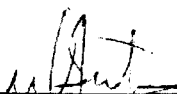
A5534

AVALIAÇÃO *EX VIVO* E *IN VITRO* DA DIVERSIDADE DO REPERTÓRIO V β EM LINFÓCITOS T
DE PACIENTES COM LEISHMANIOSE CUTÂNEA LOCALIZADA.


JORGE CLARÊNCIO SOUZA ANDRADE

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



Dra. Walderez Ornelas Dutra
Professora adjunta
ICB - UFMG



Dr. Lain Pontes de Carvalho
Pesquisador Adjunto
CPqGM - FIOCRUZ



Dr. Manoel Barral-Netto
Professor Titular
FAMED - UFBA

Aos meus irmãos Júlio César, José Carlos e João Cláudio, pelo apoio e admiração.

Agradecimentos

Manoel Barral-Netto

Pela sua orientação, dedicação, incentivo e apoio.

Aldina Barral e Dra. Glória Bonfim

Pela colaboração na seleção dos pacientes e coleta do material em Corte de Pedra.

Mitermayer Galvão Reis

Por acreditar e me incentivar sempre.

Theolis Costa Barbosa

Pela minha iniciação na Citometria de Fluxo, sugestões e apoio nos momentos difíceis.

Ana Lúcia Pires Cotias-de-Oliveira

Pela minha iniciação na pesquisa científica na UFBA

Rosália Meire Oliveira da Silva

Pela atenção, amizade, ajuda e carinho em todos os momentos do curso de Mestrado.

Aos amigos dos Laboratórios de Imuno-regulação e Microbiologia (LIMI) e Imunoparasitologia (LIP)

Pelo convívio leve, alegre e cooperativo.

As grandes amigas Lucyvera Imbroinise e Sílvia Cardoso.

Pelo carinho e companheirismo.

A todos dos setores de Comunicação Visual, Documentação Científica e Informática.

Pelo apoio na elaboração dos recursos visuais necessários em diversos momentos do desenvolvimento deste curso.

Ao centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da fundação Oswaldo Cruz pela disponibilidade de espaço físico, pessoal e recursos que possibilitaram a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	iv
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS	viii
INTRODUÇÃO	1
1. Considerações gerais sobre a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)	2
1.1. Resposta imune na LCL	3
1.1.1. No modelo experimental	3
1.1.2. Na doença humana	5
1.1.3. A resposta imune no linfonodo e a cinética da resposta imune na leishmaniose cutânea	6
1.1.4. A resposta imune na vacina	9
1.2. Estímulo e ativação das células T	11
1.2.1. Caracterização do receptor da célula T (TCR)	13
1.2.2. Superantígenos (SAGs)	15
1.3. Metodologias aplicadas na avaliação do repertório T V β	16

1.4.	Estudos em doenças através da porção V β do TCR	17
1.4.1.	Doenças autoimunes	17
1.4.2.	Doenças virais	19
1.4.4.	Doenças bacterianas	20
1.4.3.	Doenças parasitárias	21
1.4.3.1.	Leishmaniose cutânea experimental	23
1.4.3.2.	Leishmaniose cutânea humana	25
	OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS	27
1.	Geral	28
2.	Específicos	28
3.	Justificativas	29
3.1.	Proposta do estudo	29
3.2.	Hipótese	31
	MATERIAIS E MÉTODOS	32
1.	Populações estudadas	33
2.	A Citofluorimetria	34
3.	Obtenção das células	36
4.	Cultivo de células do linfonodo	37

5.	Protocolo de marcação para aquisição de dados em citometria de fluxo	37
6.	Aquisição e análise de dados das amostras	39
7.	Considerações éticas	49
8.	Análises estatísticas	49
	RESULTADOS	50
1.	Comparação do repertório T V β em linfócitos de voluntários normais e de pacientes com LCL	51
2.	Comparação do repertório V β de linfócitos T do sangue periférico e do linfonodo de pacientes com LCL	54
3.	Comparação do repertório T V β de linfócitos do linfonodo de pacientes com LCL, estimulados com antígeno de <i>Leishmania</i> por 5 dias	57
4.	Comparação do repertório V β de linfócitos T de voluntários normais na vacinação anti-leishmaniose	60
	DISCUSSÃO	64
	CONCLUSÕES	74
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

Lista de siglas e abreviatura

APC	Células apresentadoras de antígeno
CD	Código de diferenciação
DNA	Ácido desoxirribonucléico
FACS	Separador de células ativadas por fluorescência
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FCS	Dispersão frontal de fluorescência
HIV	Vírus da imunodeficiência
HLA-DR	Antígeno do complexo principal de histocompatibilidade tipo II humano
IFN-γ	Interferón gama
IL	Interleucina
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
MHC	Complexo de histocompatibilidade principal
PBMC	Células mononucleares do sangue periférico
PE	Ficoeritrina
RNA	Ácido ribonucléico
SAGs	Superantígenos
SSC	Dispersão lateral de fluorescência
Tc	Células T citotóxica
TCR	Receptor da célula T
TGF-β	Fator de crescimento de células T
Th	Célula T helper
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Vα	Variável alfa
Vβ	Variável beta
Vδ	Variável delta

Resumo

CARACTERIZAÇÃO *EX VIVO* E *IN VITRO* DA EXPRESSÃO DE GENES V β DO TCR NA LEISHMANIOSE CUTANEA LOCALIZADA (LCL)

Muitos trabalhos recentes na literatura em doenças infecciosas, como toxoplasmose, malária, doença de Chagas e filariose avaliaram a relação da diversidade do repertório dos linfócitos T V β com as respectivas patologias visando identificar deleção ou hiper reatividade clonal implicada na patologia da doença. Nosso objetivo neste trabalho é avaliar o repertório T V β através de: 1) Caracterizar o repertório T V β em células do sangue periférico, comparando pacientes com LCL com indivíduos normais; 2) Comparar células do linfonodo com sangue periférico de pacientes com LCL; 3) Avaliar o efeito do estímulo com antígeno de *Leishmania braziliensis* na expressão de V β s; 4) Comparar células de voluntários normais antes e após imunização com vacina antileishmaniose. Utilizando a técnica de Citometria de Fluxo e usando anticorpos monoclonais anti TCR V β , anti CD4 e anti CD8, mostram uma expansão diferencial, oligoclonal, tanto para CD4⁺ quanto CD8⁺ e peptídica preferencial Nesta análise verificamos que o gene V β 12 foi o mais relacionado com a infecção por *Leishmania braziliensis*, (dados na tabela abaixo), e que os indivíduos vacinados apresentam uma grande ativação policlonal após 60 dias de imunização, mais evidenciada em CD4⁺.

Expressão do gene V beta 12 de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ na leishmaniose.

	V β 12	
	CD4 ⁺	CD8 ⁺
Sangue: LCL x controles	▼	▼
LN x sangue: LCL	S N	▲
Ag x meio: LN	▲	▲
Sangue - Ind. Imunizados: Pré x Pós	▲	▲

As setas indicam aumento ou diminuição percentual da expressão com P<0,05. NS= Não significativos.

Abstract

EX VIVO AND IN VITRO EXPRESSION OF V β GENES IN HUMAN CUTANEOUS LEISHMANIASIS.

Several recent studies found in infectious disease literature (in toxoplasmosis, malaria, filariasis and Chagas' disease, e.g.) have addressed the relationship of diversity in V β T cell repertoire looking for deletion or hyper responsive clonal activity at different stages of infection or disease progression. Most have found a polyclonal activation. We report here the observation of the T cell V β repertoire in human cutaneous leishmaniasis (CL), using the following approaches: a) the comparison of compare V β repertoire of peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of CL patients to normal volunteers (NV); b) exploration of compartmentalization, by comparing cells from regional lymph nodes draining the lesion area to PBMC in CL patients; c) the evaluation of in vitro stimulation by *Leishmania*, by comparing lymph node cells before and after culture with *Leishmania braziliensis* antigen; d) the evaluation in vivo stimulation, by comparing pre- to post-vaccination responses of NV submitted to anti-leishmania vaccination (BIOBRÁS, MG-Br). All evaluations were performed by cytofluorimetric analysis (FACSsort-BD) using an extended panel of anti-TCR V β monoclonal antibodies (Immunotech), as well as anti-CD4 and anti-CD8 monoclonal antibodies (BD). Our results indicate an oligoclonal differential and peptide preferential expansion in CD4⁺ and oligoclonal in CD8⁺ populations.

Comparison	V β 12 variation	
	CD4	CD8
CL vs NV (PBMC)	↓	↓
LN x PBMC (CL patients)	NS	↑
Ag x medium	↑	↑
Pre x Post vaccine (PBMC)	↑	↑

Variation of V β 12 expression was the most prominent finding related to *L. braziliensis* stimulation (table). V β 12 high frequency not has been previously shown by others in lesions of human CL.

Índice de figuras

- Figura 1 - A e B** Complexo do receptor da célula T. Composição das cadeias do TCR.
- Figura 2 - A e B** Esquema geral da citometria de fluxo. Elementos constituintes de um citômetro de fluxo.
- Figura 3** Parâmetros de aquisição: Tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) para linfócitos humanos.
- Figura 4 - A e B** Amostra não compensada. Amostra compensada.
- Figura 5** Aquisição de amostra não marcada.
- Figura 6** Aquisição de amostra isotipo.
- Figura 7 - A até F** Aquisição das amostras com marcação para CD4⁺, CD8⁺ e Vβs.
- Figura 8 - A e B** Expressão do repertório Vβ em células T CD4⁺ e CD8⁺ de indivíduos normais (controle) e células de indivíduos com leishmaniose cutânea localizada (LCL).
- Figura 9 - A e B** Comparação da expressão do repertório T Vβ em CD4⁺ e CD8⁺ entre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) versus células mononucleares do linfonodo (LN) de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.
- Figura 10 - A e B** Comparação da expressão do repertório T Vβ em CD4⁺ e CD8⁺ entre cultura de células mononucleares, cultivadas por 5 dias, estimuladas (Ag) e não estimuladas (meio) de pacientes com LCL.
- Figura 11 - A e B** Comparação de expressão do repertório T Vβ em CD4⁺ e CD8⁺ entre células mononucleares do sangue periférico de indivíduos voluntário a vacina anti-leishmaniose, comparando antes e 60 dias após imunização.

Índice de tabelas

Tabela I A e B: Características da população estudada.

Tabela II: Composição do painel de marcação.

Tabela III: Anticorpos utilizados e especificações.

Tabela IV: Expressão do TCR V β 12 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ .

INTRODUÇÃO

1. Considerações gerais sobre a Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL)

O agente etiológico das leishmanioses é um parasita intracelular pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* sp. Ele é responsável pelo espectro da doença humana, entre elas a leishmaniose cutânea localizada (LCL). Esta é a forma mais branda das leishmanioses americanas que incluem também a forma cutânea mucosa e cutânea difusa.

A transmissão do protozoário ocorre num ciclo envolvendo um inseto vetor, do gênero *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, que realiza a passagem do parasito entre os hospedeiros vertebrados. A leishmania tem duas formas de desenvolvimento: uma flagelada ou promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e outra aflagelada ou amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros. Após inoculação na pele de vertebrados, os promastigotas flagelados se transformam em amastigotas e multiplicam-se dentro dos vacúolos das células de linhagem macrófaga (Barral et al,1995). Em nosso meio a LCL é causada principalmente por *L.braziliensis* e *L. amazonensis* (BARRAL et al,1991).

A LCL apresenta-se clinicamente com uma úlcera bem delimitada com bordos elevados, situada, na maioria das vezes, nos membros inferiores e acompanhada de linfadenomegalia satélite. Esta linfadenomegalia pode ser a primeira manifestação da doença (BARRAL et al,1995). Os pacientes com esta forma de

leishmaniose apresentam reação de hipersensibilidade cutânea tardia positiva para antígeno de leishmania (MONTENEGRO et al,1926) e, na maioria dos casos, respondem satisfatoriamente ao tratamento ou curam-se espontaneamente (CARVALHO et al,1985).

Nas lesões dos indivíduos com LCL observa-se infiltrado inflamatório geralmente difuso e composto por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, podendo estar associado a uma reação granulomatosa (BITTENCOURT & BARRAL et al, 1995). Nestas lesões estão presente um número moderado ou ausente de amastigotas, que usualmente estão associados com necrose, que é um importante mecanismo de eliminação do parasito (PHILLIP et al, 1996).

1.1. Resposta imune na LCL

1.1.1. No modelo experimental

A utilização de modelos experimentais, na leishmaniose, muito tem contribuído para a compreensão da imunopatogênese da leishmaniose, sendo que a maioria dos estudos tem sido realizada com camundongos BALB/c, CBA e C57BL/6 infectados com *L. major*. A população de células CD4⁺ pode ser separada em linhagens do tipo Th1 e Th2, de acordo com o padrão de citocinas secretadas (MOSMAN et al, 1987). As células Th1 secretam predominantemente

interleucina 2 (IL-2) e IFN γ , estando envolvidas com o fenômeno da hipersensibilidade tardia. Em contrapartida, as células Th2 secretam principalmente IL-4, IL-5 e IL-10, estando mais relacionadas com a produção de anticorpos. Como as citocinas fabricadas pelas células Th1 são antagônicas às secretadas pelas células Th2, a patogênese pode estar relacionada à predominância do tipo de citocina secretada (MOSMAN et al, 1987).

No modelo murino, o camundongo BALB/c, que é um animal susceptível, produz citocinas com um padrão do tipo Th2, com produção aumentada de imunoglobulinas e ativação macrofágica ineficiente. Ao contrário, camundongos da linhagem C57BL/6 ou CBA apresentam níveis elevados de citocinas do tipo Th1 e controlam a doença (SCOTT et al, 1989). A ativação de macrófagos por citocinas derivadas de células do tipo Th1 se faz necessária para o controle da infecção, como também a produção de óxido nítrico, levando à via final de destruição do parasito (Reiner et al, 1995). Vale ressaltar que camundongos da mesma linhagem podem ser resistentes a uma cepa de leishmania e susceptível a outra, como ocorre com o C57Bl/10, que é resistente a infecção por *L. major* e, quando infectados com *L. amazonensis*, evoluem com cronificação da doença (AFONSO et al, 1993).

1.1.2. Na doença humana

Todo esforço tem sido feito na tentativa de identificar na resposta das células T CD4⁺ humanas e correlacionar-se o padrão de citocinas à gravidade da doença, porém estes estudos no homem ainda são controversos.

Os pacientes com LCL têm, habitualmente, preservada a resposta imune celular e seus linfócitos proliferam e produzem IFN- γ quando estimulados *in vitro* por antígeno de leishmania, como também os macrófagos destes pacientes não diferem de outros oriundos de indivíduos sadios no que diz respeito a capacidade de destruir leishmania (CARVALHO et al, 1985).

Análise de biópsias provenientes de pacientes com LCL, através da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), revelam um predomínio de mRNA (ácido ribonucléico mensageiro) para citocinas tipo Th1: IL-12, IFN- γ e TNF- α (PIRMEZ et al, 1993). Estes dados indicam uma resposta favorável, pois existe predomínio da resposta tipo Th1 e com baixos níveis de IL-4, resposta Th2, (COUTINHO et al, 1996). Porém, nem sempre existe preservação da resposta celular em pacientes com LCL, pois pacientes com lesão cutânea recente (período da doença inferior a dois meses) podem não produzir IFN- γ e não apresentar resposta linfoproliferativa ao estímulo do parasita *in vitro* como mostrado por ROCHA et al, (1993).

Outro fator que pode estar relacionado à deficiência da resposta celular em alguns pacientes com LCL é a presença do fator de crescimento de transformação beta (TGF- β) em lesões histológicas de pacientes. Esta citocina é conhecida por sua capacidade de inibir as respostas imunes celulares (BARRAL et al, 1995).

Diante da documentação de que a resposta imune está preservada na maioria dos pacientes com LCL, tem sido levantada a hipótese da existência de fenômenos alérgicos, presença de superantígenos ou mesmo auto-ímmunes para explicar a patogênese desta doença.

Apesar da complexidade da resposta imune na LCL, parece evidente que no período imediato que se segue à infecção e a partir da resposta que aí é gerada (ativação das células envolvidas e produção de citocinas), possivelmente dependente do padrão genético do hospedeiro e do parasito, teremos o controle da infecção ou a progressão da doença.

1.1.3. A resposta imune no linfonodo e a cinética da resposta imune na leishmaniose cutânea.

Na LCL humana, o que se sabe a respeito dos primeiros eventos imunes relacionados à infecção, desde o momento da inoculação do parasita até a sua

chegada ao linfonodo, estão relacionados com experimentos *in vitro* ou utilizando o modelo murino. Neste aspecto, foi demonstrado por MOLL et al (1993), utilizando o modelo de infecção do BALB/c por *L. major*, que no momento da inoculação do parasito pelo vetor, as células de Langerhans epidérmicas são as responsáveis pela fagocitose da *L. major*, migração, apresentação de antígeno e indução da ativação e produção de citocinas pelas células T no linfonodo. Estas células expressam altos níveis de moléculas de MHC classe II (HLA-DR) e são responsáveis pela indução da resposta imune primária nas células T. Elas migram através das vias linfáticas aferentes, transportando o antígeno do sítio de inoculação, localizado na pele, para o linfonodo de drenagem onde será iniciada a resposta imune T. Segundo estes autores, nesta etapa somente as células de Langerhans e não os macrófagos funcionam como células apresentadoras de antígeno de *L. major*. Porém, 24 dias após a infecção, percebe-se uma proporcionalidade na apresentação de antígeno entre as células Langerhans e macrófagos e este balanço podem influenciar no tipo de resposta imune inicial predominante das células T (MCLL et al, 1993).

Na LCL, a lesão inicia-se no sítio de entrada do parasita, fruto da migração de células T efetoras, provenientes do linfonodo, respondendo à presença do parasito ou aos antígenos apresentados por células especializadas. Esta lesão, inicialmente, se desenvolve como uma pequena pápula que progride para um

nódulo, evoluindo para uma úlcera (BARRAL-NETTO et al, 1995). A lesão então se estabiliza e à medida que começa a prevalecer a reação do hospedeiro, tende à cura espontânea em um período variável de seis meses a três anos, podendo ser acelerada a cura com terapêutica apropriada (BARRAL et al, 1991). Não se sabe, ao certo todos os eventos da resposta imune inicial na infecção pela *L. braziliensis* no homem, nem quanto tempo decorrem até o aparecimento dos primeiros sinais da resposta imunológica. Porém especula-se que o padrão de células T, células apresentadoras de antígeno e o balanço das citocinas produzidas no sítio inicial da infecção influenciam o progresso da doença ou sua resolução (CARVALHO et al, 1995). Um dos sinais iniciais desta infecção é o aparecimento de linfadenopatia no linfonodo de drenagem do sítio de inoculação cutânea do parasito (AZADEH et al, 1985). BARRAL et al (1995), estudando culturas de células aspiradas de linfonodo de pacientes com LCL, relatam a presença de leishmania em todas as culturas após 14 dias, confirmando a existência de drenagem linfática de parasitos vivos nos estágios iniciais de infecção. É mostrado também que existe uma relação direta entre a presença da linfadenopatia e a positividade do teste intradérmico de Montenegro.

Estudos *in vitro*, com células do sangue periférico de pacientes com LCL, indicam que pacientes na fase inicial da doença apresentam menor produção de IFN- γ e aumento da produção de IL-10, quando comparados a pacientes com

mais que dois meses de infecção (RIBEIRO-DE-JESUS et al, 1998). A natureza das células que compõem o infiltrado inflamatório das lesões durante o curso da doença tem sido alvo de intensa investigação tanto em modelos humanos como em murinos, principalmente com relação aos subtipos de células T. Estudos em lesões na fase inicial da doença têm demonstrado predominância de células T CD4⁺ em relação às CD8⁺, e que esta predominância, em alguns casos, é invertida (ISAZA et al, 1996). Porém ainda não se sabe ao certo se este aumento de células CD8⁺ está relacionado com processo de cura ou à manutenção da resposta inflamatória

1.1.4. A resposta imune na vacina

A vacinação é um procedimento artificial que visa a imunização e ocorre através da administração de antígenos preparados com uma suspensão de agentes infecciosos ou parte deles, convenientemente processados, com a finalidade de induzir no receptor um estado imunitário específico, protetor e relativamente duradouro. As vacinas envolvem a administração de um microorganismo, parte dele ou um produto do mesmo modificado, a fim de estimular uma resposta imunológica eficaz, sem, no entanto, apresentar risco ou apresentando menos risco do que o decorrente da infecção, levando-se em conta sua incidência ao receptor. Esta imunização estimulará tanto a resposta imune celular como humoral. As vacinas são, via de regra, empregadas para a

profilaxia das infecções e, raramente, com a finalidade curativa (JOHNSTON et al, 1999).

Na leishmaniose cutânea humana, algumas vacinas têm sido testadas. Utilizando promastigotas inativadas, ANTUNES et al (1986) demonstraram uma proteção de 50%; como também COUTINHO et al (1996), utilizando glicoproteína de amastigota, sugerem uma proteção estimada em 50%.

MENDONÇA et al (1995), realizaram estudos em 43 indivíduos voluntários a uma vacina produzida pela Biobrás. Eles caracterizaram a resposta imune dos linfócitos T induzida pela vacina contra leishmaniose, utilizando experimentos *ex vivo* e *in vitro*, e compararam os resultados com células de indivíduos infectados. Esta vacina era composta de cinco tipos de promastigotas diferentes de leishmania inativadas (*L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. major*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*). Somente indivíduos que não apresentavam reação ao teste cutâneo de Montenegro foram imunizados e a vacinação foi administrada em duas doses de 1,5 ml, injetadas intramuscularmente com um intervalo de sete dias.

Este estudo mostrou que no grupo de indivíduos vacinados, entre nas culturas de células mononucleares do sangue periférico, estimuladas com antígenos de leishmania, predominavam células do tipo CD8⁺, enquanto no grupo dos pacientes existiu predominância das células CD4⁺, sugerindo que as células CD8⁺ poderiam ter uma participação na proteção contra leishmaniose.

1.2. Estímulo e ativação das células T

O estímulo das células T é uma etapa fundamental para o controle de infecções provocadas por patógenos intracelulares, pois são estes eventos que farão culminar na secreção de citocinas, proliferação e o desempenho de funções efetoras regulatórias ou citolíticas, característico da resposta imune celular, para destruir o invasor ou mantê-lo controlado.

Os linfócitos T auxiliares (Th) e citolíticos (Tc) reconhecem peptídeos derivados de antígenos proteicos estranhos associados às moléculas próprias do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) nas superfícies das células apresentadoras de antígeno (APC) ou células-alvo. O reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T é o estímulo iniciador de sua ativação (BJORKMAN et al, 1987).

Nos linfócitos T existem várias moléculas que são responsáveis pelo reconhecimento específico e/ou resposta a um antígeno associado ao MHC. Essas moléculas são compostas por um complexo de várias proteínas integrantes da membrana plasmática. Algumas proteínas deste complexo mediam a ligação específica aos complexos peptídeo-MHC na superfície das APC ou células-alvo (Receptor Antigênico do Linfócito T ou Receptor da Célula T - TCR). Outras proteínas funcionam na transdução de sinais para o

1.2.1. Caracterização do receptor da célula T (TCR)

O receptor da célula T para complexos peptídeo-MHC é um heterodímero consistindo de duas cadeias polipeptídicas, designadas α e β , ligadas covalentemente entre si por pontes de bissulfeto. A cadeia α é uma glicoproteína ácida de 40 a 60 quilodaltons (kD) e a cadeia β é uma glicoproteína neutra ou de 40 a 50 kD (Figura 1 B). Há uma semelhança estrutural muito grande entre as cadeias α e β do TCR e os polipeptídeos das imunoglobulinas. As cadeias α e β têm regiões variável (V) e constante (C). A extremidade carboxiterminal da região V, isto é, a junção entre as regiões V e C, é codificada por um gene do segmento de junção (J) e, no caso da cadeia β somente, existe um gene do segmento de diversidade (D) (DAVIS et al, 1988 e FOWLKES et al, 1989). Os rearranjos somáticos destes segmentos geram muitas possibilidades combinatórias, bem como diversos mecanismos que geram diversidade juncional, resultando na geração de um grande repertório de especificidade de linfócitos T.

O pareamento das cadeias α e β serve para multiplicar a diversidade gerada por cada cadeia. Até o momento foram identificados 50 genes $V\alpha$ e 75 $V\beta$. A maioria dos trabalhos publicados nesta área utiliza a expressão dos genes $V\beta$ do TCR para definir o repertório dos linfócitos T, por existir um número maior destes genes e por ser esta região do receptor de superfície, nas células T

maduras, que se ligam superantígenos. Neste sentido foram desenvolvidas sondas e anticorpos monoclonais específicos para esta região.

Nos genes $V\beta$ não é observada a alta taxa de mutações somáticas demonstrada nos genes de imunoglobulinas. Este fato provavelmente está ligado à necessidade do organismo de manter a autotolerância (LIAO et al, 1989). Mesmo com toda possibilidade de rearranjos, um linfócito T só expressa um tipo de TCR, pois a geração de um receptor funcional inibe um rearranjo posterior, através do fenômeno da exclusão alélica. Um outro detalhe importante é que o mesmo conjunto de genes do TCR pode ser expresso em linfócitos T restritos à classe I ou à classe II do MHC, pois a capacidade de um linfócito em responder a um determinado antígeno associado à classe I ou II é determinada principalmente pela expressão de proteínas CD4 ou CD8 (BIERER et al, 1989).

As duas cadeias polipeptídicas (α e β) estão associadas não covalentemente a cinco outras proteínas na membrana plasmática (γ , δ , ϵ e duas ξ) que formam o complexo proteico CD3. Estas proteínas estão relacionadas tanto com a expressão na superfície celular das moléculas do TCR quanto com sua ativação. A síntese dos componentes do complexo do TCR, sua montagem e sua expressão superficial são fenômenos estritamente regulados e coordenados que ocorrem durante a maturação dos linfócitos T no timo. Juntas, estas proteínas

formam o complexo do TCR funcional (JORGENSEN et al, 1992). Além do complexo $\text{TCR}\alpha/\beta:\text{CD3}$, podemos encontrar um segundo rearranjo de segmentos gênicos para o TCR que é formado por uma cadeia γ e uma δ . Este tipo é encontrado num pequeno subgrupo de linfócitos T periféricos e timócitos imaturos (NOSSAL et al, 1993).

Além da estimulação via interação de peptídeos derivados de antígenos ligados a moléculas do MHC com o complexo TCR: CD3 e proteínas associadas, um linfócito T pode sofrer estimulação também através da atividade de uma série de moléculas denominadas superantígenos.

1.2.2. Superantígenos (SAGs)

Os superantígenos são moléculas proteicas capazes de ativar os linfócitos T inespecificamente. Eles se ligam às moléculas de classe II em células apresentadoras de antígeno e são reconhecidas pelos TCR, mas não da mesma forma com que são reconhecidos os complexos antígeno de classe II-peptídeo. A ligação se dá apenas na cadeia β e na região variável (V) do TCR, mas isto já é suficiente para ativar as células T e, dependendo das condições experimentais, os efeitos podem ser similares àqueles observados na resposta imune, podendo levar a uma deleção ou anergia clonal. A maioria dos superantígenos estudados

é de origem bacteriana ou viral, como as enterotoxinas estafilocócicas (SEs), (LI et al, 1999).

1.3. Metodologias aplicadas na avaliação do repertório T V β

A maioria dos trabalhos relativos à análise do repertório V β utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) usando sondas específicas para famílias de V β . Esta técnica possibilita uma varredura grande do repertório das células T. Porém impossibilita o estudo dos subtipos de células T (CD4 e CD8) sem uma purificação prévia. Estas purificações requerem um número grande de células, portanto, sendo um aspecto negativo na sua utilização. A técnica do PCR é a mais indicada quando se está trabalhando com células de lesões, devido à limitação do número de células obtidas, porém as infecções secundárias localizadas podem trazer problemas nas análises dos dados (ROSENBERG et al, 1992).

Desde a descoberta dos superantígenos, um grande número de anticorpos monoclonais marcados com fluorescência que reconhecem diferentes regiões V β foi disponibilizado no mercado. A disponibilidade destes reagentes levou então recentemente à realização de alguns trabalhos relacionados à porção V β do TCR utilizando a citometria de fluxo. Com esta técnica é possível

realizar análise com rapidez e sensibilidade, além de permitir a avaliação do repertório V β relacionado as subpopulações de célula T. As desvantagens desta técnica são a necessidade de um número relativamente elevado de células (em torno de 10⁴ linfócitos por marcação) e a indisponibilidade de anticorpos monoclonais suficientes para cobrir todo o repertório (famílias) de TCR V β .

A análise do repertório de populações celulares definidas é de grande relevância, pois permite realmente a caracterização do tipo celular relacionado à patologia em estudo (FAINT et al, 1999).

A maioria dos estudos neste sentido busca esta caracterização comparando células mononucleares (linfócitos) no sangue periférico com as células presentes no sítio da reação inflamatória ou também submetendo as células linfocitárias circulantes de indivíduos doentes a estímulos *in vitro* e comparando sua reposta com as células de indivíduos saudáveis.

1.4. Estudos de doenças utilizando a porção V β do TCR

1.4.1. Doenças autoimunes

Nas doenças autoimunes, os estudos visam analisar o tipo dos receptores antigênicos expressos pelos linfócitos relacionados com a doença. A definição dos padrões de expressão dos genes V β em doenças auto-imunes avaliando

células na circulação e nos linfócitos T lesionais, em modelos experimentais e no homem, tem sido demonstrado na literatura.

Em pacientes com certas doenças auto-imunes órgão-específicas, como a artrite reumatóide, os linfócitos presentes nas lesões expressam número limitado de genes $V\beta$, enquanto os linfócitos circulantes destes pacientes geralmente mostram padrões diferentes dos normais na expressão dos genes (FITZGERALD et al, 1995). Estes estudos sugerem que as células produtoras de doença podem ter surgido de um ou de alguns clones de linfócitos que reconhecem e respondem a um ou a alguns determinantes antigênicos. Estas respostas são também chamadas de oligoclonais. Enquanto, na esclerose múltipla, diferentes pacientes com a mesma doença expressam diferentes genes $V\beta$ em seus linfócitos lesionais, não demonstrando a mesma característica da doença anterior. (OKSENBERG et al, 1990). Outros estudos em células humanas também demonstram a existência de um repertório restrito de genes $V\beta$ relacionado aos processos auto-imunes patológicos como na tireoidite (DAVIES et al, 1991), na cirrose biliar primária (MOEBIUS et al, 1990) e nos linfócitos infiltrantes de tumor (NITTA et al, 1990).

Em análise final, estudos da expressão de genes $V\beta$ dos receptores antigênicos ainda não oferecem muita informação sobre os mecanismos da auto-imunidade.

1.4.2. Doenças virais

Estudos pioneiros demonstraram que produtos de genes virais podem funcionar como superantígenos. Em certas linhagens consanguíneas de camundongos, diferentes genes de vírus de tumores mamários são incorporados ao genoma murino. Antígenos virais produzidos pelas células de uma linhagem são capazes de ativar os linfócitos de outra linhagem que expressam V β particulares em seus receptores antigênicos. Nesta forma de ativação não exige apresentação de antígeno via MHC (DOHERTY et al, 1992).

Na imunodeficiência humana causada pelo HIV tem sido relatado que a presença de superantígenos nestes vírus levam a uma expressão muito reduzida de V β 8 e um aumento de V β 11 em células de pacientes não respondedores ao tratamento, comparado com pacientes respondedores e indivíduos controles, sugerindo haver uma deleção clonal específica para um clone (V β 8) e expansão para outro (V β 11) que possivelmente esteja correlacionado com a replicação viral (GARCIA et al, 1996).

Porém JASON et al, (1997), mostraram que antígenos derivados do HIV são capazes de ativar policlonalmente linfócitos T CD4⁺, afetando a expressão de famílias como V β 3, 11, 13.1, 13.3 e 22 de indivíduos infectados comparados com controles normais, e não sugerem a presença de superantígenos.

1.4.3. Doenças bacterianas

Antígenos bacterianos foram os primeiros produtos relatados como tendo atividade superantigênica para os linfócitos T. Hoje se sabe que os linfócitos T, tanto de camundongos quanto do homem, respondem a enterotoxinas expressando nos seus TCRs genes V β de diferentes famílias. No homem podemos destacar as enterotoxinas estafilocócicas (SEa levando à resposta de linfócitos V β 3, V β 5, V β 12; Seb: V β 3, V β 12, V β 14, V β 15, V β 17 e V β 20; Sec: V β 12, V β 13, V β 14, V β 15, V17 e V20; Sed: V β 3, V β 5.1, V β 17 e V β 20; See: V β 5.1, V β 6.1/6.3, V β 8 e V β 18) que são produzidas pela bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Estas enterotoxinas são a causa mais comum de intoxicação alimentar e funcionam como superantígenos ligando-se diretamente às cadeias β das moléculas do TCR fora das regiões de ligação a antígeno, e apresentando uma frequência de linfócitos T responsivos muito mais alta que a frequência de células específicas para antígenos proteicos convencionais. Existe também a TSSst, toxina da síndrome do choque tóxico, que eleva muito a ativação de linfócitos T CD4⁺. Este aumento da ativação levará a reações sistêmicas como febre e choque cardiovascular, provavelmente induzidas por citocinas como o TNF- α (Fator de Necrose Tumoral), (COFFMAN et al, 1993).

Pacientes na fase aguda da infecção pelo *Mycobacterium tuberculosis* mostraram uma expansão de linfócitos T CD4, preferencial para algumas regiões do TCR V β , em células de cultura na presença de antígeno da *Mycobacterium*, tanto no sangue periférico quanto em células do líquido pleural (GAMBÓN-DEZA et al, 1995). Na doença periodontal causada pelo *Porphyromonas gengivalis* (nos tecidos de gengivas) encontrou-se expressão aumentada de V β 6 e diminuída de V β 3, V β 10, V β 11, V β 16 e V β 18 comparando com células T do sangue periférico. Nestes dois trabalhos é sugerido que a diminuição e o aumento de determinadas famílias de V β estão associadas às funções dos linfócitos Th1 e Th2 e à gravidade da doença.

1.4.4. Doenças parasitárias

Vários estudos em doenças parasitárias têm tentado mostrar a diversidade do repertório de linfócitos T relacionado à gravidade das infecções, e se a resposta imune celular possui ou não alguma atividade superantigênica. Esses estudos tem sido realizado principalmente em malária, toxoplasmose, doença de Chagas, leishmaniose, esquistossomose e filariose.

DENKERS et al, (1994) utilizando camundongos isogênicos em estudos com *Toxoplasma gondii* descrevem, pela primeira vez, atividade superantigênica em protozoários. Seus estudos revelaram uma grande expansão de TCR V β 5 e

produção de IFN- γ em células CD8⁺ de esplenócitos em cultura comparado com células não estimuladas. Não foram encontrados resultados similares em células T CD4⁺. Estes autores utilizaram também peptídeos virais de ação superantigênica conhecida contra clones de V β 5, para demonstrar que estes clones são susceptíveis à deleção. Com isto concluíram que o *Toxoplasma gondii* leva a uma ativação preferencial de V β 5 em CD8⁺ tendo como consequência a deleção posterior destes clones, podendo levar à cronicidade da doença tanto em camundongos quanto no homem.

No sangue periférico de indivíduos vivendo ou não em áreas endêmicas para o *Plasmodium falciparum*, TROYE-BLOMBERG et al, (1997) não encontraram diferenças entre o repertório V β das células T CD4⁺ e CD8⁺. Sugerem então que o surgimento de casos graves da doença pode estar relacionado com fatores genéticos dos pacientes.

Na doença de Chagas experimental tem sido demonstrado, por vários autores, expressão diferencial do repertório principalmente em células T CD8⁺. LEITE DE MORAES et al, (1994) sugere atividade superantigênica do *Trypanosoma cruzi* em relação a células T CD8⁺ V β 5 e 14 na fase aguda da doença em camundongos. Já CARDONI et al, (1996) encontraram uma expansão preferencial elevada de V β 6 e 8 em células CD8⁺ no timo e baço. No homem

os estudos iniciais referentes à diversidade do repertório T não mostraram a da expressão diferencial de nenhuma cadeia em especial do TCR V β (CUNHA NETO et al, 1994). Um trabalho recente de COSTA et al, (2000) demonstra que antígeno da forma tripomastigota do *T. cruzi* produz expansão diferencial de V β 17 nas células CD4⁺ de pacientes na forma indeterminada em comparação com pacientes com a forma cardíaca da doença de Chagas. Estes dados, segundo os autores, sugerem a existência de algum componente no antígeno de tripomastigota capaz de estimular porções específicas do repertório de células T, pois o antígeno de epimastigota não produziu expansões semelhantes.

1.4.4.1. Leishmaniose cutânea experimental

Alguns estudos têm buscado determinar o repertório de células T envolvidas com a susceptibilidade ou proteção na leishmaniose experimental. O primeiro trabalho publicado neste sentido foi o de REINER e LOCKSLEY (1993). Os autores utilizaram células CD4⁺ provenientes de linfonodos poplíteos de: (1) camundongos BALB/c, susceptíveis à infecção por *Leishmania major*; (2) camundongos BALB/c induzidos à cura através de tratamento com administração de anti-IL4; (3) camundongos C57BL/6, resistentes à infecção por *Leishmania major* e (4) grupos controles das duas linhagens de camundongos. Todos estes grupos foram infectados por *L. major*, exceto os controles. Utilizaram-se também 16 tipos de clones de células Th2 isoladas de 6

animais com infecção progressiva para identificar as seqüências dos seus TCRs. Neste trabalho, os autores concluem que os camundongos suscetíveis apresentam uma resposta imune do tipo oligoclonal, apresentando uma expansão aumentada de alguns tipos de TCRV $\alpha\beta$ (V α 8 e V β 4, 6 e 8). Concluem também que os genes V α 8 e V β 4 estão expressos respectivamente em 50% e 31% dos clones de células Th2 isoladas de camundongos suscetíveis, sugerindo que algum antígeno peptídico proveniente da *L. major* pode estar induzindo a proliferação específica destas células, que por sua vez, são as responsáveis pela reação inflamatória exacerbada neste animais.

O segundo trabalho publicado foi o de LOHOFF et al, 1994, que utilizando metodologia semelhante ao trabalho mostrado anteriormente, conclui que linhagens de camundongos resistentes e susceptíveis à *L. major* expressam TCRs similares comparando com grupo não infectado. Também não encontram diferenças entre clones de células Th1 e Th2 isoladas de camundongos susceptíveis e resistentes à infecção à *L. major* em relação a expressão dos genes V α 8 e V β 4 nos seus TCRs. Concluem, por fim, que existe uma diferença muito grande entre seus resultados em relação aos dos autores anteriores, porém justificam que o problema deva ser de ordem metodológica e que se faz necessário novos experimentos para se obter conclusões definitivas.

O terceiro e último trabalho publicado relacionando repertório em leishmaniose experimental foi o de LAUNOIS e LOCKSLEY, (1997). Neste é demonstrado uma grande produção de mRNA de IL-4 pelas células CD4⁺ provenientes do linfonodo de camundongos BALB/c, após 16 horas de infecção por *L. major*. A expressão foi bastante significativa quando se comparou esta produção entre camundongos normais infectados com camundongos resistentes à infecção para *L. major* (C57BL/6) e camundongos susceptíveis deficientes de Vβ4. Mostram também uma relação inversa entre a expressão de IL-4 e os níveis de IFNγ (interferon gama) e a resolução da lesão, ocorrendo tanto entre os grupos resistentes como os deficientes de Vβ 4. Concluem então que a presença do TCR Vβ 4 nas células CD4⁺ dos camundongos suscetíveis seria um dos principais fatores que levam os animais susceptíveis ao não controle da infecção por *L. major*, pois estas células são as principais responsáveis pela produção de IL-4.

1.4.4.2. Leishmaniose cutânea humana

Apenas o trabalho de UYEMURA et al, 1993, analisa o repertório Vβ na leishmaniose humana. Comparando a expressão do TCR Vβ em 8 pacientes com LCL verificam que alguns genes Vβ foram mais representativos na lesão (Vβ 2, 3, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 14, e 21) que no sangue, mas com muita variação

individual, sendo impossível estabelecer um padrão. Ao analisar a expressão de V β nas populações CD4⁺ e CD8⁺ em 3 pacientes, verificam diferenças entre os repertórios de células CD4⁺ e CD8⁺, porém encontram semelhança na expressão preferencial de V β 6. Entretanto os autores comentam que a expressão preferencial de V β 6 nas lesões pode estar relacionada a infecções bacterianas.

No trabalho foi realizada análise para RNA mensageiro de citocinas e detectada presença de IFN- γ em células CD4⁺ e de IL-4 e IL-10 em células CD8⁺. Eles demonstraram uma participação importante das células T CD8⁺ presentes nas lesões como as principais produtoras de citocinas do tipo 2, que favorecem a progressão da doença. Entretanto, não foi tirada nenhuma conclusão quanto ao tipo de resposta imune apresentada pelos pacientes em termos de expressão de repertório, devido à grande diferença apresentada entre os indivíduos estudados.

OBJETIVOS E JUSTIFICATIVAS

Não foi demonstrada pela comparação entre células do sangue periférico e células da lesão, conclusão sobre alteração do repertório T V β na leishmaniose cutânea humana. A nossa hipótese é que uma possível alteração na expressão deste repertório pode ser identificada ao se levar em consideração o estudo da compartimentalização celular da resposta imune e tempo de exposição ao antígeno. Para testar esta hipótese, nossos objetivos são:

1. Geral

- Caracterizar o repertório dos linfócitos T V β na leishmaniose cutânea, no sentido de identificar hiper expressão ou deleção e/ou uma possível alteração compartimentalizada para os subtipos de célula T (CD4⁺ e CD8⁺).

2. Específicos

- Comparar o repertório dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue de indivíduos com LCL com o de indivíduos normais, no sentido de identificar clones reativos ou deletados durante a leishmaniose.

- Comparar o repertório dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue e linfonodo de pacientes com LCL, no sentido de identificar uma possível alteração compartimentalizada;
- Comparar o repertório dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em células do linfonodo de pacientes com LCL estimulados e não estimulados com antígeno de *L. amazonensis* para observarmos o comportamento do repertório frente a agentes específicos;
- Comparar o repertório dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ no sangue de indivíduos normais antes e depois de serem submetidos a uma vacina anti-leishmaniose, a fim de identificar o efeito da imunização sobre o repertório.

3. Justificativas

3.1. Proposta do estudo

Uma das abordagens para avaliar o papel de agentes infecciosos sobre o sistema imune é a análise do padrão dos receptores antigênicos expressos pelos linfócitos que participam ativamente das respostas específicas contra estes agentes.

Técnicas moleculares, como a reação em cadeia catalisada pela polimerase (PCR), e imunológicas, como a citometria de fluxo, tornam exequível examinar a expressão de genes variáveis α e β dos receptores antigênicos de células T.

As análises de repertório também nos fornecem informações importantes sobre a existência ou ausência de uma resposta de célula T direcionada que pode 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, nós poderemos adquirir informações novas sobre como um parasito se relaciona com o sistema imune do hospedeiro.

Na leishmaniose cutânea localizada existe uma exacerbação da resposta imune celular e isto pode estar associado à presença de clones bastante reativos, sendo sua identificação muito relevante para se caracterizar melhor a imunopatologia e definir estratégias mais eficientes na imunoprofilaxia.

A identificação de genes V expressos por linfócitos reativos pode ter aplicação prática se for exequível matar seletivamente estas células injetando anticorpos específicos para regiões V em particular, poupando os linfócitos que não sejam patogênicos.

3.2. Hipótese

A nossa hipótese é que a resposta inflamatória do linfócito T na leishmaniose cutânea, entre outros fatores, pode ser devida à expansão excessiva de clones reativos frente à presença de antígenos de *Leishmania braziliensis* presentes no sítio inicial da infecção, levando à formação de lesões e a uma vasta destruição tecidual.

A identificação destes clones, e posteriormente dos antígenos envolvidos na sua estimulação, poderão ter reflexos práticos na formulação de estratégias de tratamento na leishmaniose.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. População estudada

1.1. Foram incluídos neste estudo indivíduos portadores de leishmaniose cutânea localizada provenientes da cidade de Corte de Pedra, (Bahia, Brasil), área endêmica para LCL. Os pacientes apresentavam ulcerações cutâneas, linfadenopatia ocasional e o diagnóstico foi confirmado pela positividade para o teste cutâneo de Montenegro. Foram positivos também para presença de parasitos em cultura de células com meio de cultivo NNN.

Todos foram examinados previamente ao início do tratamento, Tabela IA.

1.2. Os indivíduos controles da área endêmica foram pessoas que moram na cidade de Corte de Pedra, às vezes acompanhantes dos doentes, que não apresentavam sinais clínicos para leishmaniose e tinham sorologia negativa para *Leishmania*, Tabela I B.

1.3. Os voluntários que participaram do teste da vacina anti-leishmaniose foram voluntários sadios, entre 18 e 40 anos de idade, do 10º Grupo de Artilharia de Campo e alunos da Escola Formadora de Sargentos do 23º Batalhão de Caçadores, da cidade de Fortaleza, Ceará. Todos os voluntários incluídos neste estudo foram procedentes de áreas sem transmissão de leishmaniose e sem história prévia de doença. Apresentavam exame clínico normal, teste intradermo-reação de Montenegro negativo e sorologias negativas para

leishmaniose, doença de Chagas e infecção por HIV. A intradermo-reação foi realizada logo após a primeira coleta de sangue, com injeção intradérmica de 0,1ml de antígeno solúvel de *L. amazonensis* (MHOM-BR-86BA-125) contendo 25µg de proteína por mililitro, preservado em fenol, (REED et al, 1986), produzido no serviço de Imunologia do Hospital Edgar Santos – UFBA. Foi considerada positiva a reação com diâmetro igual ou superior a 5 mm. Todos foram esclarecidos sobre a finalidade do estudo e os riscos inerentes ao procedimento, e todos assinaram o termo de consentimento esclarecido, Tabela I B.

A vacina usada continha uma cepa de referência da organização Mundial da Saúde (OMS), *L. amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8). Foi produzida, segundo as prescrições de manuseio da OMS, pela BIOBRÁS – uma empresa de biotecnologia licenciada pelo Ministério da Saúde. A vacinação constituiu de duas doses de 1,5 ml, intramusculares, com intervalo de 21 dias (GENARO et al, 1996).

2. A Citofluorimetria

A técnica de citofluorimetria teve grande difusão a partir da década de 70 e chegou ao seu auge nos meados da década de 80 com o desenvolvimento de anticorpos monoclonais para monitoramento celular de pacientes imunodeficientes provenientes da infecção pelo vírus da imunodeficiência

adquirida (HIV). Atualmente ela se encontra muito difundida e com uma vasta aplicação, tanto em linhas de pesquisa quanto no diagnóstico clínico.

A citometria de fluxo, como também é chamada, é uma técnica de imunofluorescência que possui vantagens como análise de múltiplos parâmetros em uma única célula, capacidade de analisar milhares de células em minutos, capacidade para avaliar populações celulares raras e possibilidade de determinação de parâmetros quantitativos, absolutos e relativos. Possui também limitações tais como somente analisar células em suspensão.

Existe atualmente um espectro de aplicações muito grande pois além da avaliação do tamanho e granulosidade da célula (Figura 2 A e B), é possível realizar a avaliação da expressão de moléculas de superfície ou intracelulares, a avaliação do conteúdo de DNA (ciclo celular), a avaliação da condição fisiológica da célula (apoptose ou necrose), avaliações citoquímicas (atividade enzimática, pH, potencial de membrana mitocondrial e liberação de íons Ca^+), a avaliação da expressão de genes e *sorting* de populações celulares entre outras.

Neste trabalho foi utilizado o FACSort (Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA, EUA). Este possui um laser de argônio de 15mW, 488nm, refrigerado a ar. As dispersões frontais (tamanho da célula- FSC) e

laterais (complexidade ou granulosidade- SSC) de luz foram obtidos em fotomultiplicadores em escala linear, enquanto as fluorescências específicas foram coletadas através de filtros de 530/30nm para isotiocianato de fluoresceína (FITC), 585/42nm para R-ficoeritrina (R-PE) e 650nm para a proteína de clorofila de peridina (PerCP), com valores em escala logarítmica.

3. Obtenção das células

1. Células do sangue periférico: Foram coletadas através da retirada de 20ml de sangue na veia do antebraço, utilizando para coleta tubos com vácuo (Vacutainer, Franklin Lakes-NJ-EUA).

2. Células do linfonodo: Estas células foram coletadas através da aspiração de linfonodos maiores que 1 cm de pacientes com evidências clínicas de leishmaniose cutânea localizada. Para confirmação diagnóstica, parte deste aspirado foi colocado em tubos contendo meio NNN próprio para crescimento do parasita (BARRAL, A & BARRAL-NETTO, M.,1992). Os casos positivos foram incluídos no nosso estudo.

4. Cultivo de células do linfonodo

Células mononucleares derivadas de aspirado de linfonodo foram lavadas e ressuspendidas na concentração de 3×10^6 /ml em meio RPMI suplementado com HEPES (25mM), L-glutamina (2mM), gentamicina (50 μ g/ml) e soro AB humano (10%). A suspensão celular foi distribuída em placas de 48 poços e cultivada sem estímulo ou com 4 μ g/ml de antígeno solúvel de *L. amazonensis*. As placas foram incubadas a 37⁰C, 5% CO₂ por 5 dias.

5. Protocolo de marcação para aquisição em Citometria de fluxo

1. Células do sangue periférico: Amostras de 50 μ l de sangue foram incubadas com 50 μ l de uma mistura de anticorpos mostrada na Tabela 1. As especificações dos anticorpos usados estão registradas na tabela 2. As amostras foram homogeneizadas em *vortex* e incubadas por 30 minutos, a 4⁰C e protegidos da luz. Após este período foi realizada a lise das hemácias utilizando solução comercial de lise (Lysing solution, BDIS-San Jose -CA-EUA) à temperatura ambiente. Após adição de 1ml desta solução em cada tubo de amostra, fez-se uma homogeneização em *vortex* e foram mantidos 10 minutos em temperatura ambiente e protegidos da luz. Após este período, realizamos duas lavagens utilizando 1ml de salina

contendo 1% de BSA + 0,1% de azida sódica e centrifugações a de 200g durante 10 minutos. Ao fim foram ressuspensas em 300 µl de salina contendo 0,1% azida sódica por cada tubo e procedeu-se imediatamente à aquisição dos dados.

2. Células do linfonodo *ex vivo*: As amostras de punção de linfonodos foram centrifugadas (200g a 10 minutos), e ressuspensas em 1ml de salina contendo 1% de BSA + 0,1% de Azida sódica. Foram adicionados 50 µl da mistura de anticorpos registrados na Tabela 1. O protocolo de marcação foi o mesmo utilizado anteriormente, sem a etapa da lise celular.

3. Células do linfonodo em cultivo: Após 5 dias de cultura as células foram coletadas e lavadas com salina, seguindo então o protocolo anteriormente descrito para células de linfonodo. Nestas células, antes da marcação com anticorpo, era realizada uma incubação com soro humano inativado (20µl a 20% em PBS + 1% de BSA + 0,1% de Azida sódica) para bloqueio de receptores Fc de possíveis células B e NK presentes.

6. Aquisição e análise dos dados das amostras

Para aquisição no citômetro, primeiramente foram definidos os parâmetros de tamanho (FSC) versus granulosidade (SSC) e realizado uma seleção particular na região dos linfócitos (gate) denominado de R1 (Figura 3). Realizamos então as aquisições controles de compensações, não marcadas e isotópicas. A amostra de compensação é composta das mesmas células utilizadas no experimento, marcadas singularmente, de preferência com anticorpos altamente fluorescentes específicos para as células avaliadas e conjugados com fluorocromos utilizados nos experimentos.

Este procedimento é realizado para se diferenciar entre a emissão de luz em comprimento de onda não definida para análise de determinado fluorocromo e verdadeira presença de marcação com mais de um fluorocromo na mesma célula.

Foram então abertas três janelas de gráficos, FITC/PE, PE/PerCP e FITC/PerCP formatadas para a região dos linfócitos (R1). A leitura de dupla marcação para estas células singularmente marcadas (Figura 4A) indicava não compensação, e a necessidade de ajustes. Somente após a leitura das fluorescências isoladas (Figura 4B) foram procedidas as aquisições seguintes.

Em cada experimento fora analisado primeiramente a amostra controle não marcada (células sem adição de anticorpo), (Figura 5). Os ajustes dos canais

de detecção foram realizados de modo que a fluorescência destas células se encontrasse na região da escala considerada negativa (em torno de 10^1). Posteriormente foram analisadas as amostras isotípicas (anticorpo do mesmo isotipo usado para identificação das células humanas) usadas como controles negativos (Figura 6).

Procedia-se, então a aquisição das amostras teste. Foram utilizadas 6 janelas de aquisições simultâneas (Figura 7): Tamanho x granuloseidade sem gate, para visualizarmos o padrão de dispersão dos linfócitos (Figura 7A); granuloseidade x fluorescência, com gate, para selecionarmos uma região específica em células positivas $CD4^+$ (Figura 7B); granuloseidade x $CD8^+$ com a mesma finalidade (Figura 7C); fluorescência em $CD4^+$ x $V\beta$ e $CD8^+$ x $V\beta$, formatadas para os gates das janelas anteriores, para registrarmos os valores percentuais de células duplamente positivas (Figura 7D e E respectivamente) e por fim uma outra janela com tamanho x granuloseidade, formatada também para os gates localizadas nas janelas de $CD4^+$ e $CD8^+$ para garantirmos especificidade em células T, que é dada quando comparamos com a primeira janela, e as populações de linfócitos se encontram igualmente localizadas (Figura 7F).

Tabela I A: Características da população estudada

POPULAÇÃO	IDADE (anos)	SEXO	LESÃO	
Pacientes	-	-	Localização ¹	Tamanho ²
1	18	M	Perna E	5
2	24	M	Perna E	12
3	33	M	Perna D	10
4	23	M	Perna E	10
5	14	M	Perna D	10
6	24	M	Braço E	7
7	12	F	Perna D	7
8	18	M	Pé E	Mínima
9	22	M	-	Ausente
10	36	M	-	Ausente
11	44	M	Coxa D	Mínima
12	12	M	Perna D	Mínima
13	13	M	Perna D	15
14	33	M	Perna D	Mínima
15	12	M	Perna E	13
16	12	M	Perna E	10
17	15	M	Perna E	10
18	48	F	Pé D	10

1. D = Direito, E = Esquerdo.

2. Valores em milímetros.

Tabela I B: Características da população estudada

POPULAÇÃO	IDADE	SEXO
	(anos)	
<hr/>		
Controles	-	-
<hr/>		
1	35	F
2	40	F
3	36	M
4	28	F
5	30	F
6	25	F
7	30	M
<hr/>		
Vacinados	-	-
<hr/>		
1	18	M
2	18	M
3	19	M
4	18	M
5	19	M
6	19	M
7	18	M
<hr/>		

Tabela II: Composição do painel de marcação *

MARCAÇÃO	FL-1 -FITC	FL-2-PE	FL-3-PerCP
	(2µl)	(2µl)	(2µl)
Compensação	CD8	CD8	CD8
Não marcada	-	-	-
Isotipos	IgGM	IgG1	IgG1
Isotipos	IgG2a	IgG1	IgG1
Isotipos	IgG1	IgG1	IgG1
Isotipos	IgG2b	IgG1	IgG
αTCR	Vβ2	CD4	CD8
αTCR	Vβ3	CD4	CD8
αTCR	Vβ5	CD4	CD8
αTCR	Vβ6.1	CD4	CD8
αTCR	Vβ8.1	CD4	CD8
αTCR	Vβ11	CD4	CD8
αTCR	Vβ12	CD4	CD8
αTCR	Vβ13.1	CD4	CD8
αTCR	Vβ13.6.1	CD4	CD8
αTCR	Vβ14	CD4	CD8
αTCR	Vβ16	CD4	CD8
αTCR	Vβ17	CD4	CD8
αTCR	Vβ20.1	CD4	CD8
αTCR	Vβ21.3	CD4	CD8
αTCR	Vβ22	CD4	CD8

* Todos os tubos receberam 45 µl de salina

Tabela III: Anticorpos utilizados e especificações

ANTICORPO	CONJUGADO	CLONE	ISOTIPO	COMPANHIA
IgG1	FITC/PE/PreCP	VH2-3	-	BDIS-San Jose, CA, EUA
IgG2a	FITC/PE/PreCP	IF-2.1	-	BDIS-San Jose, CA, EUA
IgG2b	FITC	KX-23	-	Immunotech, westbrook, ME, EUA
IgGM	FITC	TYU.2	-	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α CD4	PE	RPA-T4	IgG1	BDIS-San Jose, CA, EUA
α CD8	FITC	RPA-T8	IgG1	BDIS-San Jose, CA, EUA
α CD8	PE	SK- 1	IgG1	BDIS-San Jose, CA, EUA
α CD8	PreCP	RPA-T8	IgG1	BDIS-San Jose, CA, EUA
α V β 2	FITC	E22E7-2	IgM	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 3	FITC	LE-89	IgG2a	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 5	FITC	ER-2	IgG1	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 6.1	FITC	CRI304-3	IgM	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 8	FITC	56C5	IgG2a	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 11	FITC	C21	IgG2a	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 12	FITC	VER2.32	IgG2a	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 13.1	FITC	JU-72	IgG2b	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 13.6	FITC	IMM-222	IgG2b	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 14	FITC	CA5L.1.3	IgG1	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 16	FITC	TAMA.1	IgG1	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 17	FITC	E17.5	IgG1	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 20	FITC	ELL1.4	IgG1	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 21.3	FITC	IG.125	IgG2a	Immunotech, westbrook, ME, EUA
α V β 22	FITC	IMM-546	IgG1	Immunotech, westbrook, ME, EUA

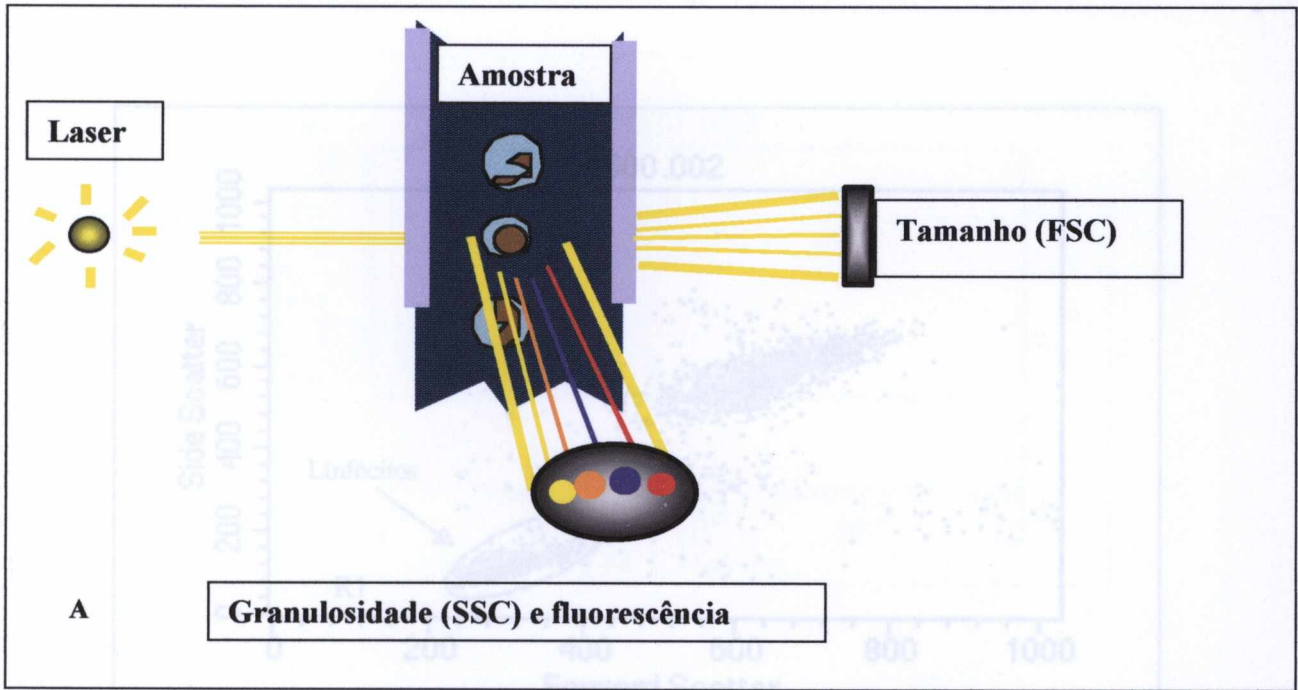


Figura 3: Parâmetros de aquisição: Tamanho (Forward Scatter) e Granulosidade (Side Scatter) para linfócitos humanos.

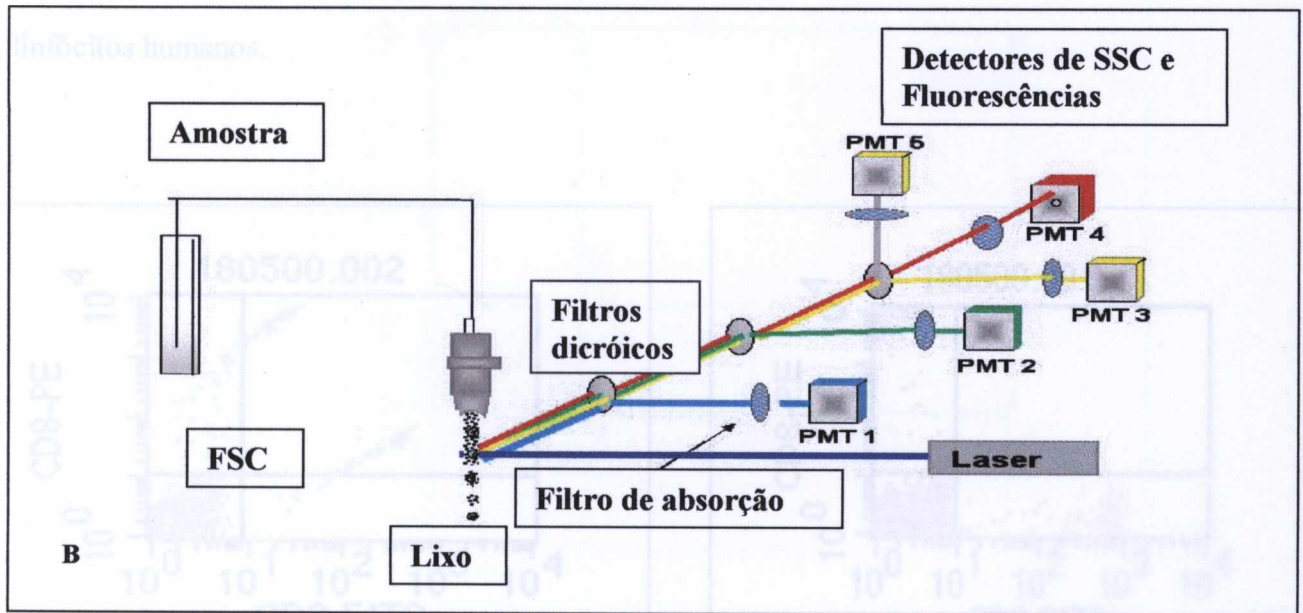


Figura 2: Esquema geral da citometria de Fluxo (A). Elementos constituintes de um Citômetro de Fluxo (B).

Figura 4: amostra não compensada (A). Amostra compensada (B).

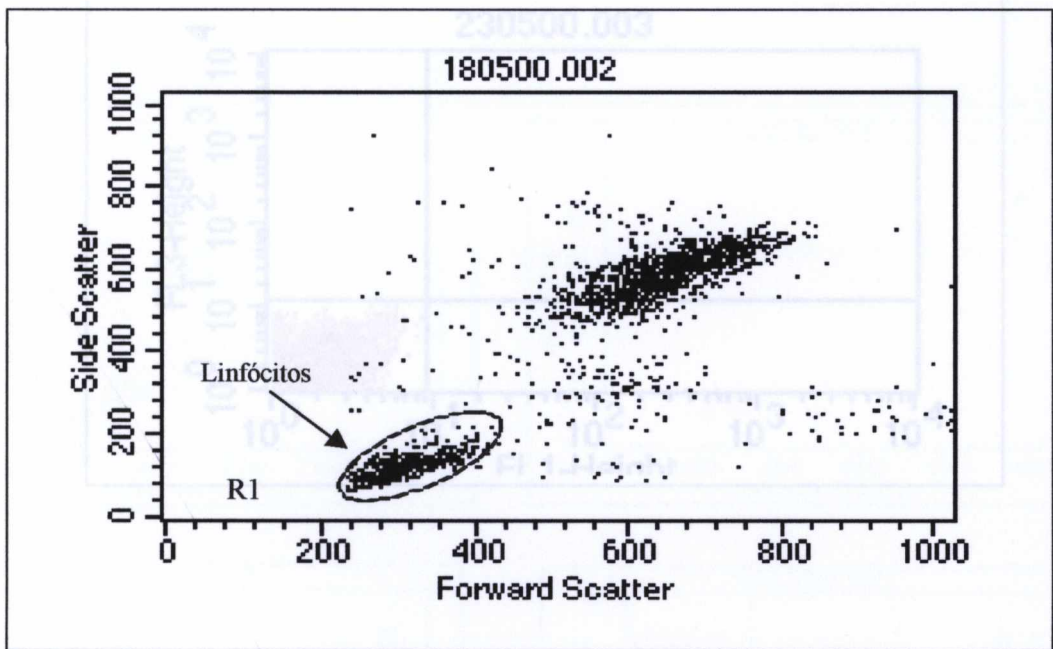


Figura 3: Aquisição de amostra não marcada.

Figura 3: Parâmetros de aquisição: Tamanho (Forward Scatter) e Granulosidade (Side Scatter) para linfócitos humanos.

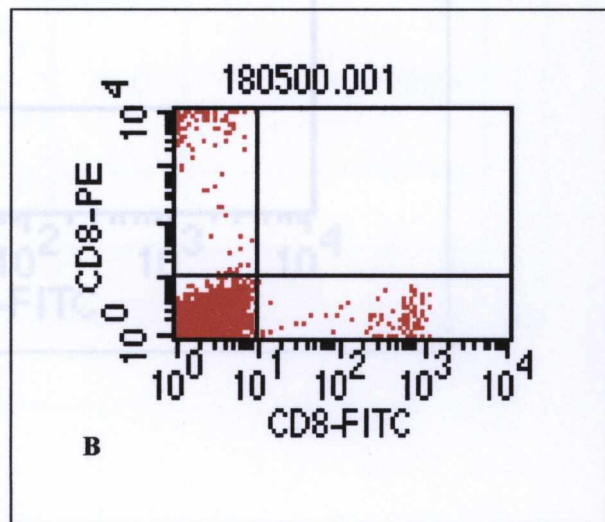
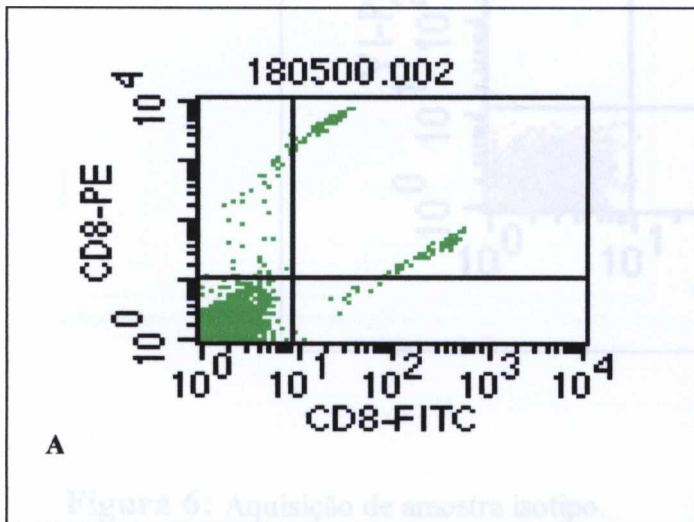


Figura 4: Aquisição de amostra isotipo.

Figura 4: Amostra não compensada (A). Amostra compensada (B).

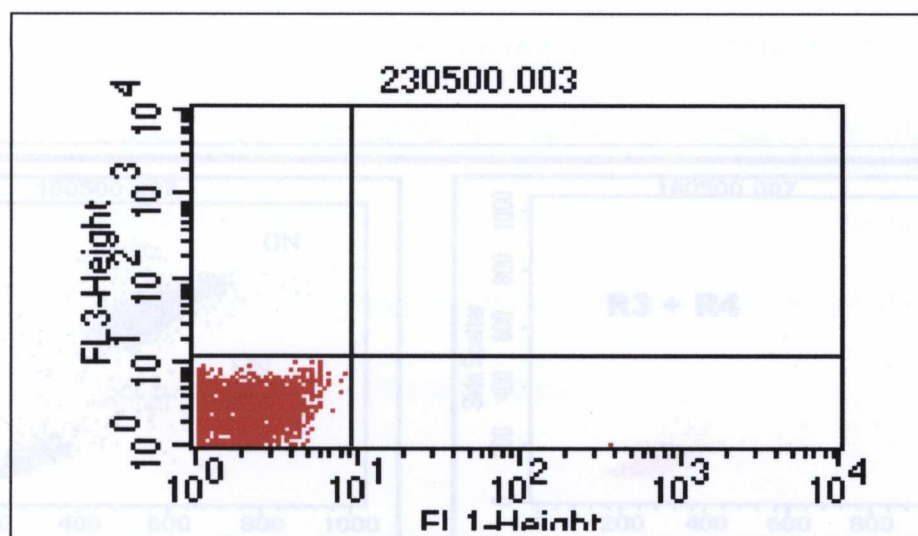


Figura 5: Aquisição de amostra não marcada.

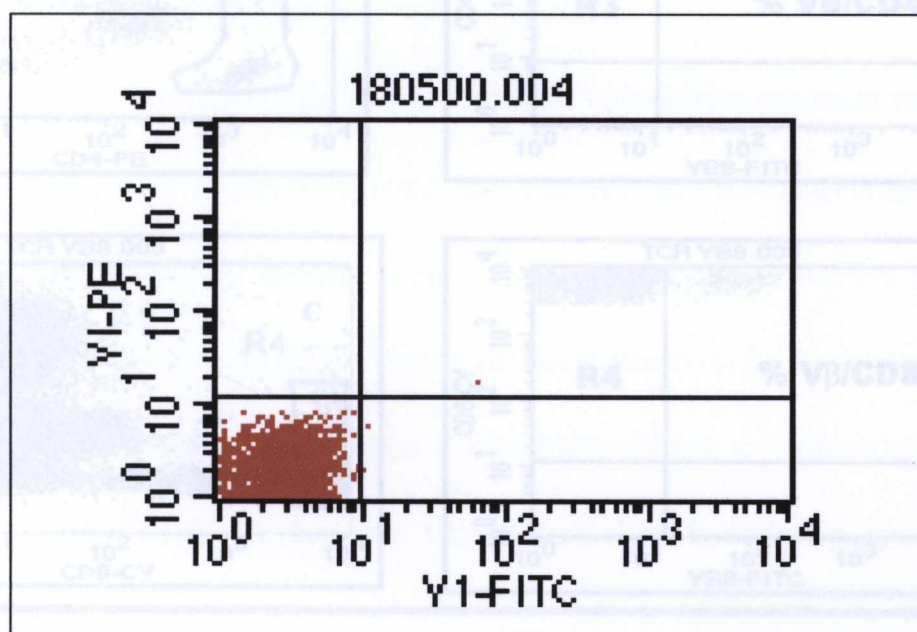


Figura 6: Aquisição de amostra isotipo.

Figura 7: Aquisição das amostras com marcação para CD4⁺, CD8⁺ e Vβs.

7. Considerações éticas

O uso e o destino do material e dados coletados durante este estudo foram utilizados exclusivamente nos experimentos descritos. O descarte do material

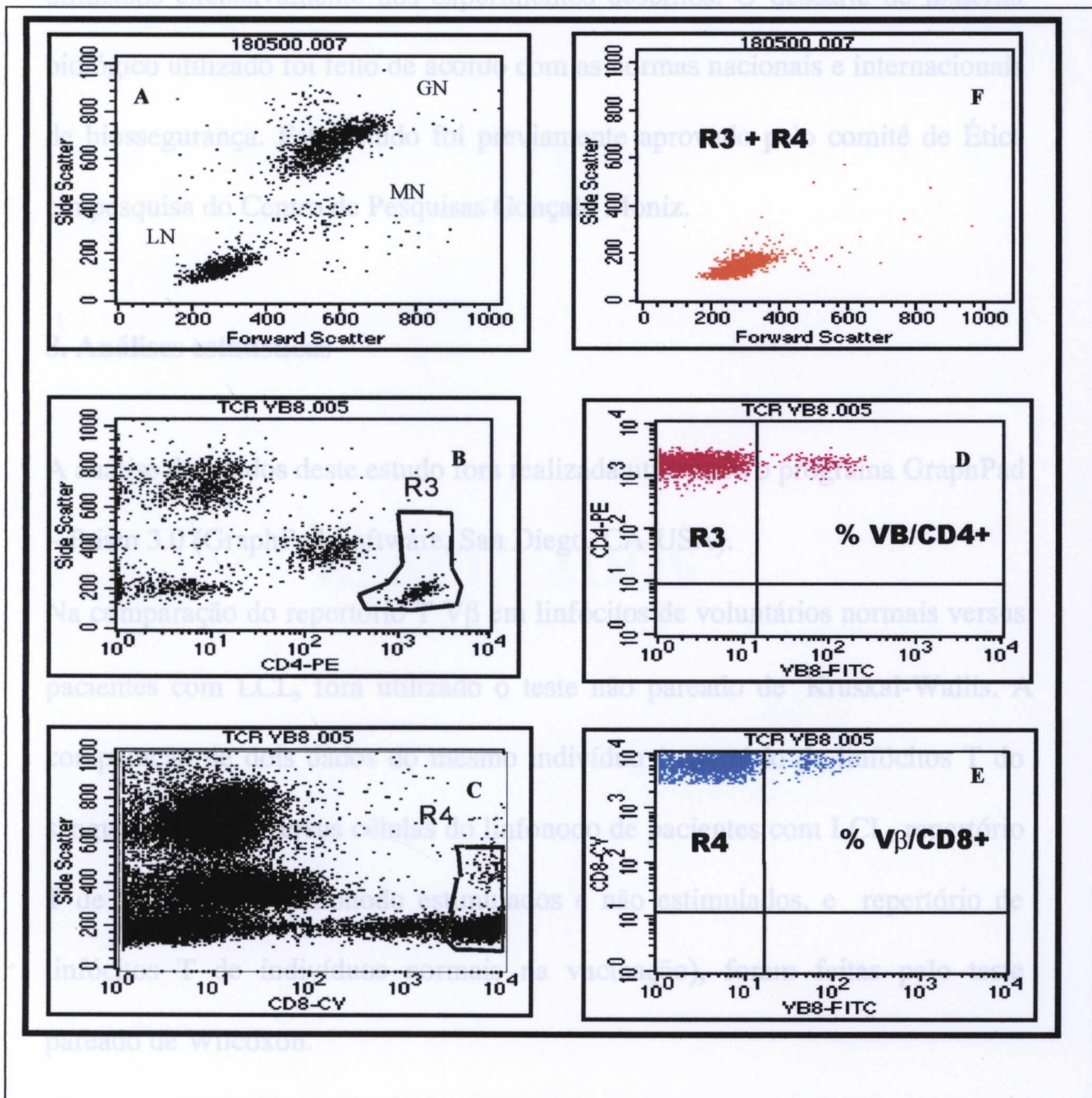


Figura 7: Aquisição das amostras com marcação para CD4⁺, CD8⁺ e Vβs.

7. Considerações éticas

O uso e o destino do material e dados coletados durante este estudo foram utilizados exclusivamente nos experimentos descritos. O descarte de material biológico utilizado foi feito de acordo com as normas nacionais e internacionais de biossegurança. Este estudo foi previamente aprovado pelo comitê de Ética em pesquisa do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz.

8. Análises estatísticas

A análise dos dados deste estudo fora realizada utilizando o programa GraphPad – Prism 3.0 (GraphPad Software, San Diego, CA-USA).

Na comparação do repertório T V β em linfócitos de voluntários normais versus pacientes com LCL, fora utilizado o teste não pareado de Kruskal-Wallis. A comparação de dois dados do mesmo indivíduo (repertório de linfócitos T do sangue periférico versus células do linfonodo de pacientes com LCL, repertório T de linfócitos do linfonodo estimulados e não estimulados, e repertório de linfócitos T de indivíduos normais na vacinação), foram feitas pelo teste pareado de Wilcoxon.

Os valores percentuais da expressão de cada V β , estudado em todos os indivíduos, estão apresentados nos resultados.

RESULTADOS

1. Comparação do repertório T V β em linfócitos de voluntários normais e de pacientes com LCL .

Comparamos o repertório V β das células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de 07 voluntários normais e de 09 pacientes com LCL, e os dados estão mostrados na Figura 4. A avaliação estatística pelo método de Kruskal-Wallis revelou redução da frequência de expressão de TCR V β 5 e 12 nas células T CD4⁺ dos pacientes de LCL (Figura 8A). Quanto às células T CD8⁺, houve expressão diminuída da expressão de V β 11, 12 13.1/13.6 e 16 nos pacientes de LCL (Figura 8B).

Figura 8A: Expressão do repertório V β em células T CD4⁺ de indivíduos normais (controle) e células de indivíduos com leishmaniose cutânea localizada (LCL).

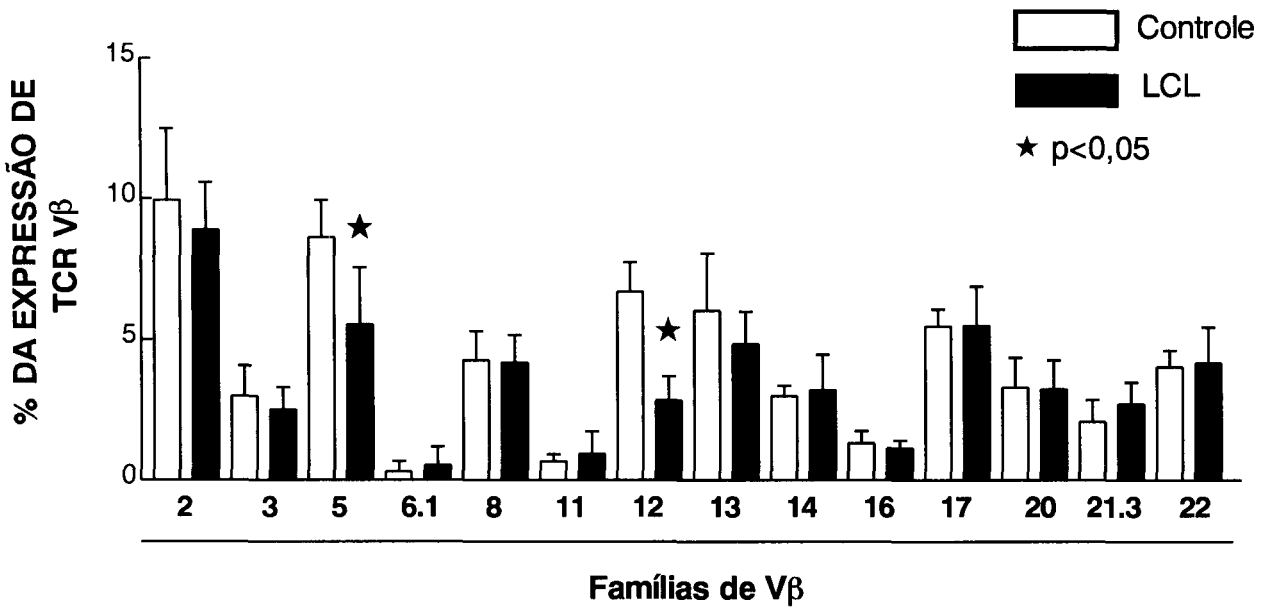
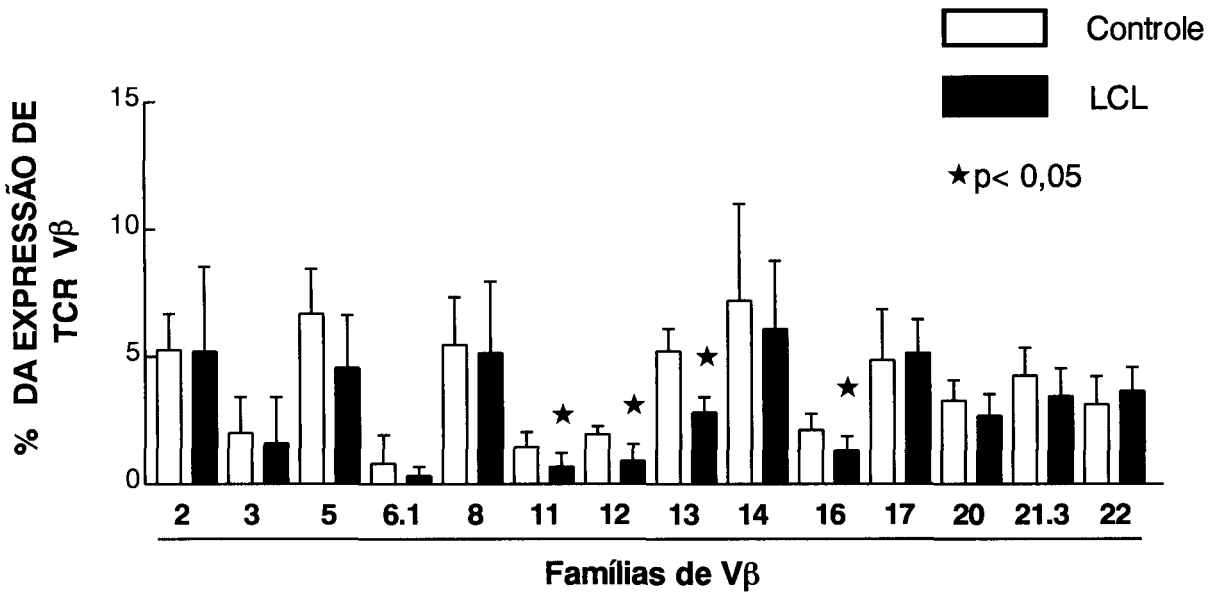


Figura 8B: Expressão do repertório V β em células T CD8⁺ de indivíduos normais (controle) e células de indivíduos com leishmaniose cutânea localizada (LCL).



2. Comparação do repertório V β de linfócitos T do sangue periférico e do linfonodo de pacientes LCL.

Comparamos o repertório V β das células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico e de células do linfonodo de 09 pacientes com LCL, e os dados estão mostrados na figura 9. A avaliação pelo método de Wilcoxon revelou não existir diferença estatisticamente significativa no repertório destas células entre as duas condições, em CD4⁺ (Figura 9A). Quanto às células CD8⁺, houve expressão aumentada de V β 12 e 16 e diminuição de V β 14 e 17 no linfonodo (Figura 9 B).

Figura 9A: Comparação da expressão do repertório T V β em CD4⁺, entre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) versus células mononucleares do linfonodo (LN) de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.

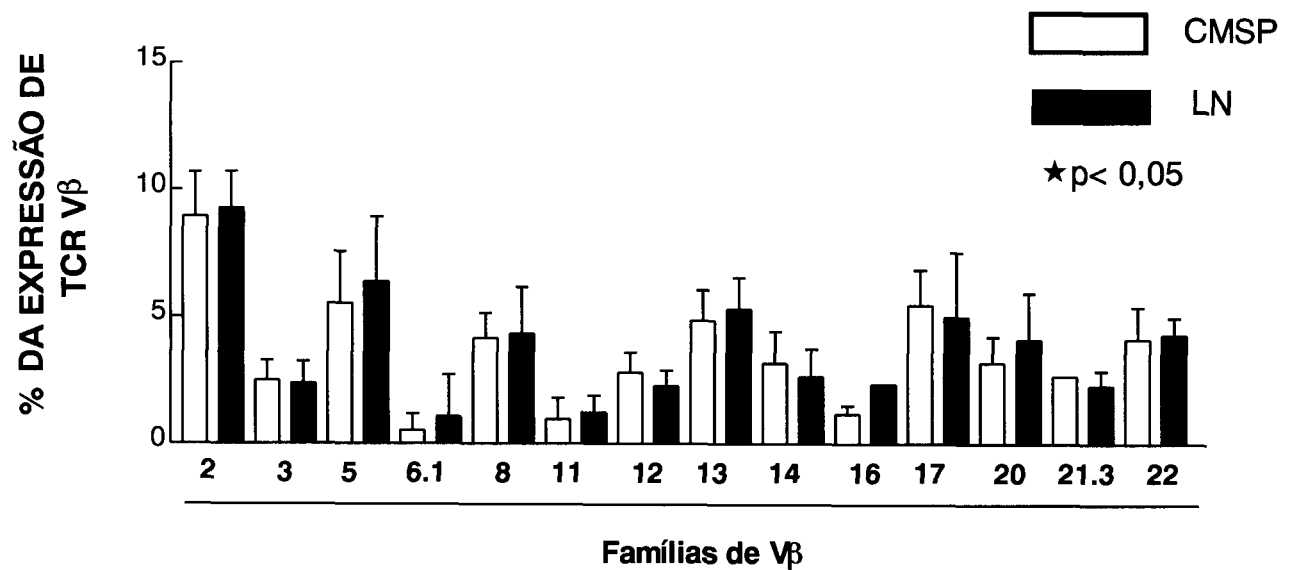
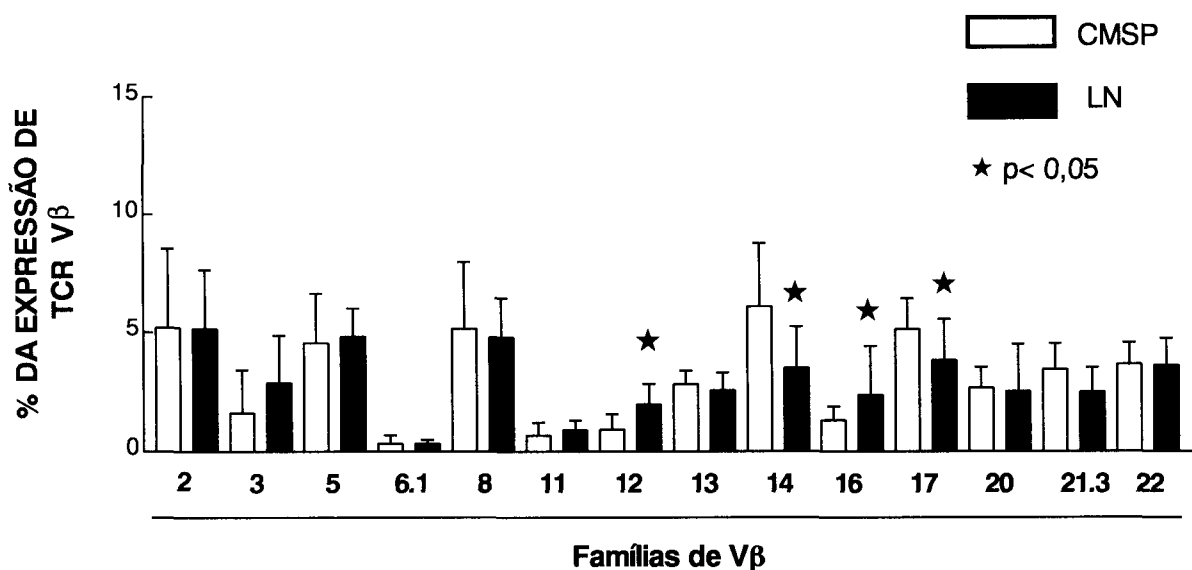


Figura 9B: Comparação da expressão do repertório T V β em CD8⁺, entre células mononucleares do sangue periférico (CMSP) versus células mononucleares do linfonodo (LN) de pacientes com leishmaniose cutânea localizada.



3. Comparação do repertório T V β de linfócitos do linfonodo de pacientes com LCL, estimulados com antígeno de *Leishmania* por 5 dias.

Comparamos o repertório V β das células T CD4⁺ e CD8⁺ estimuladas e não estimuladas, de 09 indivíduos com LCL, dados mostrados na figura 10. A avaliação pelo método estatístico de Wilcoxon revelou aumento da frequência de expressão de TCR V β 12, 13 e 16 e diminuição em 12 e 22 nas células CD4⁺ (Figura 10 A). Quanto as células CD8⁺, houve expressão aumentada de V β 12 e 14 e diminuição em V β 8, nas células estimuladas (Figura 10 B).

Figura 10A: Comparação da expressão do repertório T V β em CD4⁺, entre cultura de células mononucleares, cultivadas por 5 dias, estimuladas (Ag) e não estimuladas (meio) de pacientes com LCL.

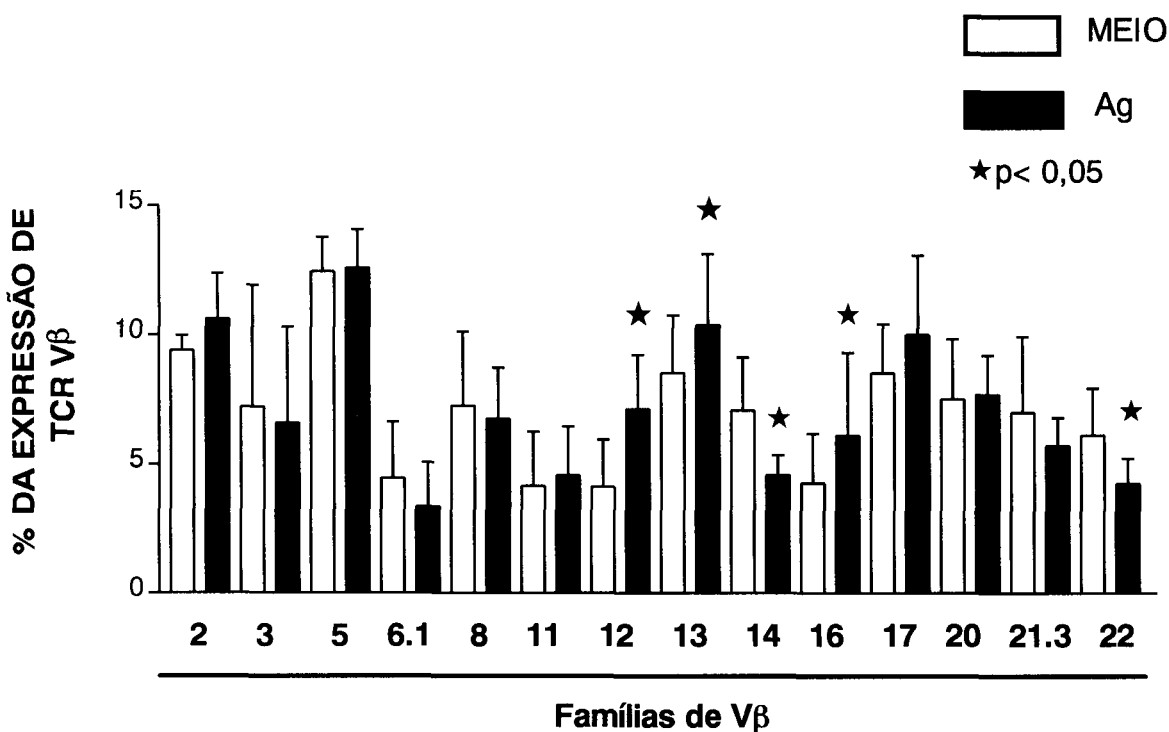
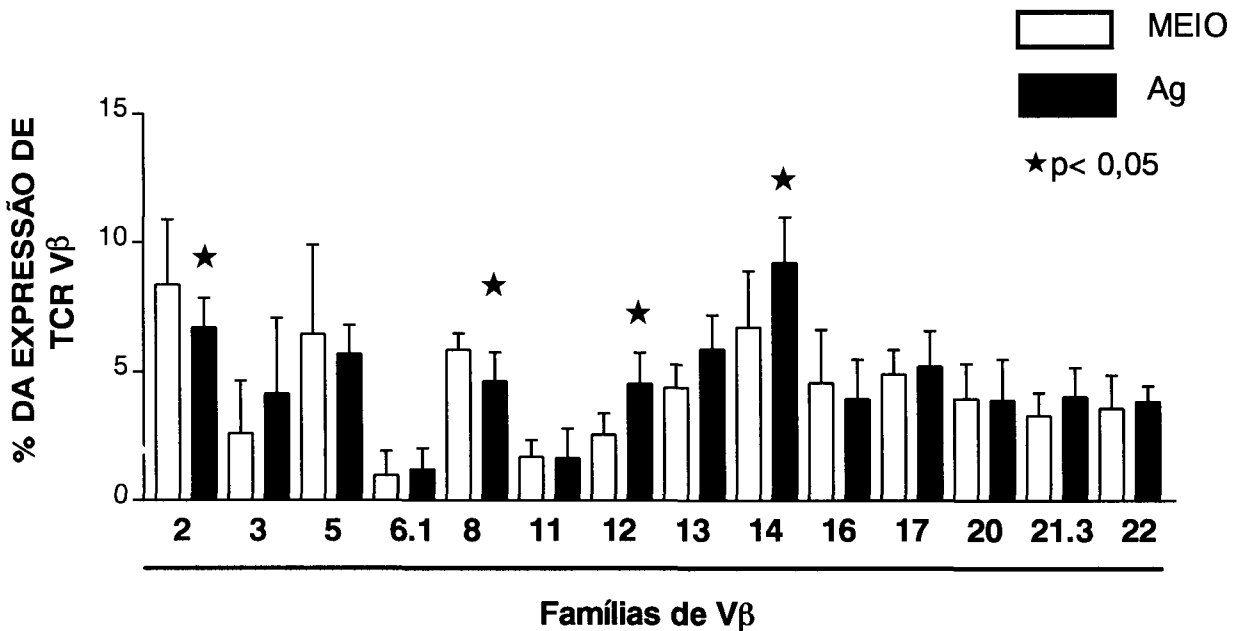


Figura 10B: Comparação da expressão do repertório T V β em CD8⁺, entre cultura de células mononucleares, cultivadas por 5 dias, estimuladas (Ag) e não estimuladas (meio) de pacientes com LCL.



4. Comparação do repertório V β de linfócitos T de voluntários normais na vacinação anti-leishmaniose.

Comparamos o repertório V β das células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de 07 voluntários normais antes e após 60 dias de imunização e os dados estão mostrados na Figura 11. A avaliação estatística pelo método de Wilcoxon, revelou aumento da frequência de expressão de TCR V β 6.1, 8, 12, 13, 14, 16, 20e 21.3 nas células CD4⁺ (Figura 11 A). Quanto às células CD8⁺, houve expressão aumentada de V β 12, 13.1/13.6 e 14 (Figura 11 B).

Figura 11A: Comparação de expressão do repertório T V β em CD4⁺, entre células mononucleares do sangue periférico de indivíduos voluntários a vacina anti-leishmaniose, comparando antes e 60 dias após imunização.

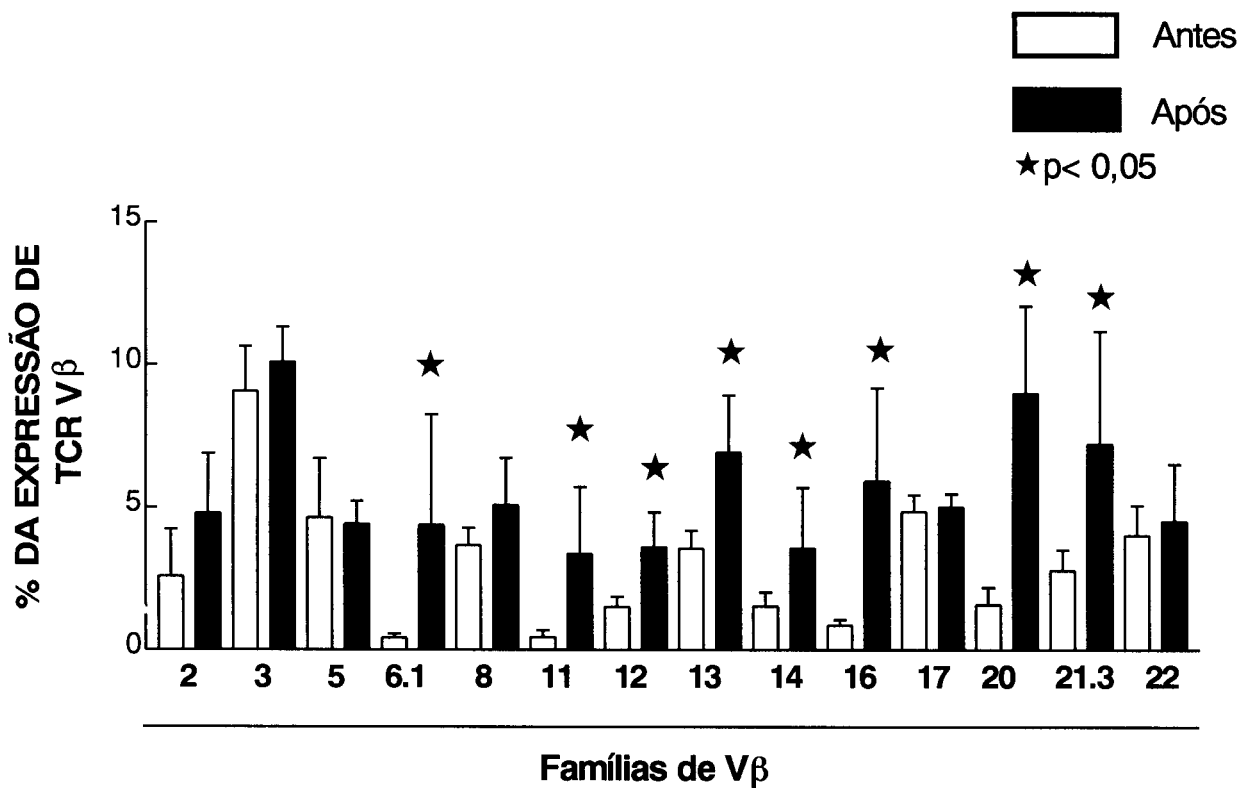


Figura 11B: Comparação de expressão do repertório T V β em CD8⁺, entre células mononucleares do sangue periférico de indivíduos voluntários a vacina anti-leishmaniose, comparando antes e 60 dias após imunização.

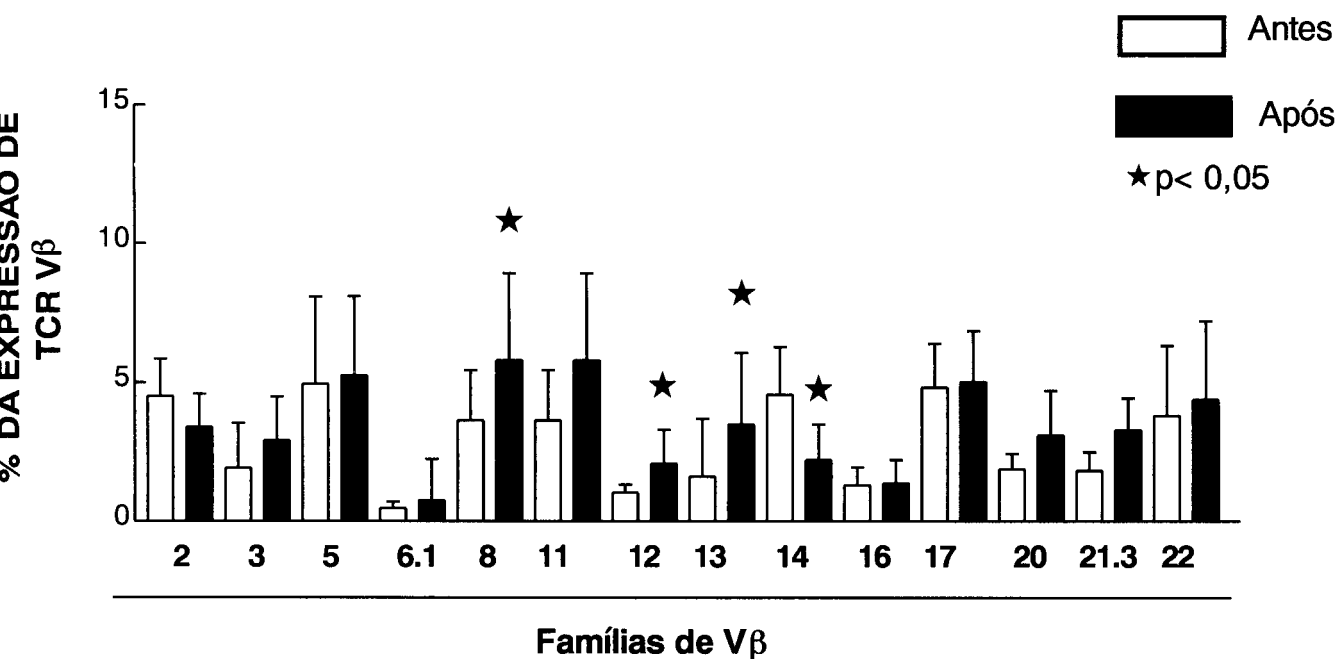


Tabela IV: Expressão do TCR V β 12 em linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺.

Condição	Vβ12: CD4⁺	Vβ12: CD8⁺
Célula T do sangue de pacientes com LCL¹	↓	↓
Células T do linfonodo de pacientes com LCL²	NS	↑
Células T do linfonodo de pacientes com LCL estimuladas³	↑	↑
Células T do sangue de indivíduos vacinados⁴	↑	↑

Expressão do gene V β 12 nos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ quando comparamos células mononucleares do sangue periférico de indivíduos doentes (LCL) com sadios da mesma área endêmica¹; quando comparamos células mononucleares do linfonodo com células mononucleares do sangue do mesmo paciente²; quando comparamos células mononucleares do linfonodo em cultivo estimuladas e não estimuladas³ e quando comparamos células mononucleares do sangue de indivíduos voluntários a vacina anti-leishmaniose, 60 dias após imunização versus antes da imunização⁴.

As setas indicam aumento ou diminuição percentual da expressão, e os valores estão com p<0.05. NS: Não significativo

DISCUSSÃO

No presente estudo foi realizada a caracterização *ex vivo* e *in vitro* da diversidade do repertório das células T (CD4⁺ e CD8⁺), avaliando a expressão dos genes V β do receptor da célula T (TCR), em pacientes com leishmaniose cutânea localizada (LCL) utilizando a citometria de fluxo. Para caracterizarmos a diversidade do repertório e observarmos se este estava sofrendo alguma modificação devido à presença da *Leishmania braziliensis*, causador da patologia em estudo, procedemos a várias comparações do repertório V β em diferentes situações após infecção, ou após estímulo antigênico específico.

Discutiremos primeiramente os resultados obtidos quando comparamos a expressão dos genes V β em células T CD4⁺ e CD8⁺ do sangue periférico de pacientes com LCL versus indivíduos sadios. Todos os indivíduos controles (sadios) utilizados nestes experimentos foram provenientes da mesma área endêmica dos pacientes, Corte de Pedra-Bahia. Estes indivíduos não tinham registro de leishmaniose anteriormente e normalmente eram familiares dos pacientes. Isto nos garantia uma uniformização geográfica, pois dados na literatura haviam mostrado que existem muitas diferenças no repertório, quando relacionados a populações geograficamente distintas e até na mesma população, provavelmente em consequência da diferença na origem genética (WANG et al, 1993, DE INOCENCIO et al, 1995, FREEDMAN et al, 1999). Pois não existia deleção V β clonal no repertório das

células T, nem superexpressão, que pudesse indicar uma ativação monoclonal ou superantigênica, tanto em CD4⁺ quanto em CD8⁺ (Figura 8 A e B). Todos os clones de Vβ estavam representados tanto nos indivíduos controles quanto nos indivíduos doentes. Observamos, porém, uma diminuição percentual, estatisticamente significativa, na expressão de Vβ5 e Vβ12 em células CD4⁺ e de Vβ 11, 12, 13.1/13.6 e 16 em células CD8⁺ nos indivíduos com LCL.

Vários trabalhos têm demonstrado que estímulos por superantígenos ou antígenos dominantes levam a uma grande proliferação de populações específicas, seguida de deleção (morte por super ativação) (GOLLOB et al, 1992, LI et al, 1999). Os resultados encontrados neste estudo não demonstraram este tipo de resposta imune. Os dados, à primeira vista, sugerem que estes clones podem estar associados ao desenvolvimento da resposta celular contra a infecção pela *L. braziliensis*. Esta diminuição percentual de células expressando estes Vβs no sangue pode ser explicada tanto por possível seqüestro em órgãos linfóides, como o linfonodo, ou nas lesões cutâneas, caracterizando uma resposta imune compartimentalizada.

A regionalização da resposta imune já havia sido descrita em lesões cardíacas, pela presença de grande quantidade de linfócitos T em relação ao sangue em pacientes chagásicos (REIS et al, 1993) e sugerida com uma diminuição de Vβ5 no sangue, em pacientes chagásicos agudos, quando comparados com indivíduos não

infectados (COSTA et al, 2000). Consideramos a hipótese de recrutamento para o linfonodo mais viável, pois estes pacientes ou ainda não apresentavam lesões cutâneas ou possuíam lesões mínimas e exibiam linfadenopatia regional, sendo este achado considerado um dos primeiros sinais da infecção por *Leishmania braziliensis* (BARRAL et al, 1995). Porém esta hipótese foi afastada pela ausência de diferença entre as células do linfonodo e as células presentes no sangue quanto à expressão do repertório V β . Então formulamos as seguintes hipóteses: (1) a ativação das células CD4⁺ comprometidas especificamente com a resposta anti-*Leishmania* no linfonodo já havia acontecido e, devido à migração celular, estas células teriam chegado a um equilíbrio em relação ao sangue e posteriormente se instalariam na lesão, (2) poderíamos estar com um grupo de pacientes com tempo de infecção bastante distinto e os que já estivessem com uma resposta compartimentalizada na lesão poderiam estar mascarando os resultados daqueles que estivessem com resposta compartimentalizada ainda no linfonodo.

VASSEUR et al, (1999), observando a expressão de V β 6 de camundongos, que é expresso em resposta a superantígenos bacterianos (SEB), em camundongos e comparando a expressão destas células em órgãos linfóides (linfonodo e baço) versus sangue periférico, constatou que existe uma grande proliferação inicial das células nestes órgãos, porém em torno de 48h estas células já estão circulando no sangue periférico. Aí então é observado um equilíbrio entre suas percentagens, até

fixarem-se no sítio da resposta inflamatória. Fazer o estudo das células da lesão não seria nosso objetivo, já que queríamos observar os eventos iniciais da infecção por *Leishmania braziliensis*, e também seria inviável através da citometria de fluxo, devido ao número reduzido de células. Como alternativa para avaliar esta questão poderíamos marcar estas células ao mesmo tempo com CD25 (receptor de IL-2) e V β , pois assim, perceberíamos quais as células que possuíam uma taxa de ativação superior.

Na análise do subtipo CD8⁺ detectamos um aumento estatisticamente significativo na expressão de V β 12 e 16 no linfonodo em relação ao sangue, que por sua vez estavam diminuídos no sangue de indivíduos com LCL, quando comparamos com indivíduos sadios. Podemos supor, assim, que a proliferação de tais células ocorre, provavelmente, em resposta à *Leishmania braziliensis*.

UYEMAMURA et al, 1993, estudando a diversidade do repertório através da técnica do PCR, que a expressão de T V β nos subtipos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é bastante distinta em células do sangue e células das lesões de pacientes com LCL. Nas lesões mais recentes predominam células CD4⁺, enquanto em lesões mais antigas predominam células CD8⁺. Estes dados reforçam nossa hipótese de que realmente a proliferação de células CD4⁺ se dá antes das CD8⁺ no linfonodo,

que é o sítio de apresentação de antígeno, ativação, proliferação e fonte de células específicas que migrarão para a lesão, chegando primeiro as células CD4⁺ depois as CD8⁺.

Com o objetivo de amplificar uma população celular específica para antígeno de *Leishmania braziliensis* e eliminar influências de respostas imunes não específicas, células do linfonodo de pacientes com LCL foram cultivadas com antígeno bruto de *Leishmania* por 5 dias e comparadas com células dos mesmos pacientes cultivadas sem estímulo. Verificamos então um aumento na expressão de Vβ12, 13 e 16 no subtipo CD4⁺ e um aumento de Vβ12 e 14 em CD8⁺. Para o subtipo CD8⁺ encontramos mais uma vez a expressão de Vβ12 aumentada, demonstrando uma responsividade para os antígenos de *Leishmania*, porém não sabemos explicar porque existiu maior expressão também de Vβ14, quando esperávamos um aumento de Vβ16.

Com estes resultados sugerimos então que *in vitro*, na presença de antígenos de *Leishmania*, existe uma ativação oligoclinal tanto dos linfócitos CD4⁺ quanto CD8⁺, rejeitando qualquer hipótese de presença de peptídeos dominantes ou superantígenos na *Leishmania braziliensis*. Estes dados estão de acordo com os encontrados por UYEMURA et al, (1993) em leishmaniose, por YAMAZAKI et al, (1996) em periodontite, e por FREEDMAM et al, (1999) em filariose, e divergem

dos encontrados por COSTA et al, (1999) em doença de Chagas humana e LAUNOIS et al, 1996, em leishmaniose experimental, pois estes autores encontraram expressão de determinados V β s com valores percentuais elevados (>40%) sugerindo existir determinantes superantigênicos ou peptídeos dominantes.

O achado de uma expansão oligoclonal linfocitária na leishmaniose humana foi reforçado com os resultados da expressão do TCR V β no sangue de indivíduos submetidos à vacinação anti-*Leishmania*. Neste estudo, comparamos o repertório dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ antes e 60 dias após a imunização e constatamos que os indivíduos tiveram uma grande expressão estatisticamente significativa de diferentes V β s em CD4⁺ depois dos 60 dias. Podemos destacar que os antígenos presentes na vacina foram capazes de uma ativação de vários subtipos de V β s. Entre as células CD8⁺ esta expressão foi mais restrita,. Estes dados confirmam a hipótese de uma ativação oligoclonal para ambos os subtipos de células T CD4⁺ e CD8⁺.

Estes dados são de grande relevância, pois indicam que os antígenos presentes na vacina são capazes de ativação em células T, o que é imprescindível para estabelecer mecanismos de imunização. Paralelos a isto foram realizados em nosso laboratório experimentos que demonstraram alto percentual de expressão de CD25

(receptor de IL-2) e CD45RO (memória imunológica) nas células T CD4⁺ e CD8⁺ dos voluntários à vacinação após 60 dias. Porém não sabemos os tipos de TCR Vβs expandidos especificamente nas células T (CD25⁺/CD45RO⁺) nem se estas células realmente estão envolvidas na proteção imune, para isto necessitaríamos de um estudo funcional aprofundado.

Um achado importante neste nosso estudo foi a variação na expressão de Vβ12 nas células CD4⁺ e CD8⁺. A sua expressão estava aumentada em células CD4⁺ quando comparamos células T do sangue periférico entre indivíduos com LCL e controles e não foi significativa na comparação entre células do linfonodo versus sangue. Estes dados estão de acordo com nossa hipótese de que a metodologia aplicada neste momento não foi capaz de detectar diferenças na expressão de Vβs em CD4⁺ devido possivelmente ao tempo de infecção dos pacientes, já discutido anteriormente. Porém em CD8⁺ foi observado uma diminuição destas células (Vβ12) no sangue de indivíduos com LCL e aumento no linfonodo, concordando com o perfil de compartimentalização esperado. Quanto aos experimentos *in vitro*, encontramos valores elevados de Vβ12 tanto para células CD4⁺ quanto CD8⁺ e também aumentados quando avaliamos sua expressão nos indivíduos vacinados. Com isto sugerimos que estas células podem ter um papel funcional diferenciado na infecção por *Leishmania braziliensis* e que o seu balanço proporcional

CD4⁺/CD8⁺, quanto ao perfil de citocinas produzido, poderia estar influenciando na instalação da resposta inflamatória, levando a uma cura espontânea dos pacientes no caso de prevalecer uma resposta TH1 ou favorecendo a doença no caso de prevalecer uma resposta TH2. Para avaliar esta questão teríamos que isolar estas células e realizar testes funcionais específicos.

Não encontramos registro na literatura do envolvimento de células T Vβ12 relacionado com alguma patologia específica. UYEMAMURA et al, (1993) encontraram expansão de Vβ6 nas lesões de pacientes com leishmaniose cutânea, associando como sendo respondedoras para antígenos de *Leishmania braziliensis*, porém sugerimos que isto se deve à presença de antígenos bacterianos nestas lesões, já que a expressão de Vβ6 está associada à presença de superantígenos bacterianos. Expansão preferencial foi encontrada em outras patologias, como a de Vβ14 e 24 em pacientes com filariose (FREDMAM et al, 1999) e Vβ4/Vα8 para leishmaniose murina (REINER e LOCKSLEY, 1993, 1994 e 1997).

Muitos pontos a respeito dos mecanismos envolvidos entre o hospedeiro humano e a *Leishmania braziliensis* ainda precisam ser esclarecidos, principalmente se considerarmos a complexidade das interações parasito/hospedeiro, a diversidade genética existente entre as populações e a interação com o ambiente. Por isto acreditamos que novos conhecimentos são de grande relevância para se explicar

alguns pontos, sedimentar outros já existentes e abrir novas direções para esclarecer melhor as causas e consequências das inúmeras doenças parasitárias existentes, como as leishmanioses.

CONCLUSÕES

Nossos dados sugerem:

- Expressão oligoclonal tanto para CD4⁺ quanto CD8⁺, peptídica preferencial, não dominante nem superantigênica em pacientes com leishmaniose cutânea localizada;
- Identificação da presença de uma resposta compartimentalizada no linfonodo em relação ao sangue periférico nos pacientes com LCL, somente em células T CD8⁺;
- Expressão diferencial no repertório V β nos diferentes tipos de células T, porém, não apresentando nenhuma deleção nem hiper reatividade clonal frente a *Leishmania braziliensis*;
- Ativação oligoclonal das células T após 60 dias de imunização com vacina anti-leishmaniose nas células CD4⁺ e CD8⁺;
- Expressão diferencial de TCR V β 12 indicando ser o mais relacionado à infecção causada pela *Leishmania braziliensis*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AFONSO, L. C. & SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect Immun**, **61**: 2952-2959., 1993.

ANTUNES, C. M.; MAYRINK, W.; MAGALHAES, P. A.; COSTA, C. A.; MELO, M. N.; DIAS, M.; MICHALICK, M. S.; WILLIAMS, P.; LIMA, A. O.; VIEIRA, J. B. & ET AL. Controlled field trials of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis. **Int J Epidemiol**, **15**: 572-580, 1986.

AZADEH, B. "Localized" leishmania lymphadenitis: a light and electron microscopic study. **Am J Trop Med Hyg**, **34**: 447-455., 1985.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. & ET AL. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **Am J Trop Med Hyg**, **44**: 536-546., 1991.

BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M.; ALMEIDA, R.; DE JESUS, A. R.; GRIMALDI JUNIOR, G.; NETTO, E. M.; SANTOS, I.; BACELLAR, O. & CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. **Am J Trop Med Hyg**, **47**: 587-592., 1992.

BARRAL, A.; GUERREIRO, J.; BOMFIM, G.; CORREIA, D.; BARRAL-NETTO, M. & CARVALHO, E. M. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. **Am J Trop Med Hyg**, **53**: 256-259., 1995.

BARRAL, A.; TEIXEIRA, M.; REIS, P.; VINHAS, V.; COSTA, J.; LESSA, H.; BITTENCOURT, A. L.; REED, S.; CARVALHO, E. M. & BARRAL-NETTO, M. Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis.**Am J Pathol**, **147**: 947-954., 1995.

BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; CARVALHO, E. M. & REED, S. G. Cytotoxicity in human mucosal and cutaneous leishmaniasis.**Parasite Immunol**, **17**: 21-28., 1995.

BIERER, B. E.; SLECKMAN, B. P.; RATNOFSKY, S. E. & BURAKOFF, S. J. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T-cell activation.**Annu Rev Immunol**, **7**: 579-599, 1989.

BJORKMAN, P. J.; SAPER, M. A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W. S.; STROMINGER, J. L. & WILEY, D. C. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens.**Nature**, **329**: 512-518., 1987.

BROWN, D. R.; SWIER, K.; MOSKOWITZ, N. H.; NAUJOKAS, M. F.; LOCKSLEY, R. M. & REINER, S. L. T helper subset differentiation in the absence of invariant chain.**J Exp Med**, **185**: 31-41., 1997.

CARDONI, R. L.; ANTUNEZ, M. I.; ORN, A. & GRONVIK, K. O. T cell receptor V beta repertoire in the thymus and spleen of mice infected with *Trypanosoma cruzi*.**Cell Immunol**, **169**: 238-245., 1996.

CARVALHO, E. M.; JOHNSON, W. D.; BARRETO, E.; MARSDEN, P. D.; COSTA, J. L.; REED, S. & ROCHA, H. Cell mediated immunity in American cutaneous and mucosal leishmaniasis. **J Immunol**, **135** : 4144-4148., 1985.

COFFMAN, R. L.; SHRADER, B.; CARTY, J.; MOSMANN, T. R. & BOND, M. W. A mouse T cell product that preferentially enhances IgA production. I. Biologic characterization. **J Immunol**, **139**: 3685-3690., 1987.

COSTA, R. P.; GOLLOB, K. J.; FONSECA, L. L.; ROCHA, M. O.; CHAVES, A. C.; MEDRANO-MERCADO, N.; ARAUJO-JORGE, T. C.; & DUTRA, W. O. T-cell repertoire analysis in acute and chronic human Chagas' disease: differential frequencies of Vbeta5 expressing T cells. **Scand J Immunol**, **51**: 511-519., 2000.

COUTINHO, S. G.; OLIVEIRA, M. P.; DA-CRUZ, A. M.; DE LUCA, P. M.; MENDONCA, S. C.; BERTHO, A. L.; SOONG, L. & MCMAHON-PRATT, D. 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**: 144-155., 1996.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N. & KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J Clin Invest**, **98**: 1709-1712., 1996.

DAVIES, T. F.; MARTIN, A.; CONCEPCION, E. S.; GRAVES, P.; COHEN, L. & BEN-NUN, A. Evidence of limited variability of antigen receptors on intrathyroidal T cells in autoimmune thyroid disease. **N Engl J Med**, **325**: 238-244., 1991.

DAVIS, M. M. T-cell receptors. Serial engagement proposed. **Nature**, **375**: 104., 1995.

DE INOCENCIO, J.; CHOI, E.; GLASS, D. N. & HIRSCH, R. T cell receptor repertoire differences between African Americans and Caucasians associated with polymorphism of the TCRBV3S1 (V beta 3.1) gene. **J Immunol**, **154**: 4836-4841., 1995.

DENKERS, E. Y.; CASPAR, P. & SHER, A. *Toxoplasma gondii* possesses a superantigen activity that selectively expands murine T cell receptor V beta 5-bearing CD8+ lymphocytes. **J Exp Med**, **180**: 985-994., 1994.

DOHERTY, D. G.; VAUGHAN, R. W.; DONALDSON, P. T. & MOWAT, A. P. HLA DQA, DQB, and DRB genotyping by oligonucleotide analysis: distribution of alleles and haplotypes in British caucasoids. **Hum Immunol**, **34**: 53-63., 1992.

FITZGERALD, J. E.; RICALTON, N. S.; MEYER, A. C.; WEST, S. G.; KAPLAN, H.; BEHRENDT, C. & KOTZIN, B. L. Analysis of clonal CD8+ T cell expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. **J Immunol**, **154**: 3538-3547., 1995.

FOWLKES, B. J. & PARDOLL, D. M. Molecular and cellular events of T cell development. **Adv Immunol**, **44**: 207-264, 1989.

GAMBON-DEZA, F.; PACHECO CARRACEDO, M.; CERDA MOTA, T. & MONTES SANTIAGO, J. Lymphocyte populations during tuberculosis infection: V beta repertoires. **Infect Immun**, **63**: 1235-1240., 1995.

GOLLOB, K. J. & PALMER, E. Divergent viral superantigens delete V beta 5+ T lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **89**: 5138-5141., 1992.

ISAZA, D. M.; RESTREPO, M.; RESTREPO, R.; CACERES-DITTMAR, G. & TAPIA, F. J. Immunocytochemical and histopathologic characterization of lesions from patients with localized cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis*. **Am J Trop Med Hyg**, **55**: 365-369., 1996.

JASON, J.; INGE, K. L. & ORLOFF, S. L. HIV antigens and T-cell receptor variable beta chain families. **Scand J Immunol**, **45**: 81-90., 1997.

LAUNOIS, P.; MAILLARD, I.; PINGEL, S.; SWIHART, K. G.; XENARIOS, I.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R. M.; MACDONALD, H. R. & LOUIS, J. A. IL-4 rapidly produced by V beta 4 V alpha 8 CD4+ T cells instructs Th2 development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **Immunity**, **6**: 541-549., 1997.

LEITE-DE-MORAES, M. C.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; MINOPRIO, P.; EISEN, H. & BANDEIRA, A. Skewed V beta TCR repertoire of CD8+ T cells in murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Int Immunol**, **6**: 387-392., 1994.

LINSLEY, P. S. & LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during T cell responses to antigen. **Annu Rev Immunol**, **11**: 191-212, 1993.

LOHOFF, M.; STEINERT, M.; WEISS, A.; ROLLINGHOFF, M.; BALDERAS, R. S. & THEOFILOPOULOS, A. N. V beta gene repertoires in T cells expanded in local self-healing and lethal systemic murine cutaneous leishmaniasis. **Eur J Immunol**, **24**: 492-495., 1994.

MAYRINK, W.; GENARO, O.; SILVA, J. C.; DA COSTA, R. T.; TAFURI, W. L.; TOLEDO, V. P.; DA SILVA, A. R.; REIS, A. B.; WILLIAMS, P. & DA COSTA, P. W. Phase I and II open clinical trials of a vaccine against *Leishmania chagasi* infections in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, **91**: 695-697., 1996.

MENDONCA, S. C.; DE LUCA, P. M.; MAYRINK, W.; RESTOM, T. G.; CONCEICAO-SILVA, F.; DA-CRUZ, A. M.; BERTHO, A. L.; DA COSTA, C. A.; GENARO, O.; TOLEDO, V. P. & ET AL. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, **53**: 195-201., 1995.

MOEBIUS, U.; MANNS, M.; HESS, G.; KOBER, G.; MEYER ZUM BUSCHENFELDE, K. H. & MEUER, S. C. T cell receptor gene rearrangements of T lymphocytes infiltrating the liver in chronic active hepatitis B and primary biliary cirrhosis (PBC): oligoclonality of PBC-derived T cell clones.**Eur J Immunol**, **20**: 889-896., 1990.

NITTA, T.; OKSENBERG, J. R.; RAO, N. A. & STEINMAN, L. Predominant expression of T cell receptor V alpha 7 in tumor-infiltrating lymphocytes of uveal melanoma.**Science**, **249**: 672-674., 1990.

OKSENBERG, J. R.; STUART, S.; BEGOVICH, A. B.; BELL, R. B.; ERLICH, H. A.; STEINMAN, L. & BERNARD, C. C. Limited heterogeneity of rearranged T-cell receptor V alpha transcripts in brains of multiple sclerosis patients.**Nature**, **353**: 94., 1991.

REINER, S. L. & LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis.**J Cell Biochem**, **53**: 323-328., 1993.

REINER, S. L.; WANG, Z. E.; HATAM, F.; SCOTT, P. & LOCKSLEY, R. M. TH1 and TH2 cell antigen receptors in experimental leishmaniasis.**Science**, **259**: 1457-1460., 1993.

REINER, S. L.; FOWELL, D. J.; MOSKOWITZ, N. H.; SWIER, K.; BROWN, D. R.; BROWN, C. R.; TURCK, C. W.; SCOTT, P. A.; KILLEEN, N. & LOCKSLEY, R. M. Control of *Leishmania major* by a monoclonal alpha beta T cell repertoire.**J Immunol**, **160**: 884-889., 1998.

REIS, D. D.; GAZZINELLI, R. T.; GAZZINELLI, G. & COLLEY, D. G. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. **J Immunol**, **150**: 1611-1618., 1993.

RIBEIRO-DE-JESUS, A.; ALMEIDA, R. P.; LESSA, H.; BACELLAR, O. & CARVALHO, E. M. Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Braz J Med Biol Res**, **31**: 143-148., 1998.

TROYE-BLOMBERG, M.; FOGDELL, A.; EL-GHAZALI, G.; LARSSON, A.; KING, M. H.; SISAY-JOOF, F.; OLERUP, O.; GRUNEWALD, J. & JEPSON, A. Analysis of the T-cell receptor V beta usage in monozygotic and dizygotic twins living in a *Plasmodium falciparum* endemic area in west Africa. **Scand J Immunol**, **45**: 541-545., 1997.

UYEMURA, K.; PIRMEZ, C.; SIELING, P. A.; KIENE, K.; PAES-OLIVEIRA, M. & MODLIN, R. L. CD4+ type 1 and CD8+ type 2 T cell subsets in human leishmaniasis have distinct T cell receptor repertoires. **J Immunol**, **151**: 7095-7104., 1993.

VASSEUR, F.; LE CAMPION, A.; PAVLOVITCH, J. H. & PENIT, C. Distribution of cycling T lymphocytes in blood and lymphoid organs during immune responses. **J Immunol**, **162**: 5164-5172., 1999.

WANG, Z. E.; ZHENG, S.; CORRY, D. B.; DALTON, D. K.; SEDER, R. A.; REINER, S. L. & LOCKSLEY, R. M. Interferon gamma-independent effects of interleukin 12 administered during acute or established infection due to *Leishmania major*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, **91**: 12932-12936., 1994.

YAMAZAKI, K.; NAKAJIMA, T.; GEMMELL, E.; KJELDSSEN, M.; SEYMOUR, G. J. & HARA, K. Biased expression of T cell receptor V beta genes in periodontitis patients. **Clin Exp Immunol**, **106**: 329-335., 1996.