

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**Avaliação do Papel das Células T CD8⁺ na Infecção Experimental
por *Leishmania braziliensis*.**

FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS

Orientadora: Camila Indiani de Oliveira

**Tese apresentada para a obtenção
do grau de Doutor em Patologia
Experimental**

Salvador-Bahia-Brasil

2011

AVALIAÇÃO DO PAPEL DAS CÉLULAS T CD8⁺ NA INFECÇÃO EXPERIMENTAL

POR *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*.

FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS

**FOLHA DE APROVAÇÃO
COMISSÃO EXAMINADORA**

AGRADECIMENTOS

À Dra. Camila Indiani de Oliveira por todos esses anos de orientação, paciência e dedicação.

Ao Dr. Phillip Scott por me receber em seu laboratório e me desafiar diariamente.

À Dra. Aldina Barral e Dr. Manoel Barral-Netto por terem me mostrado um novo caminho.

À Dra. Cláudia Brodskyn e Valéria Borges pelas sugestões valiosas.

Ao Dr. Michael Goldschmidt pela contribuição com as análises histológicas.

Tenho muito a agradecer a Elze e Andrezza por fazerem tudo funcionar e serem sempre muito competentes.

Todo o meu amor e carinho aos estudantes do presente e passado do LIP e LIM1. Foram 10 anos de aprendizado, muitas risadas e amigos para toda a vida. Jamais vou ser capaz de agradecer as coisas valiosas que recebi desses laboratórios.

Aos funcionários da Escola de Veterinária da Universidade da Filadélfia e aos estudantes do Scott's Lab pelo aprendizado diário. Alguns em especial pela amizade que fizeram os meus dias mais divertidos: Claudia, Daniel, Anna e Ba.

À minha família que se orgulha e entende a minha ausência em muitos momentos. Eu amo muito vocês.

À família que eu ganhei de presente: Stefan, Sara, Hector, Cornelia, Martha, Brian, Garth, Dagmar e Vera. O carinho e apoio que eu recebi foi fundamental.

Aos melhores amigos que alguém pode querer: Marina, Rodrigo, Ana Beatriz, Cristiano e Alistair. Eu tenho muita sorte de ter vocês na minha vida.

Aos professores da pós-graduação e funcionários do CPqGM, em especial aos funcionários do biotério e da pós-graduação.

Às agências financiadoras: CAPES, CNPq e NIH.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
1.1 A leishmaniose.....	11
1.2 Modelos experimentais de Leishmaniose tegumentar.....	12
1.3 Características gerais dos linfócitos T CD8+.....	15
2 JUSTIFICATIVA.....	21
3 OBJETIVO GERAL.....	22
3.1 Objetivos específicos.....	22
4 DESENHO EXPERIMENTAL.....	23
5 MATERIAS E MÉTODOS.....	24
5.1 Parasitas e antígenos.....	24
5.10 Proliferação e produção de citocinas após re-estimulação in vitro.....	27
5.11 Análise estatística.....	27
5.2 Camundongos.....	24
5.3 Infecção intradérmica.....	24
5.4 Preparação dos tecidos para carga parasitária e citometria de fluxo.....	24
5.5 Determinação da carga parasitária.....	25
5.6 Citometria de fluxo.....	25
5.6.1 Linfócitos.....	25
5.6.1 Monócitos e neutrófilos.....	26
5.7 Análise histológica.....	26
5.8 Purificação e transferência de linfócitos T CD8+ e T CD4+.....	26
5.9 Depleção de linfócitos T CD8+ e T CD4+.....	27
6 RESULTADOS.....	29
6.1 Resposta imune celular no sítio de inoculação da <i>L. braziliensis</i>	29
6.10 Avaliação de marcadores intracelulares em linfócitos T CD8+ em camundongos RAG-/- , após a transferência de linfócitos.....	54
6.11 Avaliação de marcadores intracelulares em linfócitos T CD4+ após a transferência de linfócitos para camundongos RAG-/-.....	57
6.12 Tamanho da lesão em camundongos RAG-/- que receberam linfócitos T CD8+ provenientes de animais deficientes em IFN- γ ou em perforina.....	58
6.13 Carga parasitária em camundongos RAG-/- que receberam linfócitos T CD8+ provenientes de animais deficientes em IFN- γ ou em perforina.....	60
6.2 Resposta imune celular no linfonodo de drenagem da orelha em camundongos infectados por <i>L. braziliensis</i>	32
6.3 Infecção por <i>L. braziliensis</i> , desenvolvimento de lesão e avaliação da carga parasitária na ausência de linfócitos T CD8+.....	34
6.4 Infecção por <i>L. braziliensis</i> e resposta imune celular na ausência de linfócitos T CD8+.....	36
6.5 Resposta celular específica na ausência de linfócitos T CD8+.....	38
6.6 Histologia da lesão, na ausência de linfócitos T CD8+.....	41
6.7 Recrutamento de células inflamatórias para o sitio de infecção.....	43
6.8 Efeito da transferência de linfócitos T no desenvolvimento da lesão em camundongos RAG-/-.....	45
6.8 Histologia da leão dos camundongos deficientes em RAG transferidos com linfócitos T.....	49
6.9 Determinação da carga parasitária de camundongos RAG-/- infectados por <i>L. braziliensis</i> após transferência de linfócitos.....	51
7 DISCUSSÃO.....	63
8 CONCLUSÃO.....	75

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
ABSTRACT.....	10
Figura 1– A infecção por <i>L. braziliensis</i> induz o recrutamento de linfócitos T CD8+ para o sítio de infecção e a produção de Granzima B.....	31
LISTA DE ABREVIATURAS.....	5
LISTA DE FIGURAS.....	6
RESUMO.....	8

LISTA DE ABREVIATURAS

β_2m – β_2 -microglobulina

CC – C-C *chemokine ligand*

CD – *Cluster of differentiation*

CFSE - *Carboxyfluorescein succinimidyl ester*

DC – Células dendríticas

FITC – *Fluorescein Isothiocyanate* (Isotiocianato de Fluoresceína)

FMO – *Fluorescence Minus One*

HE – Hematoxilina & Eosina

IFN- γ – Interferon - gama

IgG – Imunoglobulina G

IL-4 – Interleucina-4

IL-10 – Interleucina-10

IL-12 – Interleucina-12

Lb – *Leishmania braziliensis*
LCD – Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL – Leishmaniose Cutânea Localizada
LCM – Leishmaniose Cutâneo Mucosa
LCMV - *Lymphocytic Choriomeningitis Virus*
LFA-1 - *Lymphocyte function-associated antigen 1*
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
MIP-1 β – *Macrophage inflammatory protein - 1 beta*
M Φ – Macrófago
NO – Óxido Nítrico
NK – *Natural killer*
PMA – *Phorbol Myristate Acetate*
RAG – *Recombination Activating Gene*
SCID - *Severe Combined Immunodeficiency*
Th – *T helper* (T auxiliadora)
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1– A infecção por *L. braziliensis* induz o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o sítio de infecção e a produção de Granzima B.

Figura 2 – Na infecção por *L. braziliensis*, linfócitos T CD8⁺ no linfonodo de drenagem produzem IFN- γ mas não produzem Granzima B.

Figura 3 – A ausência de linfócitos T CD8⁺ reduz a lesão e carga parasitária após a infecção por *L. braziliensis*.

Figura 4 – Na ausência de linfócitos T CD8⁺, a resposta de linfócitos T CD4⁺ não se altera.

Figura 5 – A ausência de linfócitos T CD8⁺ não altera a resposta específica de linfócitos T

CD4⁺ após a infecção por *L. braziliensis*.

Figura 6 – Neutrófilos são recrutados para o sítio de infecção em maior proporção em camundongos depletados de linfócitos T CD8⁺.

Figura 7 – Na infecção por *L. braziliensis*, a ausência de linfócitos T CD8⁺ induz aumento no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção.

Figura 8 – Transferência de linfócitos T CD8⁺ ou T CD4⁺ para camundongos RAG^{-/-}.

Figura 9 – A transferência de linfócitos T CD8⁺ induz patologia em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 10 – Patologia induzida por linfócitos T CD8⁺ após a transferência para camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 11 – Recrutamento celular em camundongos deficientes em RAG que receberam linfócitos T.

Figura 12 – A transferência de linfócitos T CD8⁺ não controla a carga parasitária em camundongos RAG^{-/-} e contribui para a metástase de parasitas.

Figura 13 – Linfócitos T CD8⁺ recrutados para a orelha produzem majoritariamente IFN- γ e Granzima B em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 14 – Linfócitos T CD4⁺ recrutados para a orelha não alteram a produção de citocinas em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 15 – Transferência de linfócitos T CD8⁺ para camundongos RAG^{-/-}.

Figura 16 – A presença de perforina é responsável pela patologia observada em camundongos

RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 17 – A citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8⁺ é responsável pela patologia observada em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 18 – Ausência de perforina em linfócitos T CD8⁺ impede a metástase de parasitas, em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*.

Figura 19 – Modelo da inibição do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos por linfócitos T CD8⁺, na infecção por *L. braziliensis*.

Figura 20 – Modelo de indução de metástase e patogênese pelos linfócitos T CD8⁺ na infecção por *L. braziliensis*.

Figura 21 – Possíveis mecanismos de controle da patogênese induzida por linfócitos T CD8⁺ na infecção por *L. braziliensis*.

RESUMO

AValiação do papel dos linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental por *Leishmania braziliensis*. **FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS.** Linfócitos T CD8⁺ são células do sistema imune adaptativo capazes de induzir a morte de células infectadas através de mecanismos citotóxicos. No modelo de infecção intradérmica por *Leishmania* revelou-se que os linfócitos T CD8⁺ são responsáveis tanto pela indução de patogênese bem como pela imunidade contra a infecção primária por *L. major*. Até o momento, o papel dos linfócitos T CD8⁺ não foi estudado na infecção experimental por *L. braziliensis*. Neste estudo, investigamos o recrutamento dos linfócitos T CD8⁺ para o sítio de infecção e determinamos a sua função. Cinco semanas após a infecção intradérmica por *L. braziliensis*, camundongos BALB/c apresentaram um aumento na porcentagem de linfócitos T CD8⁺ presentes na orelha infectada e estes produziram, principalmente, IFN- γ e Granzima B. Já no linfonodo de drenagem, estas células não produzem granzima mas, sim, IFN- γ e TNF- α . Utilizando o mesmo modelo de infecção, camundongos BALB/c ou C57BL/6 depletados de linfócitos T CD8⁺ ou camundongos deficientes em β_2 -microglobulina ou em CD8 apresentaram redução no tamanho da lesão ao longo da infecção e menor carga parasitária cinco semanas após a infecção. A depleção de linfócitos T CD8⁺ não induziu qualquer alteração no recrutamento e produção de IFN- γ , TNF- α e IL-10 pelos linfócitos T CD4⁺ no sítio de infecção ou no linfonodo de drenagem. Além disso, a capacidade proliferativa ou a produção de citocinas específicas *in vitro* após estímulo com células dendríticas infectadas por *L. braziliensis* não sofreram alteração. A ausência de linfócitos T CD8⁺ após a

infecção por *L. braziliensis* também não alterou o recrutamento de monócitos inflamatórios nem a sua diferenciação em células dendríticas. Por último, a análise histológica e de citometria de fluxo mostrou aumento no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção e este resultado pode ser correlacionado com o controle da doença. Para confirmar o envolvimento dos linfócitos T CD8⁺ no desenvolvimento de lesão por *L. braziliensis*, transferimos linfócitos T CD8⁺ de camundongos *naïve* ou imunes, bem como linfócitos T CD4⁺ somente ou linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ para camundongos RAG^{-/-}. Neste contexto, a transferência de linfócitos T CD8⁺ *naïve* ou imunes induziu uma intensa patologia no sítio de infecção bem como a disseminação de parasitas para outros sítios, como a orelha não infectada, pata e nariz. Camundongos RAG^{-/-} controle e aqueles que receberam linfócitos T CD8⁺ *naïve* ou imunes apresentam a mesma quantidade de parasitas no sítio de infecção, embora o aspecto da lesão tenha sido muito diferente. A transferência de linfócitos T CD4⁺ foi capaz de controlar a carga parasitária nestes animais e o mesmo foi observado após transferência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em conjunto. Nestes animais não observamos lesões em outros sítios, indicando que os linfócitos T CD8⁺ contribuem para a disseminação dos parasitas. Por último, transferimos linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos selvagens ou deficientes de IFN- γ e perforina e observamos que, na ausência de perforina, a patologia e a disseminação parasitária são controladas. Portanto, este estudo sugere envolvimento dos linfócitos T CD8⁺ na patogênese induzida por *L. braziliensis* devido ao seu potencial citotóxico e, em paralelo, inibindo o recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. [PALAVRAS CHAVE] *Leishmania braziliensis*, linfócitos T CD8⁺, neutrófilos, BALB/c, Leishmaniose Tegumentar Americana, perforina.

ABSTRACT

THE ROLE OF CD8⁺ T CELLS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS CAUSED BY *LEISHMANA BRAZILIENSIS*. **FERNANDA OLIVEIRA NOVAIS**. CD8⁺ T lymphocytes are part of the adaptive immune system and are considered cytotoxic because of their ability to induce death in infected cells. Using the intradermal model of Leishmania infection, it has been shown that CD8⁺ T cells play an essential role in both pathogenesis and immunity to primary infection with *L. major* in the skin. So far, the role of these lymphocytes in the experimental model of infection using *L. braziliensis* has not been evaluated. In this study we determined the recruitment and function of these cells upon infection with *L. braziliensis*. Five weeks after infection, the frequency of CD8⁺ T cells was increased in the dermal site and these cells produced mainly IFN- γ and granzyme B in infected mice. In the draining lymph nodes, these cells produced high levels of IFN- γ and TNF- α , but not granzyme B. Using the same intradermal model of infection, we analysed the outcome of infection in the absence of CD8⁺ T lymphocytes using both antibody depletion in BALB/c and C57BL/6 mice and mice deficient in β_2 -microglobulin and CD8. In all groups, the absence of CD8⁺ T cells was correlated with better control of lesion development and parasite load in both depleted BALB/c and in β_2 -microglobulin deficient mice. In the absence of CD8⁺ T cells, CD4⁺ T lymphocytes were recruited to the same extension and produced same levels of IFN- γ , TNF- α and IL-10 both in the infected ear and in draining lymph nodes when compared to infected mice that were not depleted. Also, there was no change in the proliferative potential and in IFN- γ production by these cells after re-stimulation with infected dendritic cells. Analysis of inflammatory monocyte recruitment and differentiation of these cells into dendritic cells were similar in both depleted and non-depleted mice. On the other hand, histological and flow cytometric analyses showed increased neutrophil recruitment to the site of infection and this can be correlated with disease control. To confirm the role of CD8⁺ T cells in the lesion development of *L. braziliensis* infected mice, we then transferred CD8⁺ T cells from naïve or immune mice, as well as CD4⁺ T cells alone or together with T CD8⁺ to RAG deficient mice. The transfer of CD8⁺ T cells from immune or naïve mice into RAG recipients induced an intense pathology upon infection with *L. braziliensis* in the infection site, but also in uninfected tissues such as the uninfected ear, nose and footpad. Evaluation of parasite numbers in the infected ear showed that RAG deficient mice without T cells and those transferred with CD8⁺ T cells from naïve or immune mice had similar number of parasites although the pathology was very different. The transfer of CD4⁺ T cells alone or in association with CD8⁺ T cells induced parasite control in the infection site. In these mice, we could not detect lesions in other sites and we concluded that the transfer of CD8⁺ T cells alone induces parasite dissemination in RAG deficient mice. Finally, the transfer of CD8⁺ T cells from perforin deficient mice led to control in lesion development and in parasite dissemination. In this study we can conclude that CD8⁺ T cells are involved in the pathogenesis of *L. braziliensis* due to their cytotoxic potential and by inhibiting neutrophil recruitment to the infection site. [KEYWORDS] *Leishmania braziliensis*, CD8⁺ T cells, neutrophils, BALB/c, American Tegumentary Leishmaniasis, perforin.

1 INTRODUÇÃO

1.1 A leishmaniose

A leishmaniose é constituída por um grupo de doenças causadas pela infecção por parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae), que são injetados na derme do hospedeiro pela picada do flebótomo infectado. Existem cerca de 500 espécies de flebotomos identificados, contudo, apenas 30 deles estão implicados como vetores da doença (World Health Organization, Leishmaniasis Controle - Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em 28/12/2010).

No Brasil, os flebotomíneos responsáveis pela transmissão da *Leishmania* são pertencentes ao gênero *Lutzomyia* (Ordem Diptera, Família Psychodidae). A transmissão da *Leishmania* dá-se durante o repasto sanguíneo do flebótomo fêmea. Durante o processo de alimentação, até 1.000 formas infectantes da *Leishmania* são introduzidas no local da picada junto com a saliva do inseto. Dentro de 4 a 6 horas, estes parasitas são interiorizados pelos macrófagos teciduais e são envoltos por um vacúolo fagocítico. Rapidamente, as formas promastigotas perdem o flagelo e se transformam nas formas amastigotas, que são capazes de sobreviver dentro do vacúolo parasitóforo, no interior do macrófago. No vacúolo parasitóforo, as formas amastigotas se multiplicam por divisão binária, resistindo aos mecanismos efetores da resposta imune do hospedeiro. Eventualmente, os macrófagos infectados se rompem, liberando novas amastigotas, as quais podem invadir novas células, re-iniciando o ciclo de vida no interior do hospedeiro vertebrado.

Somente as fêmeas de flebotomos são capazes de transmitir a leishmania, adquirindo-a através da alimentação sanguínea no hospedeiro vertebrado (seres humanos ou outros mamíferos infectados com o parasita). Uma vez no interior do flebótomo, as amastigotas se diferenciam em promastigotas e se deslocam para a porção anterior do intestino do vetor. Após a migração para a faringe do inseto, as formas promastigotas diferenciam-se nas formas infectantes, chamadas de promastigotas metacíclicas.

A leishmaniose apresenta duas formas clínicas principais, a forma cutânea ou tegumentar e a forma visceral. A leishmaniose cutânea ou tegumentar (LT) é caracterizada pela formação de úlceras na pele em locais expostos como rosto, pernas e braços. Esta úlcera apresenta, caracteristicamente, bordas elevadas e um fundo necrótico. Embora a LT comprometa primariamente a pele, a linfadenopatia regional é comum, podendo preceder o aparecimento das

lesões cutâneas (Barral *et al.*, 1995). Nas Américas, a LT é causada por uma variedade de espécies sendo seus principais agentes etiológicos a *Leishmania braziliensis*, a *Leishmania amazonensis* e a *Leishmania guyanensis*, enquanto que, no Velho Mundo, as espécies responsáveis pela LT são, entre outras, a *Leishmania major* e a *Leishmania tropica*.

A LT pode se manifestar como uma úlcera cutânea única e, neste caso, é chamada de leishmaniose cutânea localizada (LCL) ou por meio de diversas lesões nodulares, sendo, neste caso, denominada leishmaniose cutânea difusa (LCD) (Carvalho *et al.*, 1994). Nas Américas, aproximadamente 3% dos pacientes são acometidos pela leishmaniose cutâneo-mucosa (LCM) (Barral *et al.*, 1995). Esta complicação decorre da metástase dos parasitas a partir de uma lesão cutânea, sendo as regiões mais afetadas o nariz, faringe, boca e laringe (revisado em Marsden, 1986). Em geral, as lesões nestes tecidos ocorrem num período que pode variar de semanas a anos após a infecção inicial, no entanto, a ocorrência de ambas as formas da doença (LCL e LCM) pode ser concomitante (Boaventura *et al.*, 2010).

A leishmaniose visceral (LV) ou calazar é causada pela *L. chagasi-infantum* e resulta da incapacidade do sistema imune de ativar macrófagos (rev. em Stager *et al.*, 2010), o que leva a disseminação hematogênica do parasita. Isto leva ao desenvolvimento de uma enfermidade infecciosa crônica capaz de causar um estado de debilidade progressivo, que pode levar ao óbito se não for submetida a um tratamento específico.

Nos últimos quinze anos, as regiões endêmicas para as leishmanioses têm se alastrado e existe um aumento importante no número de casos da doença. Atualmente, 88 países são afetados pelas leishmanioses e existe um número substancial de casos não reportados. Estima-se que 350 milhões de indivíduos vivem em área de risco, 12 milhões de pessoas se encontram infectadas com o parasita e outros 2 milhões de novos casos surgem anualmente (World Health Organization, Leishmaniasis Controle - Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/> Acesso em 28/12/2010).

1.2 Modelos experimentais de leishmaniose tegumentar

Inicialmente, observou-se que a inoculação de *L. major* em camundongos de diferentes cepas resulta em dois padrões distintos de doença. O padrão de resistência, por exemplo, é o observado em camundongos C57BL/6. Neste modelo, os animais desenvolvem uma lesão que cura espontaneamente e esta cura está associada ao desenvolvimento de uma resposta imune celular do

tipo T *helper* 1 (ou Th1), caracterizada pela presença de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-4. Em contraste, camundongos BALB/c são suscetíveis à infecção por *L. major*, pois desenvolvem uma resposta imune celular do tipo Th2, com baixos níveis de IFN- γ e altos níveis de IL-4 (Locksley e Scott, 1991). Nos camundongos BALB/c não há cura espontânea da lesão e este modelo está associado às formas clínicas da doença consideradas progressivas como a LV e a LCD (rev. Sacks e Noben-Trauth, 2002), para as quais também não se observa cura espontânea no homem. Tradicionalmente, estes modelos experimentais de infecção são induzidos a partir da inoculação de altas quantidades do parasita (por volta de 10^7 promastigotas) na pata do animal, por via subcutânea.

No final da década de 90, Belkaid *et al.* (1998) desenvolveram um modelo experimental que mimetiza melhor a infecção natural. Neste modelo, o inóculo de baixas doses de *L. major* (100 a 1000 promastigotas), na derme da orelha de camundongos BALB/c, associado à presença de saliva do flebotomíneo *Phlebotomus papatasi*, levou ao desenvolvimento de uma lesão mais acentuada quando comparado aos controles inoculados apenas com *L. major*. Mesmo em camundongos C57BL/6, considerados resistentes à infecção por *L. major*, houve ulceração e necrose tecidual, indicando que este seria um modelo de infecção mais semelhante ao que ocorre na natureza.

Embora a doença causada por *L. braziliensis* seja um sério problema de saúde pública no Brasil e na América do Sul, existem poucos trabalhos experimentais que caracterizam a resposta imune a este parasita. Neal & Hale (1983) testaram a base da cauda de camundongos BALB/c como sítio de infecção, utilizando 2×10^7 parasitas. Os autores conseguiram observar o desenvolvimento de pequenos nódulos, o que sugeriu uma baixa sobrevivência e multiplicação do parasita neste hospedeiro. Childs *et al.* (1984) testaram a infecção com *L. braziliensis* em oito linhagens de camundongos, utilizando o focinho destes animais como local de inóculo, e observaram a cura da infecção em todas as cepas de camundongos usadas. Somente após a co-inoculação de *L. braziliensis* na presença de saliva, ainda no modelo de infecção subcutânea, observou-se desenvolvimento de lesão em camundongos BALB/c (Samuelson *et al.*, 1991). Mais tarde, Donnelly *et al.* (1998) testaram a infecção de camundongos BALB/c com um inóculo de 10^7 promastigotas de *L. braziliensis* na pata do animal. Os autores observaram o desenvolvimento de lesão nodular, mas não houve formação de uma úlcera. Em contraste, a mesma linhagem de camundongos foi infectada com 10^6 promastigotas de *L. major* e apresentou uma lesão que surgiu

mais rapidamente e que se tornou ulcerada e necrótica no 21º dia após a infecção. Contudo, a importância deste trabalho está na demonstração de que camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* apresentam baixos níveis de IL-4 e altos níveis de IFN- γ , quando comparados com camundongos infectados com *L. major*. O papel crucial do IFN- γ no controle da infecção por *L. braziliensis* foi demonstrado em outro trabalho através da depleção por anticorpo e em camundongos deficientes desta citocina (Dekrey *et al.*, 1998). Os autores demonstraram que a produção de IFN- γ é fundamental para a eliminação do parasita e conseqüente resistência à infecção, pois a sua depleção acarreta em uma progressão rápida da doença em camundongos. A importância do IFN- γ na infecção por *L. braziliensis* também foi demonstrada através da infecção de camundongos deficientes desta citocina (De Souza-Neto *et al.*, 2004). Neste trabalho, os autores também sugeriram um controle mediado por IFN- γ independente de IL-12.

Anos mais tarde, nosso grupo de pesquisa desenvolveu um novo modelo experimental para o estudo da infecção por *L. braziliensis* (De Moura *et al.*, 2005), baseado no modelo proposto por Belkaid *et al.* (1998). Foi observado que a infecção de 10^5 *L. braziliensis*, na derme da orelha, leva ao surgimento de uma lesão ulcerada, com bordas elevadas e fundo necrótico, que cura espontaneamente, cerca de 10 semanas após o início da infecção. Os camundongos infectados desta maneira apresentaram altos níveis de IFN- γ , produzido tanto por células T CD4⁺ quanto por células T CD8⁺, presentes no linfonodo de drenagem destes animais. Além disso, a quantidade de IFN- γ produzida pelas células T CD8⁺ não diminuiu durante a infecção, mesmo após o início do processo de cura da lesão, o que não foi observado pelos linfócitos T CD4⁺. A presença de IFN- γ neste modelo também foi associada com controle parasitário.

Mais recentemente, Rocha *et al.* (2007) investigaram diversos aspectos no controle da infecção por *L. braziliensis* em um estudo comparativo entre *L. major* e *L. braziliensis*, no modelo murino de infecção subcutânea. Neste trabalho, os autores reafirmaram a importância da resposta do tipo Th1 no controle da infecção por *L. braziliensis*, pois camundongos deficientes em IL-12p35, IL-12p35/p40 bem como em STAT4 e em TNF- α apresentaram uma lesão grave. Ademais, os autores demonstraram que a produção de óxido nítrico (NO) também é fundamental para o controle de *L. braziliensis*, como já havia sido demonstrado anteriormente na infecção experimental por *L. major* (Liew *et al.*, 1990).

Fundamentalmente, todos estes trabalhos foram importantes para demonstrar que o controle de *L. braziliensis* é associado a uma resposta Th1, mesmo em camundongos BALB/c,

contudo não elucidaram o papel de subtipos específicos de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ na produção de citocinas e a sua função no controle da infecção experimental por *L. braziliensis*.

1.3 Características gerais dos linfócitos T CD8⁺

Linfócitos T CD8⁺ foram formalmente reconhecidos, fenotípica e funcionalmente, como uma sub-população de linfócitos T há menos de 40 anos (Kisielow *et al.*, 1975) e inúmeros trabalhos mostraram, ao longo dos anos, a sua importância na resposta imune adaptativa. A sua função na resposta contra patógenos intracelulares, vírus e tumores vai desde mecanismos compartilhados por outras células do sistema imune adaptativo, como, por exemplo, produção de citocinas e quimiocinas, até algumas mais específicas, como indução de morte celular. De uma maneira geral, linfócitos T CD8⁺, que possuem receptores apropriados na sua superfície, precisam reconhecer peptídeos ligados ao MHC classe I na superfície de células apresentadoras de antígeno, para exercer o seu papel.

Linfócitos T CD8⁺ *naïve* circulam preferencialmente por órgãos linfóides secundários e são ativados ao encontrar células dendríticas (DC, do inglês *dendritic cells*) maduras, expressando peptídeos estranhos via MHC classe I e moléculas co-estimuladoras em um ambiente pró-inflamatório apropriado (Harty e Badovinac, 2002). Estes são considerados o primeiro (complexo antígeno/MHC), segundo (moléculas co-estimuladoras) e o terceiro (citocinas pró-inflamatórias) sinal (rev. em Haring *et al.*, 2006), fundamentais para o desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa eficiente.

Após sua ativação, estes linfócitos respondem ao antígeno entrando em fase de expansão clonal pronunciada, gerando uma população numerosa de células T antígeno-específicas. Como células efetoras, os linfócitos T CD8⁺ deixam os órgãos linfóides secundários e percorrem os tecidos para exercer suas funções imunológicas. A partir deste momento, os linfócitos T CD8⁺ têm vida curta, mas são capazes de contribuir para a eliminação de patógenos por mecanismos efetores como a citólise dependente de perforina/granzima e pela produção de IFN- γ e TNF- α (Harty *et al.*, 2000; Haring *et al.*, 2006).

Uma das características principais dos linfócitos T CD8⁺, compartilhada por células NK (do inglês, *Natural Killer*), é a sua capacidade de induzir morte celular por citotoxicidade. Ambos tipos celulares levam a morte de células-alvo por dois mecanismos principais: (a) ligação do receptor de morte (FAS ou CD95) na célula-alvo ao seu ligante (FASL), presente na superfície da

célula efetora T CD8⁺, que resulta na ativação clássica de apoptose dependente de caspase (Nagata e Golstein, 1995) e cuja função principal é eliminar células linfóides auto-reativas (Van Parijs e Abbas, 1996); (b) liberação de grânulos citoplasmáticos que contêm perforina, uma proteína capaz de romper a membrana celular, e granzimas, que são uma família de serino-proteases com várias especificidades de substrato. Junto com as perforinas, as granzimas terminam por induzir apoptose, também dependente de caspase, na célula-alvo (rev. em Smyth e Trapani, 1995).

Camundongos deficientes em perforina são viáveis e apresentam números normais de linfócitos T CD8⁺ e de células NK, mas são incapazes de induzir a lise de células infectadas por LCMV (Kagi *et al.*, 1994). Nestes animais, não ocorre a apoptose mediada por grânulos, demonstrando a relevância da perforina neste processo. Por outro lado, as granzimas são separadas em diferentes grupos que mostram redundância funcional, pois camundongos deficientes em uma ou mesmo em muitas granzimas apresentam menor dificuldade para resolver diferentes tipos de infecção quando comparados aos deficientes de perforina (rev. em Trapani e Smyth, 2002). No caso da Granzima B, camundongos deficientes nesta molécula mostram apenas um retardo na indução de apoptose (Heusel *et al.*, 1994).

Linfócitos T CD8⁺ também são fonte de quimiocinas. Um grande avanço no estudo da resposta imune frente a infecção pelo HIV foi a descoberta de que quimiocinas como CCL3, CCL4 e CCL5, produzidas por estes linfócitos, inibem a entrada do HIV em linfócitos T CD4⁺ por meio do bloqueio da interação entre CCR5 e o domínio V3 do envelope viral (Cocchi *et al.*, 1995; D'souza e Harden, 1996). Outro trabalho mostrou que a produção de quimiocinas por linfócitos T CD8⁺ aumenta as respostas imune celular e humoral *in vivo* durante a fase efetora (Kim *et al.*, 1998). Já foi demonstrado que CCL3 produzida por linfócitos T CD8⁺ de memória é necessária para a eliminação de *Listeria monocytogenes* no modelo murino (Narni-Mancinelli *et al.*, 2007). Neste trabalho os autores mostram que a CCL3 produzida por estes linfócitos induz a secreção rápida de TNF- α por monócitos inflamatórios que, por sua vez, promovem a liberação de radicais intermediários de oxigênio, sendo este o mecanismo bactericida envolvido na eliminação de *L. monocytogenes*.

Um outro aspecto importante da resposta de linfócitos T CD8⁺ é a sua capacidade de produzir citocinas pró e anti-inflamatórias em altas quantidades. Classicamente, além da sua capacidade de induzir a lise de células infectadas, linfócitos T CD8⁺ são definidos pela sua

capacidade de produzir IFN- γ (Klein, 1982). Alguns autores dividem os linfócitos T CD8⁺ em duas populações: classicamente, os Tc1 produzem IFN- γ e não produzem IL-4 ou IL-5, e os Tc2 secretam IL-4 e IL-5, mas não IFN- γ , contudo, ambos os subtipos exibem capacidade citotóxica (Mosmann *et al.*, 1997). Mais recentemente, estudos mostram que linfócitos T CD8⁺ de camundongos são capazes de produzir IL-17 em resposta a IL-1 e IL-23 (Sutton *et al.*, 2006). Da mesma maneira, linfócitos T CD8⁺ humanos produzem esta citocina após estímulo com PMA e ionomicina, um ionóforo de cálcio (Shin *et al.*, 1999).

Após exercer os seus mecanismos efetores, existe um declínio da população de células T patógeno-específicas em todos os órgãos, durante a chamada “fase de contração”, e esta é independente do sucesso da eliminação do patógeno. Harty e Badovinac (2008) discutem que esta redução substancial no número de células antígeno-específicas (eliminação que pode chegar a 95%), permite uma resposta rápida contra o mesmo patógeno, mas previne imunopatologia. Nesse caso, a imunopatologia poderia ocorrer no caso da manutenção de uma quantidade grande de células ativadas, até então incapazes de eliminar o patógeno. Portanto, o estudo da resposta específica contra patógenos pelas células T CD8⁺ é importante também para podermos compreender e desenvolver estratégias de vacinação (Haring *et al.*, 2006).

1.4 Linfócitos T CD8⁺ na infecção por Leishmania

No início da década de 90, muitos trabalhos mostraram a importância dos linfócitos T CD8⁺ frente a infecção por *Trypanosoma cruzi*, o agente causador da doença de Chagas. Um dos primeiros trabalhos relacionados ao tema mostrou que a depleção de linfócitos T CD8⁺ *in vivo*, pela administração de anticorpo anti-CD8, levou camundongos resistentes à suscetibilidade após infecção por *T. cruzi* (Tarleton, 1990). Também neste período surgiram grupos de pesquisa interessados em mostrar a importância destes linfócitos na infecção por Leishmania.

Na infecção por *L. major*, inicialmente foi mostrado que as células T CD8⁺ desempenham um papel importante na proteção contra a re-infecção, no modelo subcutâneo de infecção por *L. major* (Muller, 1992). Neste trabalho, a autora demonstrou que os linfócitos T CD8⁺ produzem altos níveis de IFN- γ em camundongos re-infectados. A mesma autora demonstrou anos mais tarde que linfócitos T CD8⁺ de camundongos curados foram capazes de “transferir” a resposta de DTH a recipientes (Muller *et al.*, 1994) e foram capazes de apresentar atividade citotóxica (Da Conceicao-Silva *et al.*, 1994). Estes efeitos sugerem que a indução de resposta por linfócitos T

CD8⁺ é importante no desenvolvimento de vacinas. De fato, a imunização de camundongos BALB/c com o fator de virulência de amastigotas A2, identificado em *L. donovani*, reduziu o número de parasitas no baço e fígado após desafio destes animais com *L. donovani*. Este efeito foi associado com o aumento na produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ e com a sua capacidade de induzir lise de células pulsadas com este antígeno *in vivo* (Resende et al., 2008).

Na infecção experimental por *L. amazonensis* foi demonstrado que a produção de perforina e IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ é fundamental para a imunidade induzida por vacina (Colmenares et al., 2003). Por outro lado, a vacinação de camundongos com um *pool* de antígenos seguido de um desafio com *L. amazonensis* mostrou que a proteção é independente da presença de linfócitos T CD8⁺ (Hernandez Sanabria et al., 2007). Ademais, os autores observaram que a depleção de linfócitos T CD8⁺ em camundongos vacinados resultou num menor tamanho de lesão e melhor integridade do tecido.

Além dos efeitos diretos de produção de IFN- γ citados anteriormente, a depleção de linfócitos T CD8⁺ é capaz de alterar a resposta de linfócitos T CD4⁺ em camundongos infectados por *L. major* (Herath et al., 2003). Embora a ausência de linfócitos T CD8⁺ não interfira na capacidade proliferativa de linfócitos T CD4⁺, a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ é reduzida na ausência de linfócitos T CD8⁺ e este efeito foi correlacionado com o aumento na carga parasitária nos animais.

Experimentos iniciais de infecção em camundongos deficientes de linfócitos T CD8⁺, com *L. major* pela via subcutânea, mostraram cura espontânea similar àquela observada em camundongos selvagens, sugerindo que estas células não são importantes no controle da infecção primária (Huber et al., 1998). O mesmo foi demonstrado em um outro estudo, no qual a infecção de camundongos deficientes em β_2 -m por *L. major* ou *L. mexicana*, mostrou que a ausência de resposta induzida por linfócitos T CD8⁺ não alterou o curso da infecção (Overath e Harbecke, 1993). No entanto, o modelo de infecção intradérmica alterou este paradigma. A inoculação de baixas doses de *L. major* na derme da orelha demonstrou a importância dos linfócitos T CD8⁺ no controle parasitário utilizando animais deficientes em CD8 ou em β_2 -m, ou utilizando estratégias de transferência adotiva (Belkaid et al., 2002). Nesse trabalho, os autores mostraram que a formação da lesão coincidiu com a eliminação de parasitas no sítio de inoculação e que os dois eventos foram associados com o acúmulo de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ na pele. Ademais, células T CD8⁺, obtidas de animais previamente infectados com *L. major*, foram

capazes de transferir resistência parcial contra um desafio subsequente e essa proteção foi associada à capacidade de produzir IFN- γ , similar ao mostrado nos ensaios de re-infecção (Muller *et al.*, 1994).

Um estudo comparativo entre inoculação com alta (1 milhão) ou com baixa (mil) dose de *L. major* mostrou o efeito da dose sobre o desempenho dos linfócitos T CD8⁺, na infecção com *L. major*. Assim, Uzonna *et al.* (2004) mostraram que a quantidade de parasitas é fundamental para determinar a importância dos linfócitos T CD8⁺: somente após a infecção com uma baixa dose de *L. major*, os camundongos depletados de linfócitos T CD8⁺ apresentaram controle da infecção. Os autores mostraram também que a produção de IFN- γ por linfócitos T CD8⁺ bloqueia o desenvolvimento de uma resposta Th2, uma vez que ocorreu um aumento na produção de IL-4 após a depleção destes linfócitos.

Apesar das controvérsias no papel dos linfócitos T CD8⁺ em modelos de leishmaniose cutânea, é mais clara a necessidade de uma resposta eficaz destes linfócitos no controle da leishmaniose visceral em modelos murinos (rev. em Stager *et al.*, 2010). Linfócitos T CD8⁺ são essenciais para o controle da infecção primária (Tsagozis *et al.*, 2003; 2005) e são protagonistas na resistência à infecções secundárias (Stern *et al.*, 1988).

Com relação ao papel dos linfócitos T CD8⁺ na LT em humanos, a produção de IFN- γ por estes linfócitos foi associada com a cura de pacientes com LC (Da-Cruz *et al.*, 1994). Estudos do nosso laboratório, utilizando *in vitro priming* com células de doadores normais estimuladas com *L. amazonensis*, mostraram que os linfócitos T CD8⁺ são os primeiros a expressarem marcadores de ativação na sua superfície (Pompeu *et al.*, 2001). Além disso, neste trabalho, observou-se também que células T CD8⁺ produzem mais IFN- γ do que as células T CD4⁺ após estimulação *in vitro* com *L. amazonensis*. Sabe-se também que células de pacientes com Leishmaniose Mucocutânea (LM), forma clínica na qual ocorre intensa destruição tecidual devido a uma resposta imune celular desbalanceada, apresentam atividade citotóxica, mediada por células NK e T CD8⁺ (Brodskyn *et al.*, 1997). Mais recentemente, Faria e colaboradores (2009) demonstraram que o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima A na lesão de pacientes está associado à progressão da doença na leishmaniose cutânea. Neste sentido, é possível que os linfócitos T CD8⁺ modulem as respostas do tipo Th1 no início da infecção humana, e, posteriormente, contribuam consideravelmente para a patogênese da doença.

Os dados da literatura no modelo murino com *L. major*, a espécie de leishmania mais

profundamente estudada na infecção experimental, sugerem um efeito benéfico dos linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção. A resposta em pacientes infectados por *L. braziliensis* nos leva a questionar este papel pela associação da resposta citotóxica destes linfócitos com a gravidade da doença. Neste trabalho, iniciamos uma investigação da resposta dos linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental por *L. braziliensis* com o intuito de compreender o seu papel direto na infecção, bem como o seu efeito em outros subtipos celulares.

2 JUSTIFICATIVA

O uso de modelos experimentais sempre foi uma ferramenta fundamental para conhecer os mecanismos de patogênese e controle da leishmaniose. Pouco sabe-se sobre o papel dos linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental por *L. braziliensis* e os estudos em humanos são limitados. Portanto, os achados decorrentes do presente trabalho tentam esclarecer e abrir perspectivas sobre o papel desempenhado por estes linfócitos na infecção por *L. braziliensis*.

3 OBJETIVO GERAL

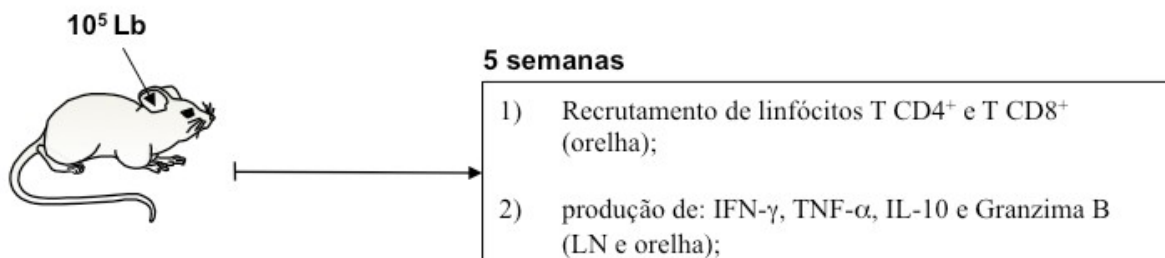
Avaliar o papel dos linfócitos T CD8⁺ no curso da infecção por *Leishmania braziliensis*, em um modelo experimental de infecção.

3.1 Objetivos específicos

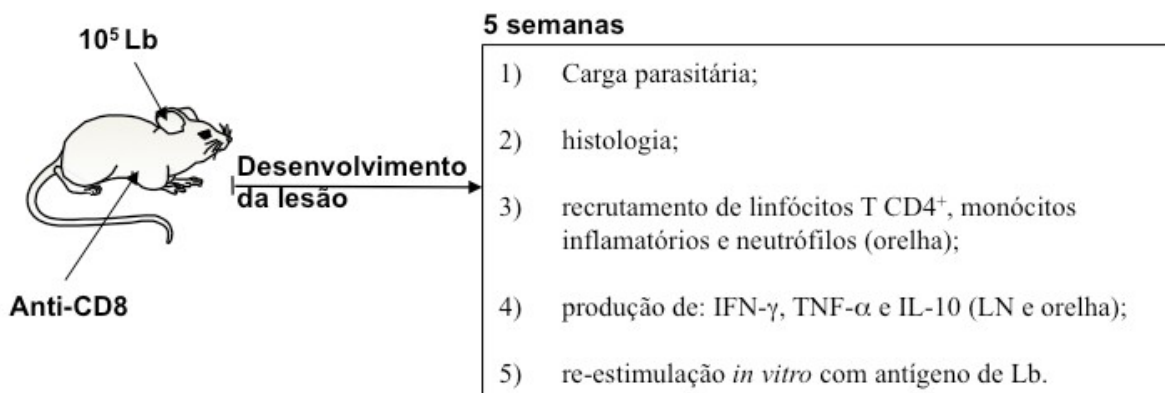
- Avaliar o recrutamento para o sítio de infecção e a função (presença de marcadores intracelulares) de linfócitos T CD8⁺ em camundongos infectados com *L. braziliensis*;
- Avaliar o efeito da ausência de linfócitos T CD8⁺ no curso da infecção por *L. braziliensis*;
- Verificar o efeito dos linfócitos T CD8⁺ após a transferência adotiva para camundongos deficientes em RAG.

4 DESENHO EXPERIMENTAL

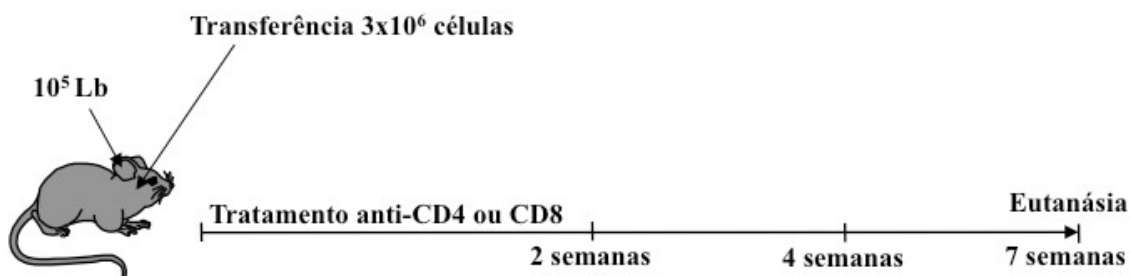
• **OBJETIVO ESPECÍFICO 1:** Avaliar o recrutamento para o sítio de infecção e a função (presença de marcadores intracelulares) de linfócitos T CD8⁺ em camundongos infectados com *L. braziliensis*.



• **OBJETIVO ESPECÍFICO 2:** Avaliar o efeito da depleção de linfócitos T CD8⁺ no curso da infecção por *L. braziliensis*.



• **OBJETIVO ESPECÍFICO 3:** Verificar o efeito dos linfócitos T CD8⁺ transferidos em camundongos deficientes de RAG.



5 MATERIAS E MÉTODOS

5.1 Parasitas e antígenos

A cepa de *L. braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) utilizada neste estudo foi obtida de um paciente com LTA e sua caracterização foi feita por PCR (Castilho *et al.*, 2003) e anticorpos monoclonais (McMahon-Pratt *et al.*, 1982). A cepa *L. braziliensis* foi mantida em meio de cultura Schneider (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM Hepes (todos da Invitrogen).

5.2 Camundongos

Os camundongos BALB/c e C57BL/6 selvagens e os camundongos deficientes em β_2 -microglobulina, CD8 α , Perforina, IFN- γ e RAG, com 6 a 8 semanas de idade, foram adquiridos no The Jackson Laboratory (Maine, USA) e mantidos em condições livre de patógenos no Biotério da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade da Pensilvânia. Os experimentos foram realizados utilizando métodos aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz para Experimentação Animal.

5.3 Infecção intradérmica

Os promastigotas metacíclicos enriquecidos por gradiente de densidade (Spath e Beverley, 2001), foram inoculados na derme da orelha esquerda dos camundongos utilizando-se agulhas de 29G e um volume de 10µl de solução salina estéril, contendo 10⁵ parasitas. Nos experimentos com camundongos deficientes em RAG, os animais foram infectados logo após a transferência dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ ou ambos. A evolução da lesão foi monitorada com um paquímetro digital, semanalmente (PGC Scientifics).

5.4 Preparação dos tecidos para carga parasitária e citometria de fluxo

Após eutanásia, baço, linfonodo de drenagem (LN) e as orelhas infectada e não infectada (quando indicado) foram coletados e mantidos em solução salina até o momento do uso. Linfonodos e baços foram macerados em peneira plástica (cell strainer 40µm, BD Pharmingen) e lavados por centrifugação. As lise das células vermelhas do baço foi feita utilizando-se solução ACK (Lonza). As orelhas foram inicialmente mergulhadas em etanol e lavadas em solução salina.

Em seguida, os folhetos foram separados e cada um foi incubado em 500µL de meio RPMI (Gibco) contendo 250µg/mL de Liberase TM (Roche) em placas de 24 poços por 1 hora a 37°C/5% CO₂. Por fim, as orelhas foram maceradas em peneira plástica, como descrito acima. Alíquotas de cada suspensão celular foram coletadas antes da lavagem por centrifugação para a quantificação parasitária nos tecidos.

5.5 Determinação da carga parasitária

Para estimar o número de parasitas nos tecidos, as suspensões celulares foram diluídas (1:10) em meio Schneider (Gibco) suplementado como descrito anteriormente. Foram realizadas diluições (quadruplicatas) seriadas em placas de 96 poços e as mesmas foram incubadas a 26°C. O número de parasitas foi calculado a partir da máxima diluição onde foram encontrados parasitas viáveis, após 7 dias de cultivo. O limite de detecção desta técnica é de 5×10^3 parasitas.

5.6 Citometria de fluxo

5.6.1 Linfócitos

Para determinar a população celular e função das mesmas durante a infecção, os animais foram eutanasiados e os diferentes tecidos (orelhas ou linfonodos) foram coletados, macerados e lavados como descrito anteriormente. A preparação celular resultante (2×10^6 /poço) foi ressuspendida em RPMI suplementado (10% de soro bovino fetal inativado, 100 U/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina e 20 mM HEPES) e foi estimulada em placas de 24 poços com PMA (50ng/mL, SIGMA) e ionomicina (500ng/mL, SIGMA) por 4 horas, na presença de Brefeldina A (10µg/mL, SIGMA) para induzir o acúmulo dos marcadores intracelulares. A suspensão celular foi usada para marcação de moléculas de superfície, utilizando-se o kit *Fixable Aqua Dead Cell Stain* (Invitrogen), para exclusão das células mortas da análise, e os anticorpos anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8β, (todos da eBioscience). Para avaliar os marcadores intracelulares, as células foram fixadas com paraformaldeído a 2% e, em seguida, foram permeabilizadas com 0,2% de saponina (SIGMA) e incubadas com os anticorpos anti-IL-10, anti-IFN-γ, anti-TNF-α e anti-IL-17 (todos da eBioscience) e anti-Granzima B (Invitrogen). O volume total de cada um dos tubos foi adquirido usando o FACS-Canto (BD Biosciences) e as análises foram feitas no programa FlowJo (Tree Star). Para todas as amostras, as populações positivas foram estabelecidas usando uma combinação de marcações para isotipos e os controles de

fluorescência-menos-um, FMO.

5.6.1 Monócitos e neutrófilos

Para determinar a população de células inflamatórias no sítio de infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas foram coletadas, maceradas e lavadas como descrito anteriormente. A suspensão celular foi usada para marcação de moléculas de superfície, utilizando-se o kit *Fixable Aqua Dead Cell Stain* (Invitrogen), para exclusão das células mortas da análise, e os anticorpos anti-CD11b, anti-CD11c, anti-Ly6C e anti-Ly6G (todos da eBioscience). Para todas as amostras, as populações positivas foram estabelecidas usando uma combinação de marcações para isotipos e os controles de FMO.

5.7 Análise histológica

Em diferentes tempos após a infecção, os animais foram eutanasiados e as orelhas infectadas ou não infectadas foram removidas e fixadas em formaldeído 10%. Em seguida, os tecidos foram processados e emblocados em parafina. Secções de 5 µm de espessura foram colocadas em lâminas de vidro e coradas pela hematoxilina e eosina para posterior avaliação em microscópio óptico. A análise histológica foi realizada nas objetivas de 4, 20 e 40X.

5.8 Purificação e transferência de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺

O baço dos camundongos C57BL/6 não infectados, imunes (infectados há mais de 10 semanas) ou deficientes em perforina ou em IFN-γ foram coletados, macerados e lavados como descrito acima. A suspensão celular resultante foi passada em colunas magnéticas (Miltenyi Biotec) para a obtenção dos linfócitos T CD8⁺ por meio de seleção negativa, seguindo-se as instruções dos fornecedores. O mesmo procedimento foi utilizado para separação de linfócitos T CD4⁺. A pureza da população celular resultante foi determinada por citometria de fluxo e foi superior a 90% em todos os experimentos realizados. Os animais receberam 3x10⁶ linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ ou ambos por via endovenosa (retro-orbital). Os animais foram infectados logo após a transferência dos linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ ou ambos, como descrito anteriormente.

5.9 Depleção de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺

Para a depleção de células T, os camundongos foram injetados por via intraperitoneal com 250µg de anticorpo monoclonal anti-CD8α (53.6.72), anti-CD4 (GK1.5) ou com o isotipo controle (todos da BioXCell), um dia antes da infecção e duas vezes por semana até o término do experimento. Os animais deficientes em RAG, que receberam linfócitos T CD8⁺ ou linfócitos T CD4⁺ também foram tratados por 2 semanas com os anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8α, respectivamente. A depleção dos linfócitos nos animais tratados e nos controles foi determinada por análise das células do sangue por citometria de fluxo, quatro (Figura 8) ou cinco semanas após a transferência (Figura 15).

5.10 Proliferação e produção de citocinas após re-estimulação *in vitro*

O baço de animais infectados foi coletado após eutanásia e a suspensão celular foi preparada conforme descrito anteriormente. As células foram mantidas em meio RPMI, na ausência de soro, e foram incubadas com 5µM de CFSE (Invitrogen) por 10 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida pela adição de soro e a mistura foi lavada por centrifugação. Em seguida, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (2x10⁵ por poço), com fundo em “U”, na presença de antígeno bruto de *L. braziliensis* ou na presença de anti-CD3/anti-CD28 (ambos a 1µg/mL, eBioscience), como controle positivo. Parte das células foi mantida em meio de cultura, como controle de produção basal. Após 3 dias de cultivo em estufa de CO₂ 5% a 37°C, a cultura celular foi estimulada por 4 horas com 50ng/mL de PMA, 500ng/mL de ionomicina e 10µg/mL de Brefeldina A para aumentar o acúmulo dos marcadores intracelulares. Por fim, as células foram coletadas e marcadas para citometria de fluxo conforme descrito anteriormente.

5.11 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados quanto às diferenças estatísticas utilizando diferentes testes: para múltiplas comparações foi utilizado Kruskal-Wallis e para comparações entre dois grupos foi realizado Teste t de Student com intervalo de confiança de 95% sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$. O curso da doença em animais depletados de linfócitos T CD8⁺ em comparação aos tratados com isotipo controle foi adicionado individualmente e a área sob a curva foi calculada usando o Prism (Graph Pad

Software). O significado dos resultados foi calculado usando o teste Mann Whitney.

6 RESULTADOS

6.1 Resposta imune celular no sítio de inoculação da *L. braziliensis*.

O primeiro passo deste trabalho foi avaliar o recrutamento e a resposta de linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ para o sítio de infecção, após inoculação intradérmica de *L. braziliensis*. Para tanto, camundongos BALB/c foram infectados com *L. braziliensis* e eutanasiados após 5 semanas. A Figura 1A mostra que existe uma pequena porcentagem de linfócitos T CD8⁺ na orelha de camundongos BALB/c *naïve* e que esta porcentagem aumenta em torno de sete vezes após cinco semanas de infecção por *L. braziliensis*. Por outro lado, existe uma população residente de linfócitos T CD4⁺ na orelha de animais *naïve* e a porcentagem destes linfócitos aumenta em torno de 2,5 vezes após cinco semanas de infecção por *L. braziliensis*. Embora a magnitude do aumento seja menor para linfócitos T CD4⁺, em relação aos T CD8⁺, estes estão em maior número no tecido.

Ao avaliar a produção das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, observamos um aumento na porcentagem de linfócitos T CD4⁺ produtores destas citocinas após infecção (Figura 1B). Por outro lado, a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtora de IFN- γ não aumentou após a infecção enquanto que a porcentagem de células produtoras de IL-10 diminuiu (Figura 1C). No entanto, estes linfócitos apresentam um aumento discreto na produção de TNF- α , após a infecção, e um importante aumento na produção de Granzima B.

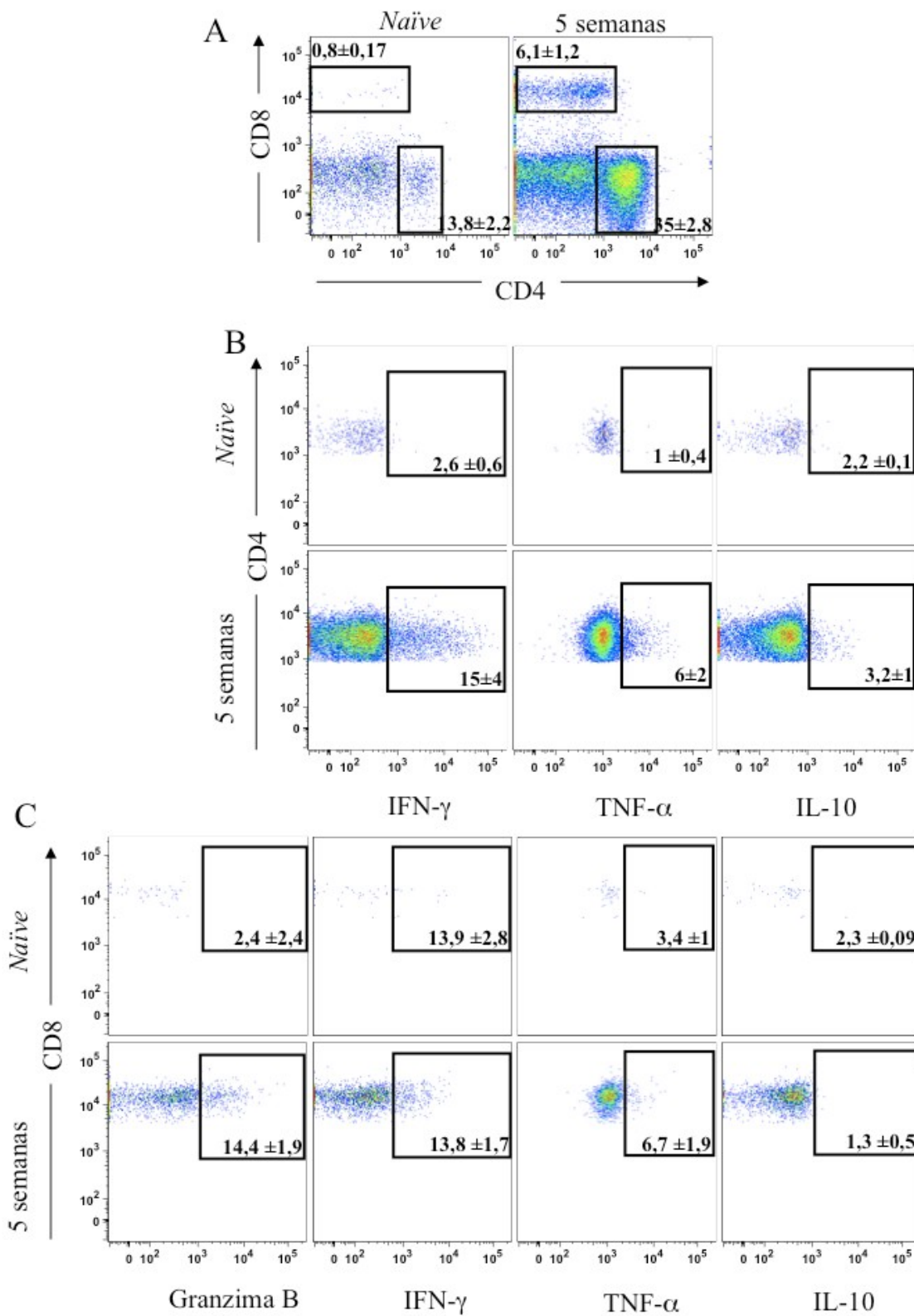


Figura 1– A infecção por *L. braziliensis* induz o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o

sítio de infecção e a produção de Granzima B. Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* foram eutanasiados cinco semanas após a infecção e o recrutamento (A) e a produção de citocinas e de Granzima B por linfócitos T CD4⁺ (B) e T CD8⁺ (C), presentes na lesão, foram avaliados por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD3⁺. Os valores mostrados correspondem à média ± desvio padrão da porcentagem de células positivas para os marcadores e são referentes a dois experimentos, realizados com 3 camundongos cada um.

6.2 Resposta imune celular no linfonodo de drenagem da orelha em camundongos infectados por *L. braziliensis*.

Ao analisarmos a resposta no linfonodo, também cinco semanas após infecção, podemos observar que a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-10 aumentou (Figura 2A). Por outro lado, somente a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ e de TNF- α aumentou. A população de células produtoras de IL-10 não foi alterada após a infecção e não observamos linfócitos T CD8⁺, produtores de Granzima B, no linfonodo, após a infecção por *L. braziliensis* (Figura 2B). Portanto, os resultados mostram que na infecção experimental por *L. braziliensis*, ocorre um recrutamento de linfócitos T CD8⁺ produtores de IFN- γ para a orelha mas a maior quantidade de células produtoras desta citocina encontra-se no linfonodo. Por outro lado, os linfócitos produtores de Granzima B só foram detectados no sítio de infecção.

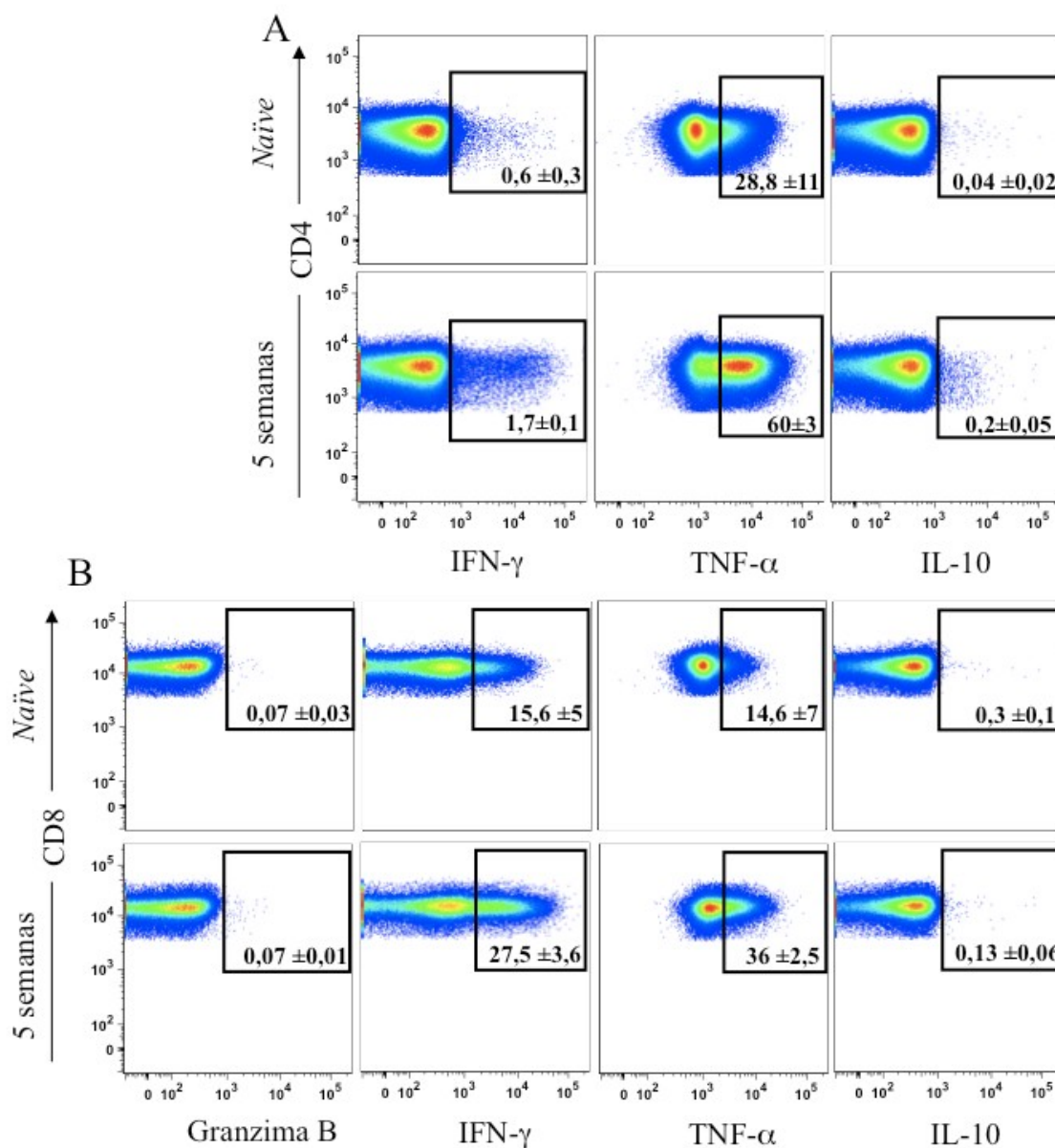


Figura 2 – Na infecção por *L. braziliensis*, linfócitos T CD8⁺ no linfonodo de drenagem produzem IFN- γ mas não produzem Granzima B. Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* foram eutanasiados cinco semanas após a infecção e a produção de citocinas e de Granzima B por linfócitos T CD4⁺ (A) e T CD8⁺ (B), no linfonodo de drenagem, foi avaliada por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD3⁺. Os valores mostrados correspondem à média \pm desvio padrão da porcentagem de células positivas para os marcadores e são referentes a dois experimentos, realizados com 3 camundongos cada um.

6.3 Infecção por *L. braziliensis*, desenvolvimento de lesão e avaliação da carga parasitária na ausência de linfócitos T CD8⁺

Com o intuito de determinar o efeito da ausência de linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental por *L. braziliensis*, camundongos BALB/c e C57BL/6 foram tratados com anti-CD8 um dia antes da infecção e, subseqüentemente, duas vezes por semana até o fim do experimento. Na figura 3A, podemos observar que os animais infectados com *L. braziliensis* e tratados com anticorpo isotipo controle desenvolveram uma lesão que curou espontaneamente, conforme descrito previamente (De Moura *et al.*, 2005). Surpreendentemente, camundongos BALB/c tratados com anti-CD8 controlaram o desenvolvimento da lesão (Figura 3A). Além disso, em camundongos C57BL/6, a ausência de linfócitos T CD8⁺ também permitiu um maior controle da infecção (Figura 3B), embora este efeito tenha sido menos proeminente quando comparado aos animais BALB/c. A redução significativa foi observada quando calculamos a área sob a curva, que representa o tempo de doença (gráficos no canto inferior direito nas Figuras 3A e 3B).

Para confirmar estes resultados, utilizamos camundongos deficientes em CD8 ou β_2 -microglobulina (β_2m), polipeptídeo que faz parte da formação do MHC classe I, fundamental para o desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos maduros. Em animais CD8^{-/-} (Figura 3C) ou $\beta_2m^{-/-}$ (Figura 3D), a lesão foi menor em comparação aos camundongos selvagens. Portanto, na ausência de linfócitos T CD8⁺ existe um maior controle da infecção por *L. braziliensis*.

Ao avaliarmos a carga parasitária nos camundongos BALB/c após cinco semanas de infecção, observamos que existe uma diminuição na quantidade de parasitas na lesão dos animais tratados com anti-CD8 em relação ao grupo controle (Figura 3E), embora este efeito não seja significativo (n=3). Na figura 3F, podemos ver que existe uma redução significativa de parasitas na lesão dos animais $\beta_2m^{-/-}$ em relação aos camundongos selvagens (n=6). Sendo assim, podemos concluir que a ausência de linfócitos T CD8⁺ é benéfica para camundongos infectados por *L. braziliensis*, tanto em animais BALB/c quanto em animais C57BL/6, levando não só ao controle do desenvolvimento da lesão, bem como a uma redução na carga parasitária no sítio de infecção.

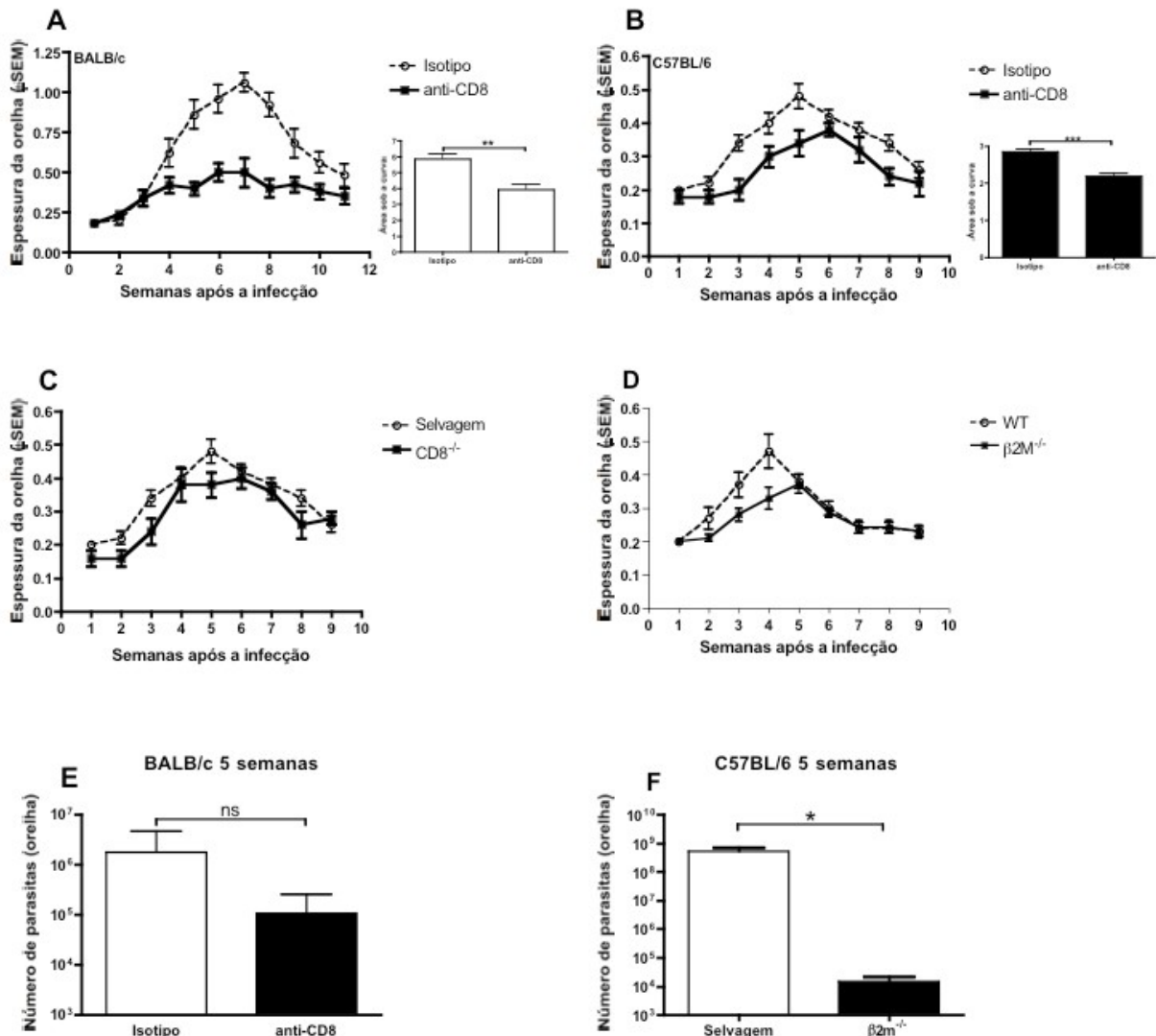


Figura 3 – A ausência de linfócitos T CD8⁺ reduz a lesão e carga parasitária após a infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c (A) e C57BL/6 (B) foram infectados com *L. braziliensis* e depletados de linfócitos CD8. Animais deficientes em CD8a (C) ou em β 2m (D) foram infectados e, em todos os grupos, a lesão foi monitorada semanalmente. Os dados mostrados representam a média \pm erro padrão e são referentes a pelo menos dois experimentos, realizados com 5 camundongos por grupo. Os gráficos em barra no canto inferior direito em A e B representam o desenvolvimento da doença. As cargas parasitárias para camundongos BALB/c tratados com anti-CD8 (n=3) (E) e para camundongos C57BL/6 β 2m^{-/-} (n=6) (F) foram determinadas por diluição limitante. * $p < 0,05$. Os dados mostrados representam a média e o erro padrão e são referentes a 3 experimentos.

6.4 Infecção por *L. braziliensis* e resposta imune celular na ausência de linfócitos T CD8⁺

O nosso próximo passo foi avaliar a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ na ausência de linfócitos T CD8⁺. Assim, animais foram tratados com anti-CD8 ou com o isótopo controle, como descrito anteriormente. Cinco semanas após a infecção, os animais foram eutanasiados e a produção de citocinas foi determinada por citometria de fluxo. Na figura 4A observamos que não houve recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o sítio de infecção nos animais tratados com anti-CD8. Outro dado importante nesta mesma figura é a demonstração de que não existe alteração no recrutamento de linfócitos T CD4⁺ para o sítio de infecção, mesmo na ausência de linfócitos T CD8⁺. Da mesma maneira, a figura 4B nos mostra que, nos linfócitos T CD4⁺, a porcentagem de células produtoras de citocinas (IFN- γ , TNF- α e IL-10) não se altera na ausência de linfócitos T CD8⁺, no sítio da infecção. O mesmo é observado no linfonodo (Figura 4C), ou seja, a ausência de linfócitos T CD8⁺ não tem qualquer efeito sobre a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de IFN- γ , TNF- α e IL-10, na infecção por *L. braziliensis*. Portanto, estes resultados sugerem que o efeito da diminuição da lesão observado em camundongos BALB/c depletados de linfócitos T CD8⁺ não é devido ao aumento da resposta Th1.

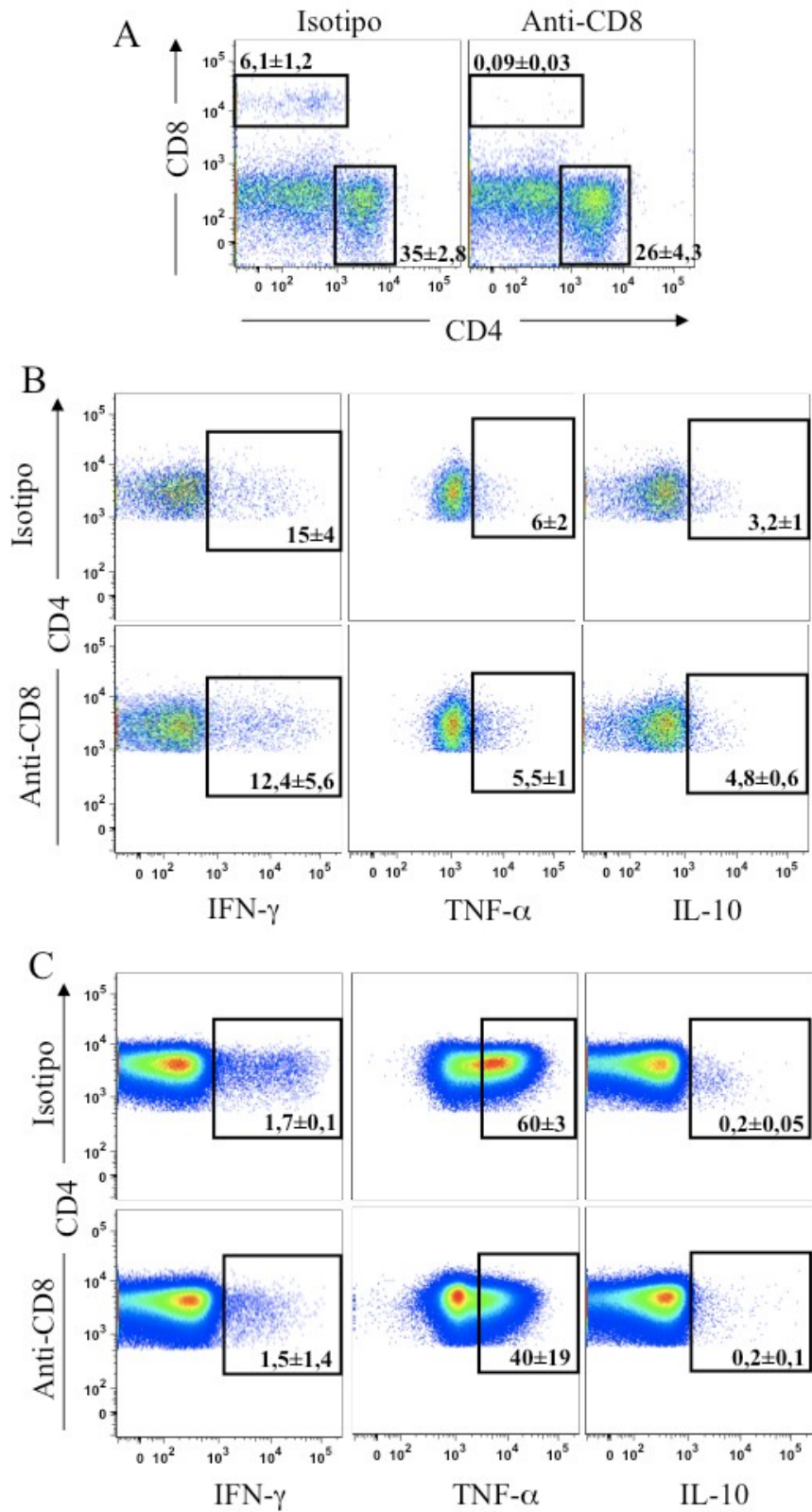


Figura 4 – Na ausência de linfócitos T CD8⁺, a resposta de linfócitos T CD4⁺ não se altera.

Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* foram depletados de linfócitos T CD8⁺ e foram eutanasiados cinco semanas após a infecção. O recrutamento (A) e a produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ na orelha (B) e no linfonodo de drenagem (C) foi avaliada por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD3⁺. Os valores mostrados correspondem à média ± desvio padrão da porcentagem de células positivas para os marcadores e são referentes a dois experimentos, realizados com 3 camundongos cada um.

6.5 Resposta celular específica na ausência de linfócitos T CD8⁺.

Com intuito de confirmar os efeitos *ex vivo* observados na resposta de animais depletados de linfócitos T CD8⁺ (Fig. 5), obtivemos esplenócitos de animais *naïve*, de animais tratados com isotipo controle ou de animais tratados com anti-CD8. As células foram co-cultivadas com antígeno bruto de *L. braziliensis* e, em seguida, avaliamos tanto a proliferação celular quanto a produção de IFN- γ . Na Figura 5 podemos observar que existe um aumento na porcentagem de células produtoras de IFN- γ nos animais infectados em relação aos camundongos *naïve*, tanto após a co-cultura com antígeno quanto após a estimulação inespecífica com anti-CD3 e anti-CD28. No entanto, como observado nos experimentos *ex vivo*, não houve efeito significativo sobre a porcentagem de células produtoras de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺, após a depleção de CD8 ou após o tratamento com o anticorpo isotipo.

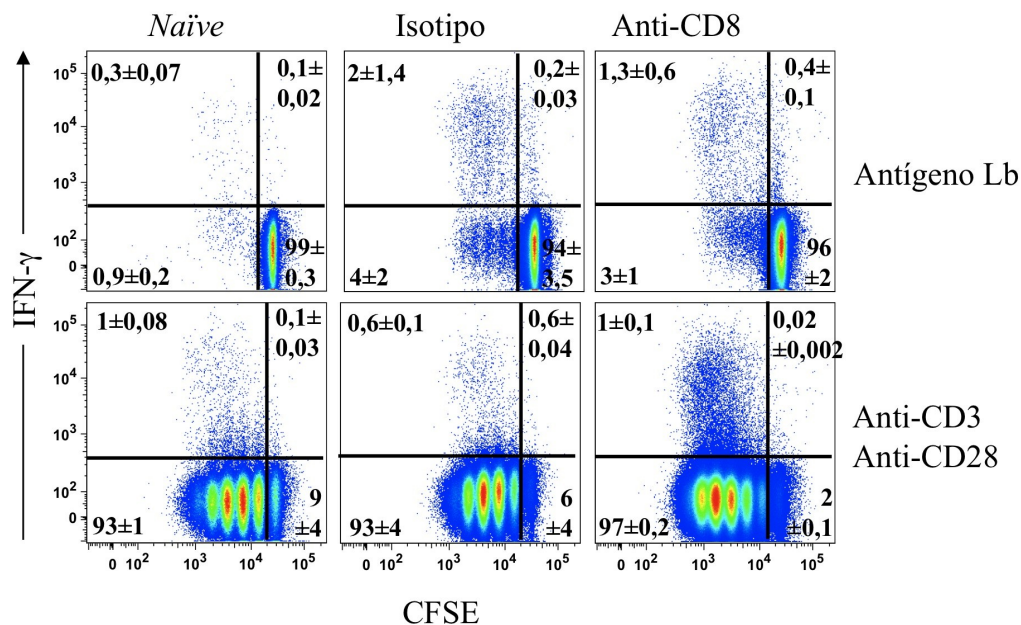


Figura 5 – A ausência de linfócitos T CD8⁺ não altera a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ após a infecção por *L. braziliensis*. Camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e depletados ou não de linfócitos T CD8⁺ foram eutanasiados cinco semanas após a infecção. Os esplenóticos foram marcados com CFSE e co-cultivados com antígeno bruto de *L. braziliensis* ou estimulados com anti-CD3-anti-CD28. Em seguida, a proliferação e a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ foi avaliada por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD3⁺. Os valores mostrados correspondem à média \pm desvio padrão da porcentagem de células positivas para os marcadores e são referentes a dois experimentos realizados com 3 camundongos cada um.

6.6 Histologia da lesão, na ausência de linfócitos T CD8⁺

Após cinco semanas de infecção, camundongos BALB/c controles ou depletados de linfócitos T CD8⁺ foram eutanasiados e as orelhas infectadas foram fixadas em formol a 10% e emblocados em parafina. Em seguida, avaliamos os cortes histológicos corados com H&E por microscopia ótica. Na figura 7A podemos observar o espessamento da orelha dos animais infectados com *L. braziliensis* e tratados com isotipo controle após cinco semanas. Conforme observado durante o curso da doença (Figura 3A), a espessura da orelha dos animais depletados de linfócitos T CD8⁺ (Figura 6B) é menor em relação aos camundongos tratados com isotipo controle (Figura 6A).

Em maior aumento (20X) podemos ver um denso infiltrado inflamatório em ambos os grupos (depletados ou não de linfócitos T CD8⁺) (Figuras 6C e 6D), assim como sinais de regeneração do tecido. Nos animais controle, o infiltrado inflamatório é predominantemente mononuclear, mas também são observados neutrófilos e eosinófilos (Figuras 6C e 6E). Por outro lado, nos animais depletados de linfócitos T CD8⁺, a presença de polimorfonucleares predomina no sítio de infecção e parasitas viáveis são escassos (Figuras 6D e 6F).

Os dados histológicos sugerem que existe recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para o sítio de infecção após a infecção por *L. braziliensis*, contudo, este é mais intenso nos animais depletados de linfócitos T CD8⁺.

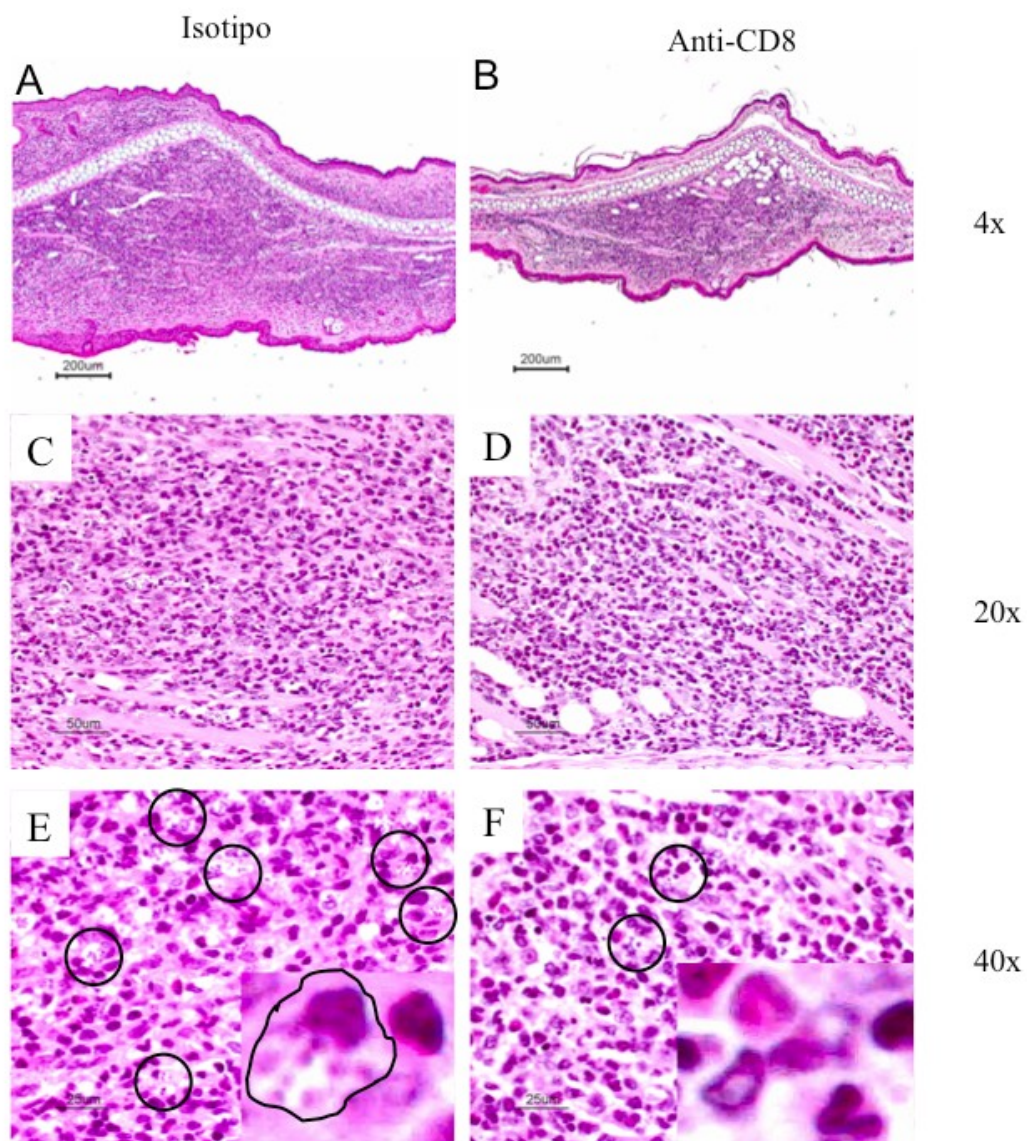


Figura 6 – Neutrófilos são recrutados para o sítio de infecção em maior proporção em camundongos depletados de linfócitos T CD8⁺. Camundongos BALB/c *naïve* ou infectados com *L. braziliensis*, depletados ou não de linfócitos T CD8⁺, foram eutanasiados cinco semanas após a infecção. Secções dos tecidos foram obtidas e coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica.

6.7 Recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção.

Com o intuito de confirmar o aumento no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção, após a depleção de linfócitos T CD8⁺ (Figura 6F), avaliamos *ex vivo*, por citometria de fluxo, a porcentagem de células CD11b⁺Ly6G⁺Ly6C⁻ na orelha (Figura 7A). Após duas semanas de infecção por *L. braziliensis*, observamos um aumento na porcentagem de neutrófilos na orelha ao compararmos camundongos *naïve* e infectados (Figura 7A). Como observado anteriormente nos cortes histológicos, os neutrófilos estão presentes em maior porcentagem na depleção de linfócitos T CD8⁺ quando comparados aos animais infectados tratados com isotipo controle.

Já foi demonstrado em infecção experimental por *L. major* que existe um recrutamento de monócitos inflamatórios (CD11b⁺Ly6C^{hi}), os quais se diferenciam em células dendríticas (CD11b⁺Ly6C^{hi} CD11c⁺) no sítio de infecção (Leon *et al.*, 2007). Sendo assim, avaliamos se, na ausência de linfócitos T CD8⁺, ocorrem alterações no recrutamento de células inflamatórias para o sítio de infecção (Figura 7B). Para tal, os animais foram eutanasiados após duas semanas e o recrutamento de diferentes populações de células foi avaliada *ex vivo* por citometria de fluxo. Podemos observar que ocorre um recrutamento de monócitos inflamatórios (CD11c⁻Ly6C^{hi}) similar em camundongos isotipo e depletados (Figura 7B). Da mesma maneira, a porcentagem de células dendríticas derivadas de monócitos (Ly6C^{hi}CD11c⁺) também aumentou em animais infectados em relação aos camundongos *naïve*. No entanto, não observamos alteração nas porcentagens destas populações em animais tratados com isotipo ou depletados de linfócitos T CD8⁺ (Figura 7B).

Portanto, é possível concluir que o fenótipo de diminuição de lesão, na ausência de linfócitos T CD8⁺, pode ser correlacionado com aumento do recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Além disso, este efeito não é decorrente de uma aumento ou diminuição no recrutamento e diferenciação de populações de células dendríticas inflamatórias.

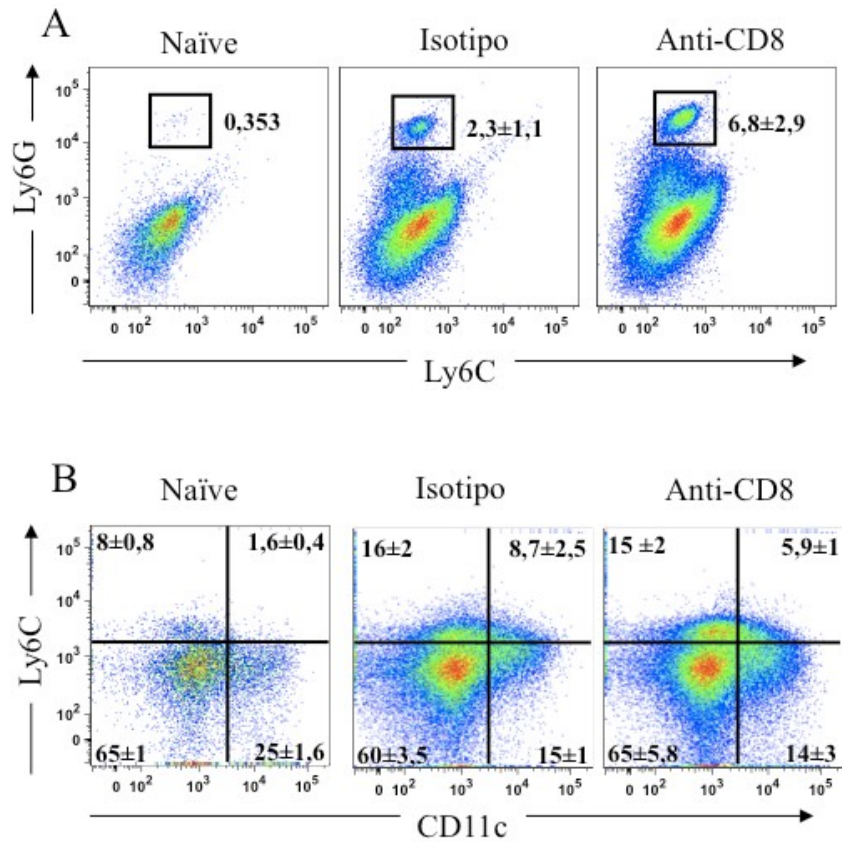


Figura 7 – Na infecção por *L. braziliensis*, a ausência de linfócitos T CD8⁺ induz aumento no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Camundongos BALB/c *naïve* ou infectados com *L. braziliensis*, depletados ou não de linfócitos T CD8⁺, foram eutanasiados duas semanas após a infecção. O recrutamento de neutrófilos (A), de monócitos inflamatórios (CD11c⁻ Ly6C^{hi}) e de DCs derivadas de monócitos (Ly6C^{hi}CD11c⁺) (B) para o sítio de infecção foi avaliado por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD11b⁺. Os valores mostrados correspondem à média ± desvio padrão da porcentagem de células positivas para os marcadores e são referentes a dois experimentos, realizados com 3 camundongos cada um.

6.8 Efeito da transferência de linfócitos T no desenvolvimento da lesão em camundongos RAG^{-/-}.

Camundongos deficientes de RAG apresentam falha no desenvolvimento de linfócitos T e B maduros e são amplamente usados para estudar a função destas células em diferentes modelos. Sendo assim, utilizamos a estratégia de transferência adotiva para amplificar o papel dos linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental por *L. braziliensis*. Para tanto, linfócitos T CD8⁺ ou T CD4⁺ de camundongos *naïve* ou imunes, infectados há mais de 10 semanas, foram purificados e transferidos para camundongos deficientes em RAG. Como mostrado na Fig. 8, confirmamos que a transferência de linfócitos T CD4⁺ e/ou T CD8⁺, de animais *naïve* ou imunes é capaz de restaurar a respectivas populações em animais deficientes em RAG.

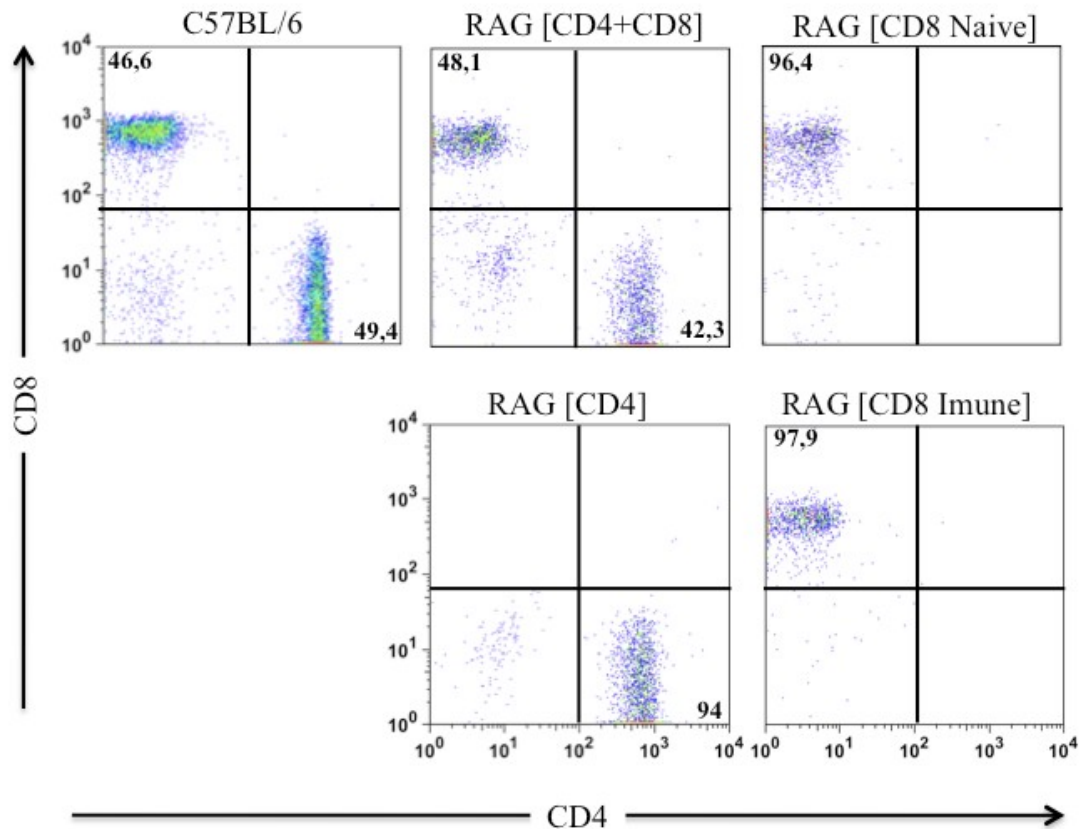


Figura 8 – Transferência de linfócitos T CD8⁺ ou T CD4⁺ para camundongos RAG^{-/-}. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ de camundongos *naïve* ou imune (infectados há mais de 10 semanas) foram purificadas por seleção magnética e foram transferidas para camundongos RAG^{-/-}. Em seguida, os camundongos RAG^{-/-} ou selvagens foram infectados com *L. braziliensis* e foram tratados com anti-CD4 (para os transferidos com T CD8⁺) ou com anti-CD8 (para os transferidos com T CD4⁺), por duas semanas. Quatro semanas após a infecção, a pureza das populações presentes nos animais foi determinada por citometria. Os dot plots mostrados são representativos de experimentos realizados com cinco camundongos por grupo.

A transferência adotiva foi realizada como descrito acima e os animais recipientes foram, em seguida, infectados na derme da orelha com 10⁵ *L. braziliensis* e o desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente. Na Figura 9A é possível observar que camundongos RAG^{-/-} infectados com *L. braziliensis* não desenvolveram lesão. Camundongos C57BL/6 selvagens (WT) desenvolveram uma lesão discreta, como observado anteriormente (Figura 3). No entanto,

camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos *naïve* apresentam uma lesão que aumentou progressivamente (Figura 9A). Por outro lado, os camundongos recipientes de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos imunes, apresentaram um retardo no aparecimento da lesão (Figura 9A). Em paralelo, os animais que receberam somente linfócitos T CD4⁺ ou linfócitos T CD4⁺/T CD8⁺ (obtidos de camundongos *naïve*) apresentaram perfil semelhante de desenvolvimento da lesão, sendo este similar ao observado em camundongos C57BL/6 WT (Figura 9B).

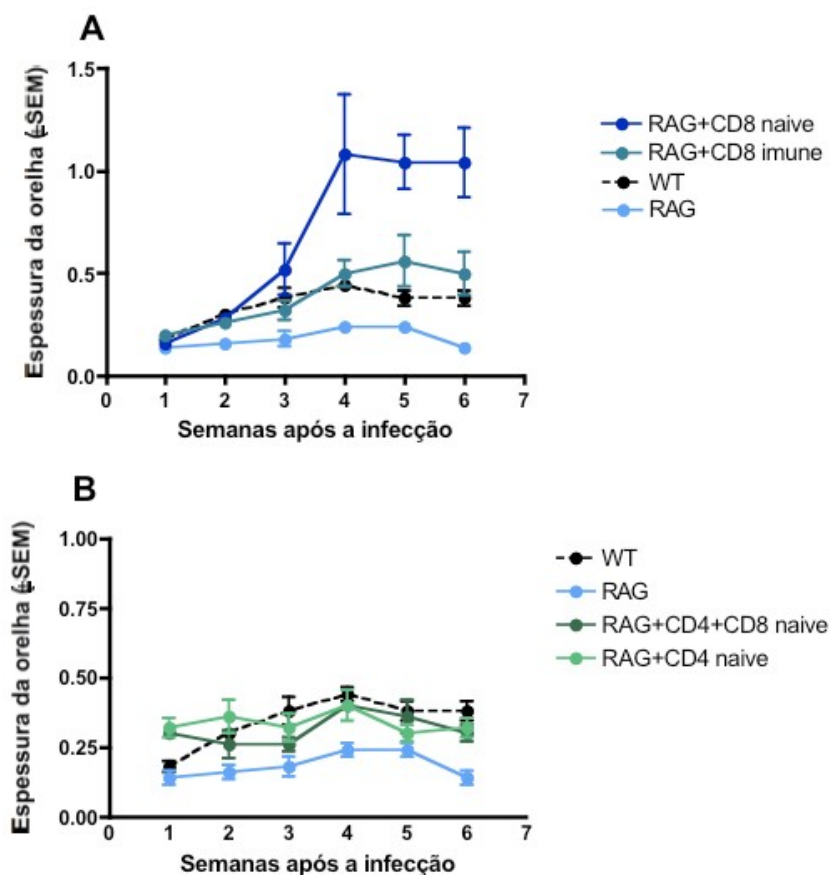


Figura 9 – A transferência de linfócitos T CD8⁺ induz patologia em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *naïve* ou imune e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, posteriormente infectados com *L. braziliensis*. O desenvolvimento da lesão nos camundongos recipientes de linfócitos T CD8⁺ *naïve* ou imune (A) ou T CD8⁺ /T CD4⁺ *naïve* ou T CD4⁺ somente (B) foi monitorado semanalmente. Os dados de lesão mostrados representam a média ± erro padrão e são referentes dois experimentos, realizados com 5 camundongos por grupo.

Na Figura 10, podemos ver que os animais que receberam linfócitos T CD8⁺ de animais *naïve* apresentaram intensa destruição tecidual, o que não foi observado nos recipientes de linfócitos T CD8⁺ de animais imunes, seis semanas após a infecção. Também de acordo com os dados de espessura da orelha mostrados anteriormente (Figura 9B), a transferência de células T CD4⁺ ou de células T CD4⁺/CD8⁺ não levou ao desenvolvimento de lesão (Figura 9B) ou à destruição tecidual (Figura 10). Ainda na Figura 10, podemos observar a variação dentro do grupo que recebeu linfócitos T CD8⁺ de camundongos imunes. Outro ponto importante a ser relatado refere-se ao aparecimento de lesões na orelha contra-lateral destes animais. Somente nos grupos recipiente de linfócitos T CD8⁺ observou-se este fenômeno (resultados não mostrados).

Com estes dados, podemos concluir que linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos no desenvolvimento da lesão e patogênese em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. Além disso, os dados nos mostram que este efeito é revertido pela presença de linfócitos T CD4⁺.

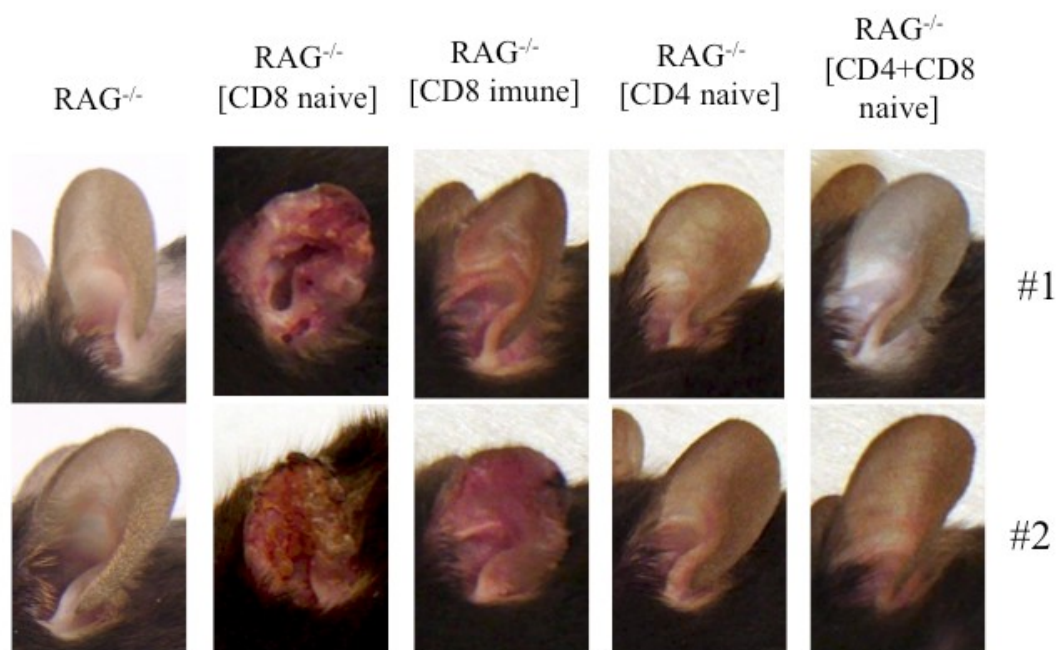


Figura 10 – Patologia induzida por linfócitos T CD8⁺ após a transferência para camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *naïve* ou imune e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. As fotos foram tiradas após seis semanas de infecção e são representativas de um grupo composto por cinco animais.

6.8 Histologia da leão dos camundongos deficientes em RAG transferidos com linfócitos T.

Após sete semanas de infecção, camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos ou animais controle foram eutanasiados e as orelhas infectadas foram fixadas em formol a 10% e emblocados em parafina. Em seguida, avaliamos os cortes histológicos corados com H&E por microscopia ótica.

Conforme mencionado anteriormente, a infecção por *L. braziliensis* não induz desenvolvimento de lesão em camundongos deficientes em RAG (Figura 9A, Figura 10), contudo, estes camundongos apresentam parasitas no sítio de infecção (Figura 11B). Podemos observar a espessura da orelha dos camundongos RAG^{-/-} após infecção por *L. braziliensis* (Figura 11A) e a presença de um infiltrado misto de células mononucleares e polimorfonucleares (Figura 11B). Em paralelo, observamos o efeito resultante da transferência de linfócitos T CD8⁺ (Figura 11C): um intenso infiltrado inflamatório e formação de crosta na superfície da orelha (Figura 11D), o que está de acordo com a observação de que estes animais apresentam intensa ulceração da orelha (Figura 10). Os animais infectados que receberam linfócitos T CD8⁺/TCD4⁺ não têm lesão aparente e os parasitas são escassos (Figura 11E e 11F).

Como esperado, os resultados de histologia sugerem que o infiltrado inflamatório é maior nos camundongos recipientes de linfócitos T CD8⁺ e que estes apresentam grande quantidade de parasitas no sítio de infecção, o que também observa-se nos animais deficientes em RAG. Por outro lado, após a transferência de linfócitos T CD8⁺/TCD4⁺, os parasitas são escassos após sete semanas de infecção e o tecido parece completamente recuperado.

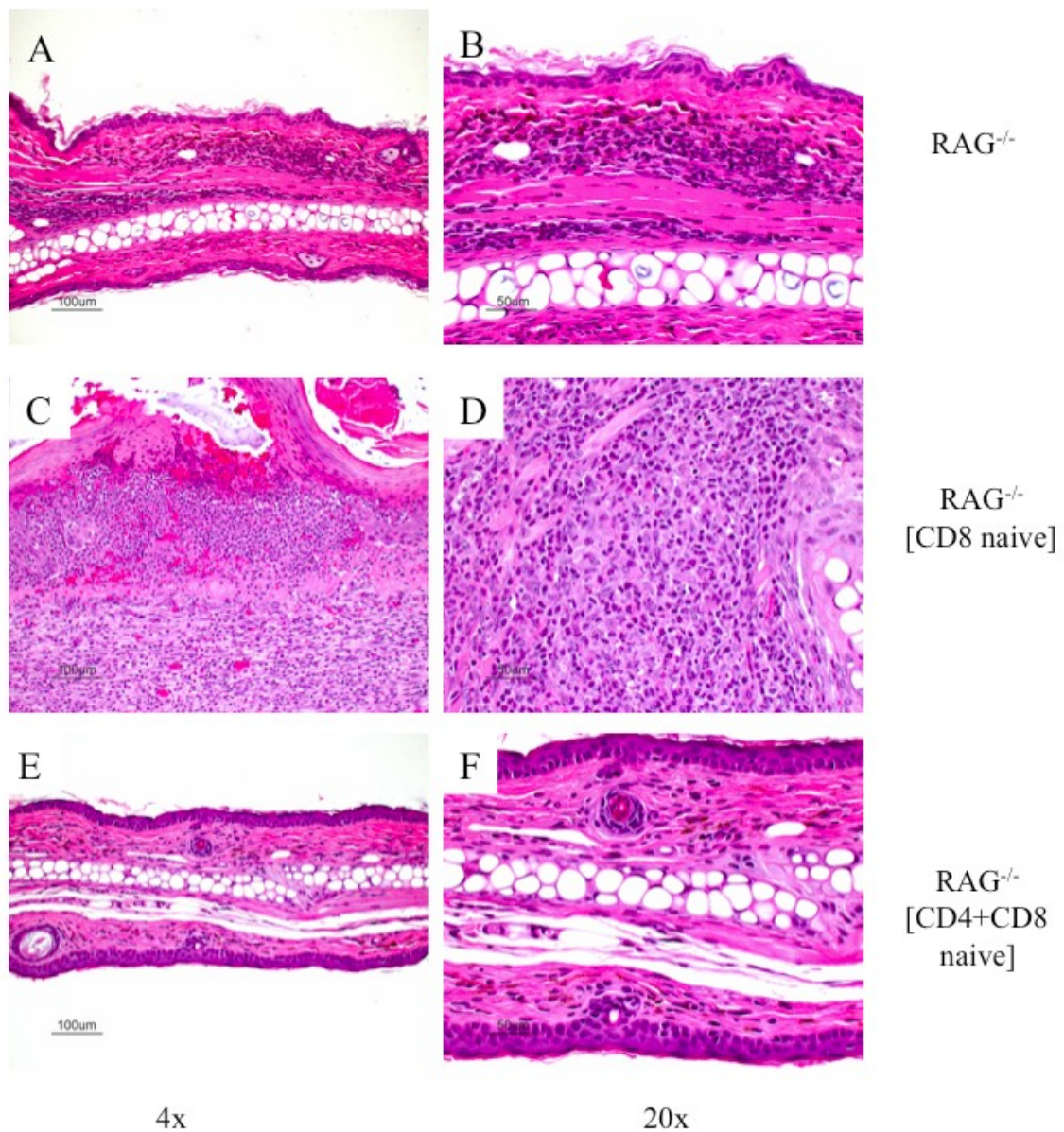


Figura 11 – Recrutamento celular em camundongos deficientes em RAG que receberam linfócitos T. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *naïve* ou imune e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. Secções dos tecidos foram obtidas sete semanas após a infecção e coradas com hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia óptica.

6.9 Determinação da carga parasitária de camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis* após transferência de linfócitos.

Sete semanas após a infecção, os camundongos que receberam linfócitos foram eutanasiados para a avaliação da carga parasitária na orelha e no baço. Em todos os grupos a carga parasitária foi realizada em três animais. Nos gráficos onde temos o número de parasitas de apenas um animal, outros dois animais foram avaliados, contudo o número de parasitas foi menor que o limite de detecção do teste ou o seu valor é negativo.

Na orelha infectada, encontramos uma grande quantidade de parasitas nos camundongos RAG^{-/-} (Figura 12A), embora estes animais não tenham qualquer sinal de lesão (Figura 10, Figura 11A). Não observamos diferenças importantes quando comparamos animais RAG^{-/-} ou que receberam linfócitos T CD8⁺, sejam estes provenientes de animais *naïve* ou imunes. No entanto, houve uma redução significativa na quantidade de parasitas nos animais que receberam linfócitos T CD4⁺ *naïve* somente e naqueles que receberam linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ em conjunto (Figura 12A). Além disso, não foi possível detectar parasitas em um animal de cada um dos grupos citados (T CD4⁺ *naïve* e T CD4⁺/CD8⁺ *naïve*).

Conforme mencionado anteriormente, camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺ *naïve* ou imunes apresentaram lesão na orelha contra-lateral similar àquela observada na orelha infectada. Sendo assim, também determinamos a quantidade de parasitas neste local bem como no baço para observar se houve metástase de parasitas para outros tecidos. Para nossa surpresa, nos animais que receberam linfócitos T CD8⁺ (*naïve* ou imunes), encontramos parasitas tanto na orelha (Figura 12B) quanto no baço (Figura 12C), embora os parasitas não tenham sido encontrados em todos os animais. Contudo, após 12 semanas de infecção, uma média de 10⁸ parasitas foi encontrada na orelha não infectada e no baço de todos os camundongos que receberam linfócitos T CD8⁺ (dados não mostrados).

Sendo assim, estes dados mostram que os linfócitos T CD8⁺ levam ao desenvolvimento da lesão após a infecção por *L. braziliensis* e, surpreendentemente, contribuem para a disseminação de parasitas em camundongos RAG^{-/-}. Além disso, podemos afirmar que linfócitos T CD4⁺ sozinhos são capazes de controlar a infecção por *L. braziliensis* neste modelo, e parecem ser responsáveis por neutralizar os efeitos patológicos desenvolvidos pelos linfócitos T CD8⁺ em camundongos RAG^{-/-}.

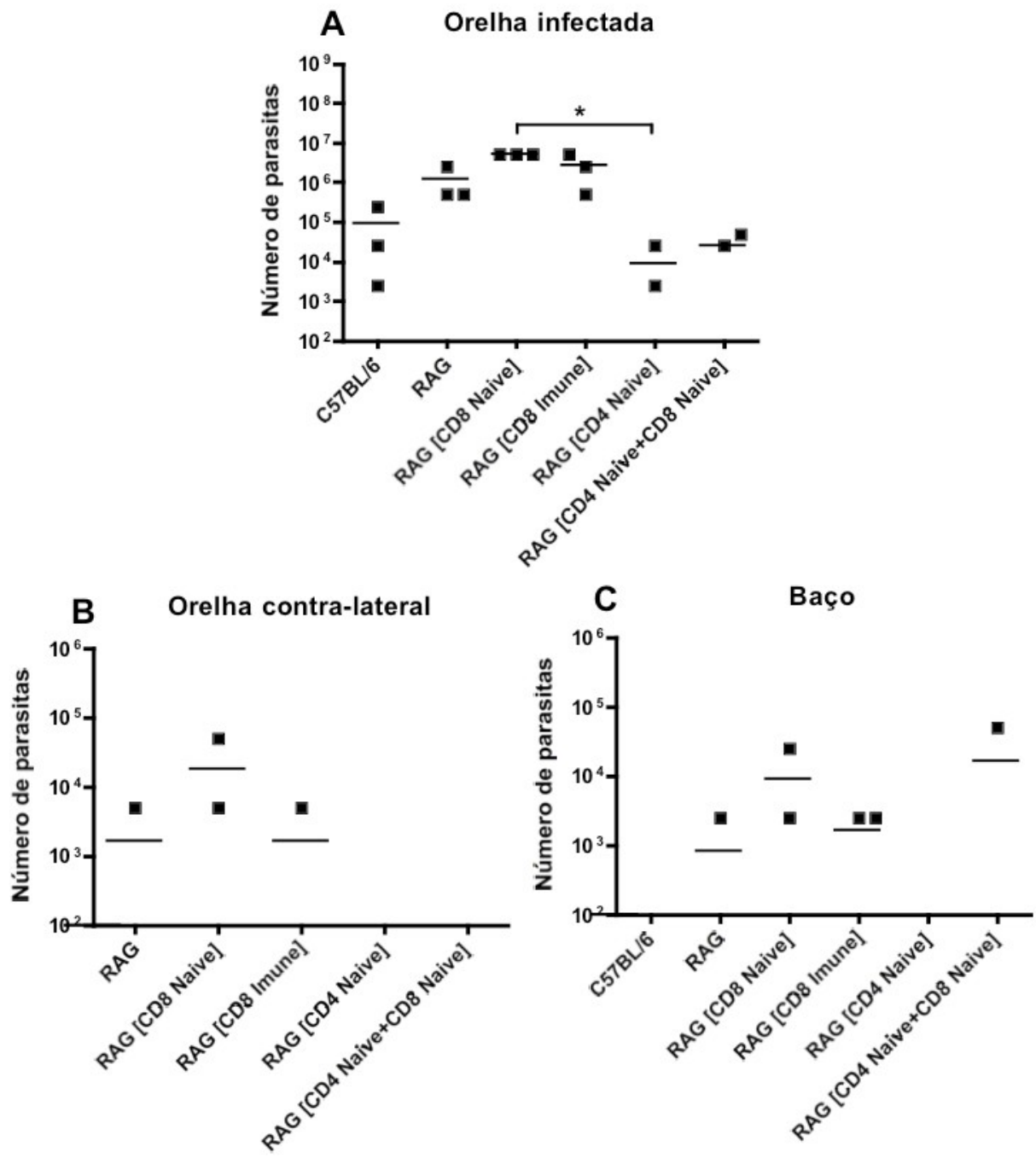


Figura 12 – A transferência de linfócitos T CD8⁺ não controla a carga parasitária em camundongos RAG^{-/-} e contribui para a metástase de parasitas. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *naïve* ou imune e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. Após sete semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária foi determinada por diluição limitante. Os dados mostrados representam a média e são referentes a dois experimentos realizados com 3 camundongos por grupo. * $p < 0,05$.

6.10 Avaliação de marcadores intracelulares em linfócitos T CD8⁺ em camundongos RAG^{-/-}, após a transferência de linfócitos.

Sete semanas após a infecção, os camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T foram eutanasiados e as orelhas foram avaliadas quanto à produção de citocinas. Como mostrado na Figura 13, a porcentagem de linfócitos T CD8⁺ produtores de Granzima B bem como de IFN- γ foi maior nos animais que receberam linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ em relação aos animais que receberam linfócitos T CD8⁺ de animais *naïve* ou de animais imunes (Figura 13A). Contudo, em valores absolutos, o número de células produtoras de Granzima B ou de IFN- γ é menor nos animais que receberam linfócitos T CD8⁺/T CD4⁺, em relação aos dois outros grupos (Figura 13B e C). De fato, a quantidade de linfócitos T CD8⁺ recrutada para a orelha infectada é sempre menor nos animais que receberam ambas populações celulares quando comparado ao número encontrado em animais que receberam linfócitos T CD8⁺ somente (dados não mostrados).

Avaliamos também a produção de TNF- α e IL-17 neste modelo inflamatório. Na figura 13A podemos observar que a transferência de qualquer uma das três populações (T CD8⁺ de camundongos *naïve*, de camundongos imunes ou T CD8⁺/T CD4⁺) leva ao aparecimento de células produtoras de TNF- α e IL-17. No entanto, a menor porcentagem foi encontrada nos animais que receberam linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos imunes. Não observamos diferenças na porcentagem de células produtoras de IL-17 em animais que receberam linfócitos T CD8⁺ de camundongos *naïve* ou que receberam linfócitos T CD8⁺/T CD4⁺.

Portanto, podemos concluir que tanto IFN- γ como Granzima B podem ser responsáveis pela patogênese observada nos camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺.

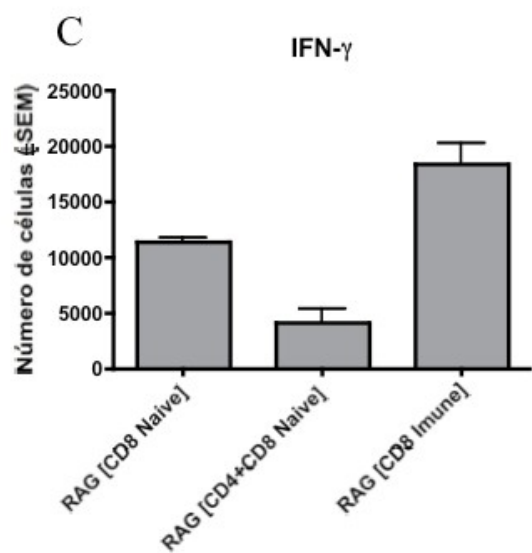
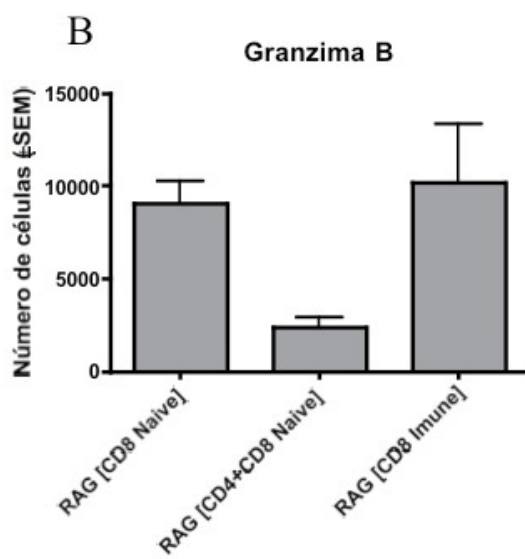
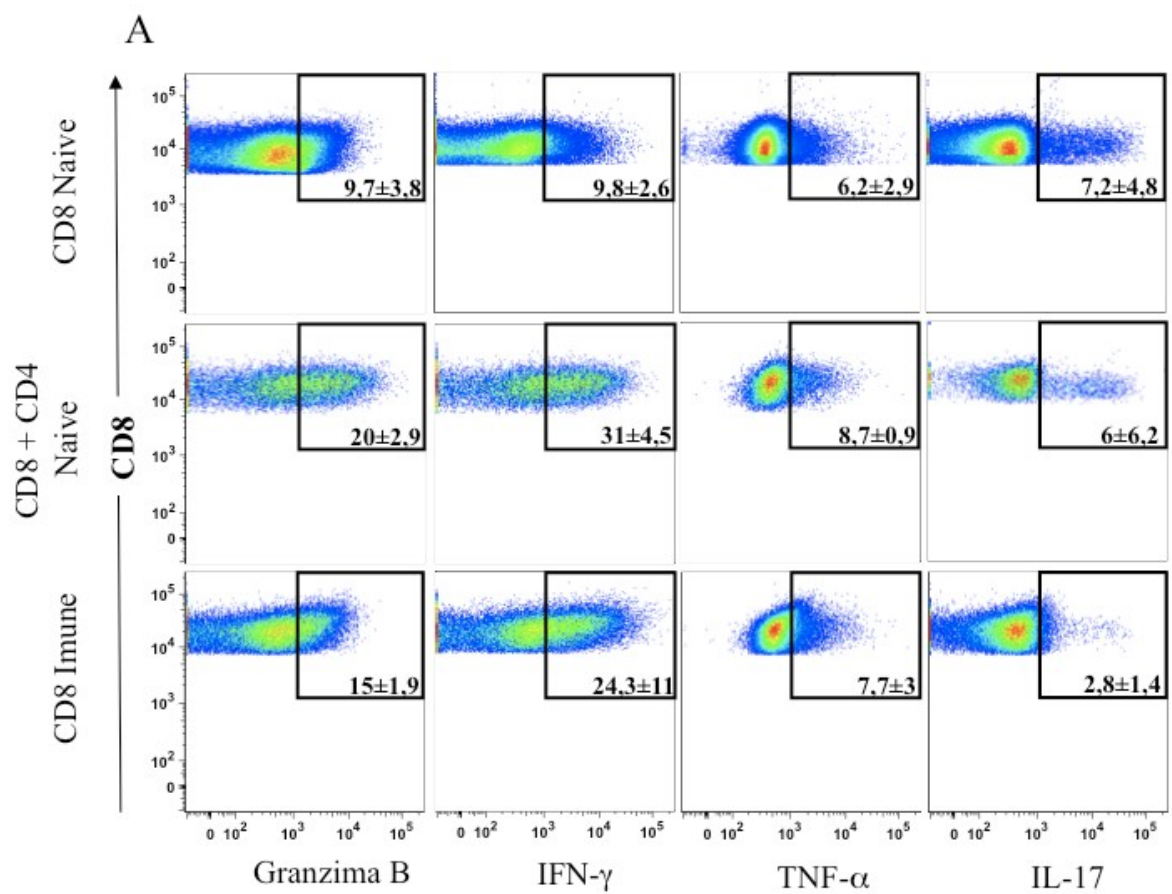


Figura 13 – Linfócitos T CD8⁺ recrutados para a orelha produzem majoritariamente IFN- γ e Granzima B em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *naïve* ou imune e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. Após sete semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e a porcentagem (A) e o número de células T CD8⁺ produtoras de Granzima B (B) e de IFN- γ (C), presentes na lesão, foi avaliado por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD3⁺. Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão e são referentes a dois experimentos, realizados com 3 camundongos por grupo.

6.11 Avaliação de marcadores intracelulares em linfócitos T CD4⁺ após a transferência de linfócitos para camundongos RAG^{-/-}.

Ao avaliarmos a produção de citocinas em camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD4⁺ *naïve*, não observamos qualquer diferença importante, seja na produção de IFN- γ , de TNF- α ou de IL-17, mesmo quando a transferência consistiu de linfócitos T CD8⁺/T CD4⁺ (Figura 14). Portanto, confirma-se o resultado observado em camundongos BALB/c, no qual na presença ou na ausência de linfócitos T CD8⁺, os linfócitos T CD4⁺ comportam-se da mesma maneira no que diz respeito à produção de citocinas (Figuras 4 e 5).

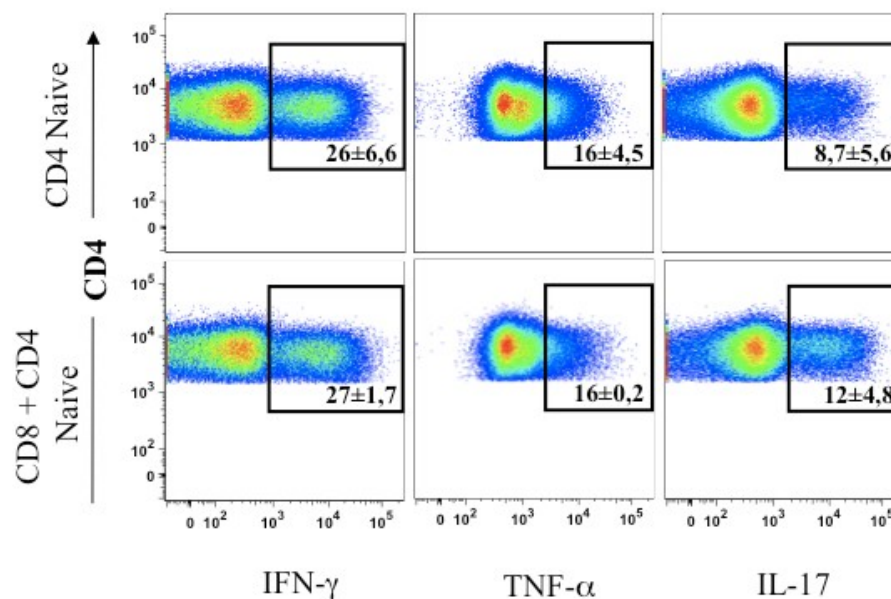


Figura 14 – Linfócitos T CD4⁺ recrutados para a orelha não alteram a produção de citocinas em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD4⁺ e T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *naïve* ou imune e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. Após sete semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e a porcentagem de células T CD4⁺ produtoras de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. Os *gates* foram feitos em células vivas, *singlets* e CD3⁺. Os dados mostrados representam a média \pm desvio padrão e são referentes a dois experimentos realizados com 3 camundongos por grupo.

6.12 Tamanho da lesão em camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺ provenientes de animais deficientes em IFN- γ ou em perforina.

Nos resultados anteriores, observamos um aumento importante na produção de IFN- γ e na capacidade citotóxica de linfócitos T CD8⁺ quando transferidos para os animais RAG^{-/-}. Para determinar a importância destes marcadores na patogênese induzida nos animais RAG^{-/-}, transferimos linfócitos T CD8⁺ purificados de camundongos selvagens, deficientes em IFN- γ ou em perforina, todos *naïve*, no momento da infecção com 10⁵ *L. braziliensis*. Como mostrado na Fig. 15, a transferência de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos selvagens ou deficientes é capaz de restaurar a população de linfócitos T CD8⁺ em animais RAG^{-/-}.

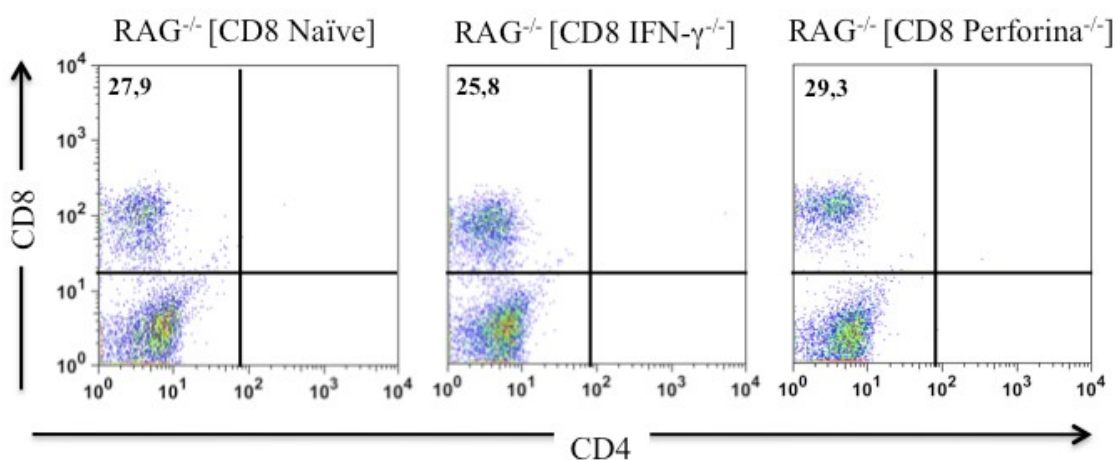


Figura 15 – Transferência de linfócitos T CD8⁺ para camundongos RAG^{-/-}. (A) As células T CD8⁺ de camundongos selvagens, deficientes em IFN- γ ou em perforina foram purificados por seleção negativa em colunas magnéticas e transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}. Em seguida, os camundongos RAG^{-/-} ou selvagens foram infectados com 10⁵ promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* e foram tratados com anti-CD4, por duas semanas. Quatro semanas após a infecção, a pureza das populações presentes nos animais que foi determinada por citometria. Os dot plots mostrados são representativos de experimentos realizados com cinco camundongos por grupo.

Como observado anteriormente (Figura 9), não houve desenvolvimento de lesão nos camundongos RAG^{-/-} (Figura 16). Contudo, houve um crescimento progressivo na lesão de animais que receberam linfócitos T CD8⁺ de camundongos selvagens (WT) e o mesmo efeito foi observado nos animais que receberam linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos IFN- γ ^{-/-} (Figura 16). Surpreendentemente, animais que receberam linfócitos T CD8⁺ de camundongos deficientes em perforina apresentaram retardo no aparecimento da lesão (Figura 16).

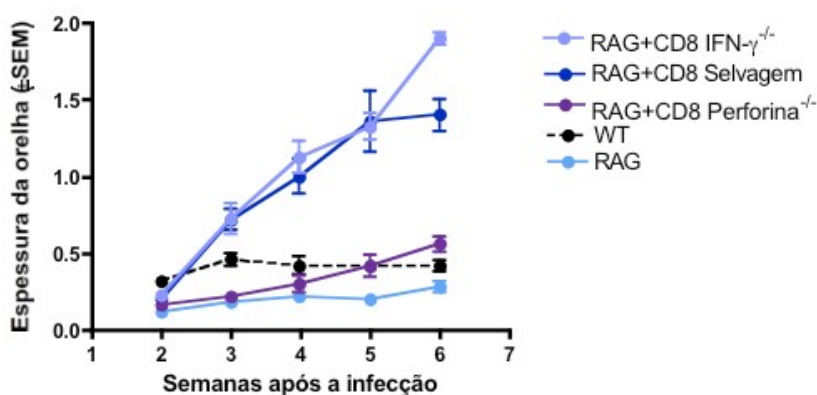


Figura 16 – A presença de perforina é responsável pela patologia observada em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *selvagens* (WT) ou deficientes (IFN- γ ^{-/-} ou perforina^{-/-}) e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. O desenvolvimento da lesão foi monitorado semanalmente. Os dados mostrados representam a média \pm erro padrão e são referentes um experimento realizado com 5 camundongos por grupo.

Com mostrado na Figura 17, camundongos que receberam linfócitos T CD8⁺ de animais

selvagens ou de animais IFN- γ ^{-/-} apresentaram extensa destruição tecidual. Por outro lado, a transferência de linfócitos T CD8⁺ de camundongos deficientes em perforina não causou nenhuma alteração no tecido. Sendo assim, o mecanismo de citotoxicidade induzido por perforina/granzima está diretamente envolvido no desenvolvimento da lesão em camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺ (Figura 16).

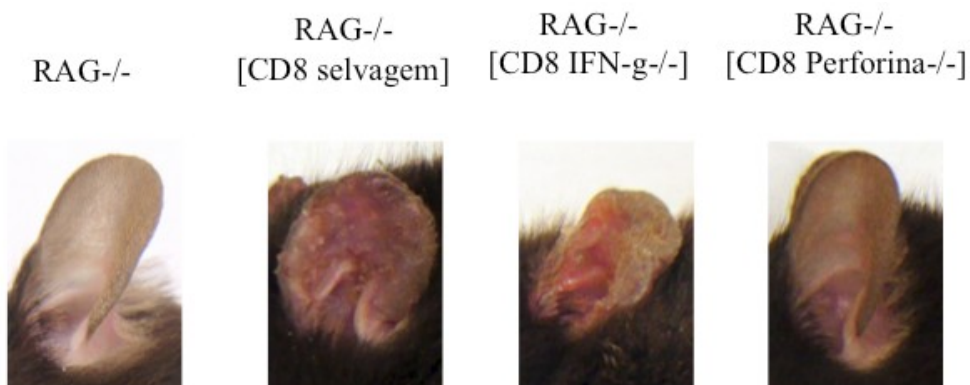


Figura 17 – A citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8⁺ é responsável pela patologia observada em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD8⁺ foram obtidas de camundongos *selvagens* (WT) ou deficientes (IFN- γ ^{-/-} ou perforina^{-/-}) e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. As fotos foram tiradas após cinco semanas de infecção e são representativas de um grupo composto por cinco animais.

6.13 Carga parasitária em camundongos RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺ provenientes de animais deficientes em IFN- γ ou em perforina.

Ao avaliarmos a quantidade de parasitas presentes no sítio de infecção, após sete semanas, observamos mais uma vez que não existem diferenças significantes entre os animais RAG^{-/-} que receberam ou não linfócitos T CD8⁺ (Figura 18A). Além disso, os camundongos que receberam linfócitos T CD8⁺ de animais deficientes em IFN- γ ou em perforina também não apresentaram diferença na quantidade de parasitas na orelha infectada (Figura 18A). Contudo, na ausência de perforina, a metástase dos parasitas para a orelha contra-lateral (Figura 18B) e para o baço (Figura 18C) foi menor quando comparada à observada nos animais que receberam linfócitos T CD8⁺ ou T CD8⁺ deficientes em IFN- γ . Portanto, na ausência de perforina, embora a lesão seja menor nos animais recipientes (Figura 16), a quantidade de parasitas no sítio de infecção não reflete este efeito. Sobretudo, a ausência de perforina impede a disseminação de *L. braziliensis* em camundongos RAG^{-/-}.

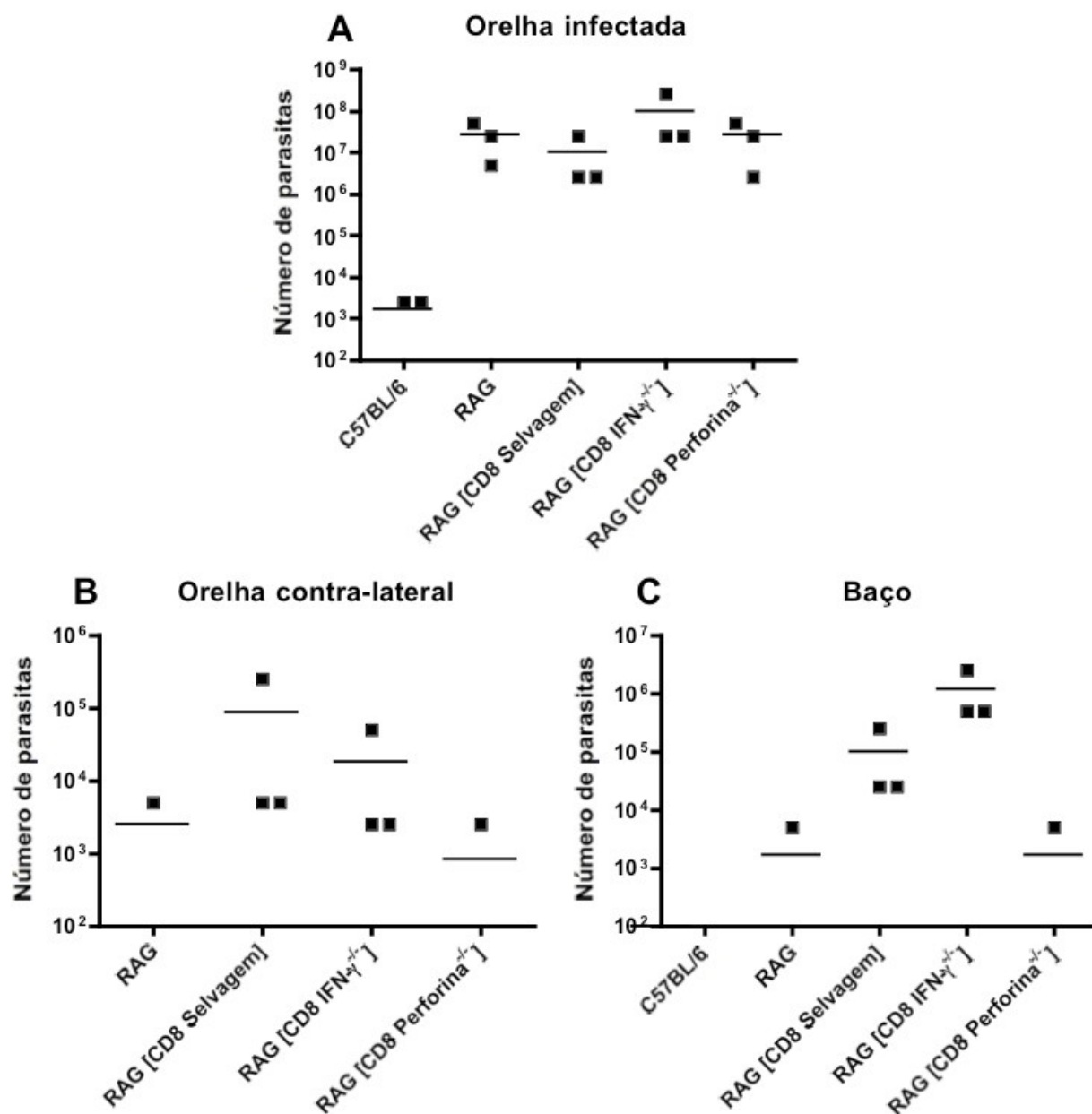


Figura 18 – Ausência de perforina em linfócitos T CD8⁺ impede a metástase de parasitas, em camundongos RAG^{-/-} infectados por *L. braziliensis*. As células T CD8⁺ foram obtidas de camundongos selvagens (WT) ou deficientes (IFN- γ ^{-/-} ou perforina^{-/-}) e foram transferidas por via endovenosa para os camundongos RAG^{-/-}, subsequentemente infectados com *L. braziliensis*. Após sete semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária foi determinada por diluição limitante. Os dados mostrados representam a média e são referentes um experimento com 5 camundongos por grupo.

7 DISCUSSÃO

Linfócitos T CD8⁺ são células do sistema imune adaptativo também chamados de linfócitos T citotóxicos por sua capacidade de induzir a morte de células que apresentam antígenos estranhos ligados ao MHC classe I. O papel protetor dos linfócitos T CD8⁺ está descrito em muitos modelos de infecção por vírus e tumores, mas estas células também estão envolvidas no controle da infecção por parasitas intracelulares, através da produção de citocinas e da indução de citotoxicidade (rev. em Jordan e Hunter, 2010). No entanto, diversos modelos infecciosos mostram que linfócitos T CD8⁺ ativados também são capazes de induzir patologia.

Inicialmente, o papel dos linfócitos T CD8⁺ na infecção por *Leishmania* foi considerado controverso. Diversos trabalhos usando o modelo de infecção subcutânea com altas doses (1 milhão) de *L. major* mostram que animais deficientes em linfócitos T CD8⁺ ou em β_2 -m controlam a infecção, sugerindo que os linfócitos T CD8⁺ não são importantes no curso da infecção por *L. major* (Overath e Harbecke, 1993; Wang *et al.*, 1993; Huber *et al.*, 1998). No entanto, recentemente foi demonstrado que linfócitos T CD8⁺ são fundamentais para o controle de *L. major* em infecções com baixas doses (mil) de parasitas (Belkaid *et al.*, 2002; Uzonna *et al.*, 2004) bem como na resistência contra a re-infecção (Belkaid *et al.*, 2002; Rafati *et al.*, 2002). O papel dos linfócitos T CD8⁺ na infecção experimental por *L. braziliensis* ainda não foi investigado. Porém, estudos feitos com pacientes apontam para o papel citotóxico destas células, associando-as ao desenvolvimento da lesão (Brodskyn *et al.*, 1997; Faria *et al.*, 2009).

Neste trabalho, mostramos pela primeira vez o recrutamento dos linfócitos T CD8⁺ e T CD4⁺ na infecção experimental por *L. braziliensis*, usando a via intradérmica de inoculação. Após o recrutamento, observamos que ambos subtipos de linfócitos produzem, entre as citocinas analisadas, preferencialmente IFN- γ . Classicamente, o controle da infecção por *Leishmania* dá-se por meio da produção de IFN- γ que, por sua vez, induz a ativação dos macrófagos infectados e a morte do parasita intracelular por produção de óxido nítrico (rev. em Reiner e Locksley, 1995). A produção de IFN- γ foi associada ao controle da infecção por *L. braziliensis* (Dekrey *et al.*, 1998; De Moura *et al.*, 2005).

Outro dado relevante observado foi a produção de Granzima B pelos linfócitos T CD8⁺, no sítio de infecção. Neste modelo observamos também que existem diferenças na produção de IFN- γ e Granzima B pelos linfócitos T CD8⁺ no sítio de infecção, em relação ao linfonodo de

drenagem. Já está demonstrado para linfócitos T CD8⁺ de memória que localizações distintas implicam em diferentes funções (Marzo *et al.*, 2007). Neste trabalho os autores mostram que a produção de Granzima B é preferencialmente detectada em órgãos não linfóides e que somente estas células são capazes de induzir a lise de células-alvo *in vitro*. Os nossos resultados estão de acordo com a literatura pois demonstram que a capacidade citotóxica dos linfócitos T CD8⁺ está restrita ao sítio de infecção, onde existe eliminação dos parasitas, e que estes produzem IFN- γ preferencialmente no linfonodo de drenagem, onde existe persistência da *L. braziliensis*.

Um dos resultados mais importantes do nosso trabalho é a demonstração de que a ausência de linfócitos T CD8⁺ acarreta no controle da infecção por *L. braziliensis*. Como mencionado anteriormente, grande parte dos trabalhos recentes em camundongos retratam o papel dos linfócitos T CD8⁺ como parte importante no controle da infecção por outras espécies de *Leishmania* (Belkaid *et al.*, 2002; Rafati *et al.*, 2002; Uzonna *et al.*, 2004). Contudo, os nossos resultados assemelham-se aos dados publicados em pacientes. Estudos prévios do nosso laboratório mostraram que pacientes com LM, forma clínica na qual ocorre intensa destruição tecidual, as células T CD8⁺ e NK apresentam atividade citotóxica (Brodskyn *et al.*, 1997). A expansão de linfócitos T CD8⁺ no linfonodo de drenagem de pacientes precede o aparecimento de úlceras cutâneas (Bomfim *et al.*, 2007). Comparações entre lesões cutâneas iniciais e tardias de pacientes com leishmaniose mostraram que existe um aumento na porcentagem de linfócitos T CD8⁺ presentes nas lesões tardias em comparação com as lesões iniciais, e esta diferença não foi observada para linfócitos T CD4⁺ (Faria *et al.*, 2009). Além disso, o estímulo de células derivadas de pacientes com LC com antígenos de *L. braziliensis* mostra que existe um aumento preferencial de LFA-1, molécula implicada na adesão a tecidos inflamados, em linfócitos T CD8⁺ (Mendes-Aguiar Cde *et al.*, 2009). Por fim, já foi demonstrado que linfócitos T CD8⁺ com potencial citotóxico, que reagem a antígenos não-relacionados, migram para a lesão de pacientes com leishmaniose (Da-Cruz *et al.*, 2010). Este efeito foi relacionado com o desenvolvimento de patologia.

Dados da literatura mostram que os linfócitos T CD8⁺ somente são importantes para o controle da infecção por *L. major* em camundongos utilizando-se baixas doses de parasitas (Uzonna *et al.*, 2004). Sendo assim, infectamos camundongos BALB/c com 10³ promastigotas metacíclicas de *L. braziliensis* na derme da orelha e avaliamos o curso da infecção nestes animais. Com baixa dose de parasitas, houve um retardo no aparecimento da lesão dos

camundongos, mas o mesmo efeito de um controle mais eficiente da infecção foi observado nos animais depletados de linfócitos T CD8⁺ (dados não mostrados). Este resultado sugere que, ao contrário do que foi demonstrado para *L. major*, a necessidade dos linfócitos T CD8⁺ para a cura da infecção dependente da dose não é relevante para o modelo de *L. braziliensis*.

Ao avaliarmos a resposta imune celular mediada por linfócitos T CD4⁺ no sítio de infecção dos camundongos depletados de linfócitos T CD8⁺, observamos que não existe qualquer alteração na porcentagem de células produtoras de IFN- γ , TNF- α ou IL-10. Contudo, outras citocinas não avaliadas podem estar alteradas neste modelo de depleção. Como demonstrado anteriormente, a depleção de linfócitos T CD8⁺ altera o perfil de linfócitos T CD4⁺ quanto à produção de IL-4 (Uzonna *et al.*, 2004), um efeito que não foi determinado no presente trabalho. Contudo, podemos concluir que linfócitos T CD4⁺ “sozinhos”, ou seja, na ausência de linfócitos T CD8⁺, são capazes de controlar a infecção por *L. braziliensis*. Por outro lado, os linfócitos T CD4⁺ já foram implicados na patogênese associada com a infecção por *L. amazonensis* (Soong *et al.*, 1997). Camundongos deficientes em MHC classe II não desenvolvem lesão após infecção por *L. amazonensis* e em camundongos RAG^{-/-}, a reconstituição com linfócitos T CD4⁺ induz o desenvolvimento de lesão. Curiosamente neste trabalho, os autores mostram que camundongos deficientes em MHC classe II apresentam uma inibição do recrutamento de linfócitos T CD8⁺ para o sítio infecção e que camundongos $\beta_2\text{-m}^{-/-}$ têm menor lesão em relação aos animais controle. Portanto, embora o trabalho não discuta o envolvimento dos linfócitos T CD8⁺ na indução de lesão por *L. amazonensis*, fica claro que estes também estão envolvidos na patologia para esta espécie, neste modelo experimental.

A ativação de linfócitos T CD8⁺ *naïve* por patógenos ou por vacinas geralmente requer a interação com células dendríticas carregadas com antígeno, nos linfonodos inflamados. Esta interação induz a produção de citocinas pró-inflamatórias e de quimiocinas que induzem o recrutamento de uma variedade de outras células do sistema imune (Banchereau e Steinman, 1998). Em (2007), León e colaboradores descreveram uma nova população de células dendríticas após infecção *in vivo* por *L. major*. Neste trabalho, os autores demonstram que monócitos são recrutados para a derme da orelha e, após a diferenciação em células dendríticas, migram para o linfonodo onde produzem IL-12 e, assim, contribuem para a polarização de uma resposta protetora do tipo Th1. No nosso trabalho, demonstramos, pela primeira vez, que existe a formação desta população de células dendríticas na orelha de camundongos BALB/c infectados

por *L. braziliensis*. Podemos sugerir também que tais células, presentes no sítio da infecção com *L. braziliensis*, podem contribuir para o desenvolvimento da resposta imune controlada, associada com a cura da lesão. Ademais, demonstramos que linfócitos T CD8⁺ não são responsáveis pelo recrutamento e pela diferenciação destas células, pois, camundongos tratados com anti-CD8 apresentam o mesmo perfil de células dendríticas derivadas de monócitos.

Dados da literatura sugerem que o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ e de neutrófilos é interdependente (Engeman *et al.*, 2004; Kish *et al.*, 2009). Contudo, os nossos dados mostram que a depleção de linfócitos T CD8⁺ implica em um aumento no recrutamento de neutrófilos para o sítio de infecção. Resultados prévios do nosso grupo mostram que os neutrófilos são importantes para o controle da infecção por *L. braziliensis* tanto *in vivo*, demonstrado através de depleção por anticorpo, como *in vitro*, em modelos de interação com macrófagos infectados (Novais *et al.*, 2009). A eliminação de *L. braziliensis* foi associada com a produção de TNF- α e superóxido. Estas observações se estendem para modelos de infecção por *L. amazonensis* em humanos (Afonso *et al.*, 2008) e camundongo (De Souza Carmo *et al.*, 2010). Portanto, os resultados obtidos sugerem que o aumento da resistência à infecção por *L. braziliensis*, na ausência de linfócitos T CD8, está relacionado com a presença aumentada de neutrófilos e eosinófilos no sítio de infecção.

Eosinófilos são polimorfonucleares comumente observados em doenças do tipo Th2, como alergias e infecções por helmintos. Contudo, eosinofilia também é detectada em doenças parasitárias e estes já foram implicados na proteção contra infecção experimental por *L. amazonensis* através da produção de peróxido de hidrogênio (Watanabe *et al.*, 2004). Uzonna *et al.* (2004) mostraram que na ausência de linfócitos T CD8⁺, existe um aumento na resposta Th2 em camundongos infectados por *L. major*. Neste trabalho, os autores mostraram que o IFN- γ produzido pelos linfócitos T CD8⁺ no linfonodo de drenagem, onde ocorre *priming* dos linfócitos, leva à polarização da resposta para o tipo Th1 e, a sua ausência, implica no aumento de uma resposta Th2. Estes resultados podem explicar nosso resultado de recrutamento de eosinófilos para o sítio de infecção, após a depleção de linfócitos T CD8⁺. A IL-17, por sua vez, é uma citocina implicada no recrutamento de neutrófilos e a co-localização desta citocina com estes subtipos celulares já foi demonstrada na lesão de pacientes com LM (Boaventura *et al.*, 2010). Seguindo esta linha de pensamento, a produção de IL-17 pode estar aumentada nos animais depletados de linfócitos T CD8⁺, pois o IFN- γ também inibe a diferenciação de linfócitos Th17,

produtores de IL-17 (rev. em Dong, 2008). Assim, propomos um modelo de controle da infecção por *L. braziliensis*, na ausência de linfócitos T CD8⁺ (Figura 19).

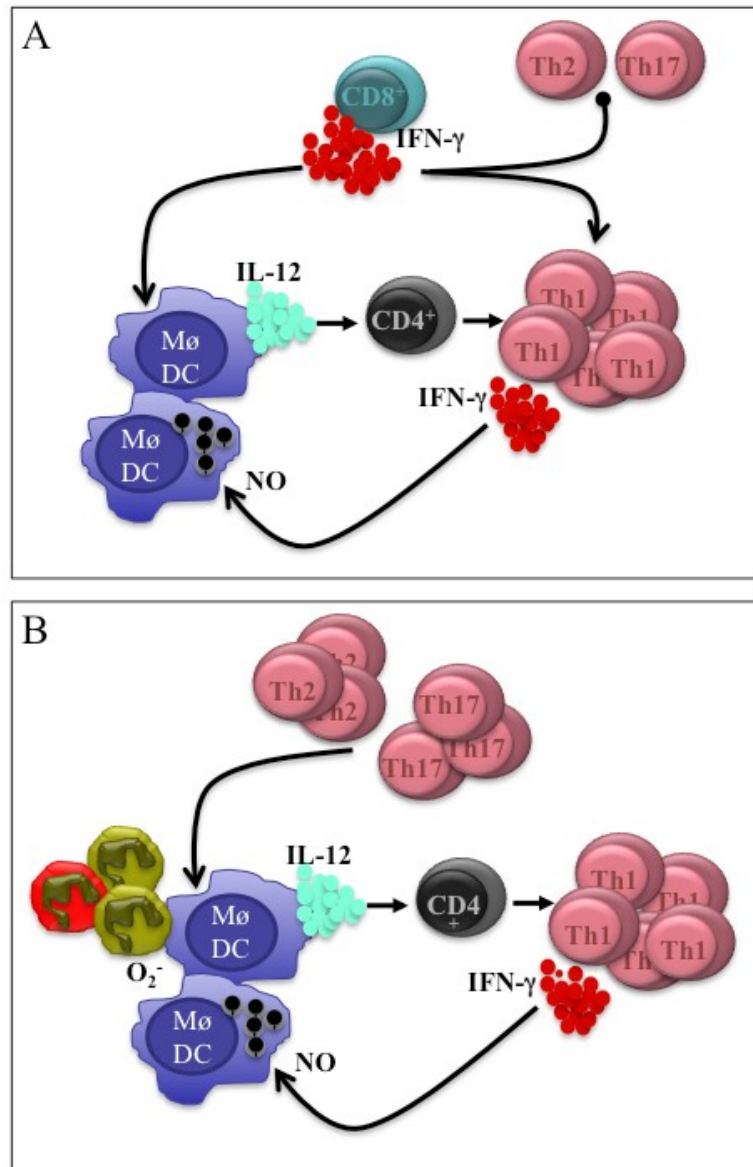


Figura 19 – Modelo da inibição do recrutamento de neutrófilos e eosinófilos por linfócitos T CD8⁺, na infecção por *L. braziliensis*. O *priming* de linfócitos ocorre no linfonodo de drenagem através da produção de IL-12 por células dendríticas e macrófagos, induzindo uma resposta Th1 eficiente, produção de IFN-γ por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ (A). A produção de IFN-γ por linfócitos T CD8⁺, por sua vez, inibe a diferenciação de Th2 e Th17 (A). Na ausência de linfócitos T CD8⁺, ocorre diferenciação de células Th2 e Th17, induzindo o recrutamento de neutrófilos e de eosinófilos para o sítio de infecção que, por fim, contribuem para a eliminação do parasita, sem o desenvolvimento da lesão (B).

Para confirmar os resultados anteriores e determinar os fatores envolvidos na patologia

induzida pelos linfócitos T CD8⁺ na infecção por *L. braziliensis*, utilizamos camundongos deficientes em RAG como modelo de estudo. A ausência de lesão em camundongos imunodeficientes, infectados por Leishmania, já foi demonstrado anteriormente: camundongos SCID ou RAG^{-/-} infectados por *L. amazonensis* não desenvolvem úlceras cutâneas (Terabe *et al.*, 1999). Após infecção por *L. major*, camundongos RAG^{-/-} também não produzem lesão (Belkaid *et al.*, 2002). No nosso estudo, os camundongos RAG^{-/-} também não apresentam lesão visível, apesar da grande quantidade de parasitas encontrada no sítio de infecção. A transferência de linfócitos T CD8⁺ provenientes de camundongos *naïve* para camundongos RAG^{-/-} induziu patologia exacerbada no sítio de infecção por *L. braziliensis*. De fato, o efeito patológico da transferência de linfócitos T CD8⁺ *naïve* para camundongos RAG^{-/-} já foi observado após a infecção por *L. major*, por Belkaid e colaboradores (2002).

A transferência de linfócitos T CD4⁺/T CD8⁺, ambos provenientes de camundongos *naïve*, mostrou-se capaz de controlar a infecção. Este resultado nos leva a concluir que os linfócitos T CD4⁺ são capazes de controlar também a patologia induzida por linfócitos T CD8⁺. A pele é considerada um local privilegiado para a sobrevivência e proliferação de parasitas devido a uma alta frequência de células T reguladoras chamadas “naturais”, CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, mesmo na ausência de infecção. A IL-10 é a principal citocina produzida por este subtipo de linfócitos T, cuja função é de limitar a resposta imune ao inibir funções como apresentação de antígeno, secreção de outras citocinas e quimiocinas, e também bloqueando a ativação de macrófagos (rev. em Peters e Sacks, 2006). Células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ já foram encontradas na lesão de pacientes com LC causada por *L. braziliensis* e foram capazes de inibir *in vitro* a proliferação de PBMC estimulado com fitoemaglutinina (Campanelli *et al.*, 2006). Portanto, é possível que a ausência de células T reguladoras nos camundongos RAG^{-/-} leve à patologia observada, quando os mesmos receberam linfócitos T CD8⁺. Dados da literatura sugerem que a IL-10 é capaz de inibir o papel citotóxico de linfócitos T CD8⁺ *in vitro* (Bejarano *et al.*, 1992; Groux *et al.*, 1998). Na lesão de pacientes com LM existe uma menor expressão de IL-10 em relação aos indivíduos com LC e este efeito foi correlacionado com maior resposta inflamatória e citotoxicidade observada na LM (Faria *et al.*, 2005). Portanto, estes dados complementam o papel dos linfócitos T CD4⁺, especialmente o das células T reguladoras, no controle da patologia induzida por linfócitos T CD8⁺. Além disso, já foi demonstrado que a IL-4, citocina produzida por linfócitos Th2, é capaz de induzir a diferenciação de uma população não citolítica de

linfócitos T CD8⁺ (Kienzle *et al.*, 2002; Kienzle *et al.*, 2005).

Outro efeito interessante observado consiste na disseminação do parasita para outros sítios diferentes, no modelo de transferência adotiva de linfócitos T CD8⁺. A carga parasitária no baço, na orelha não infectada, na pata e no focinho sugere que houve metástase nos animais que receberam de linfócitos T CD8⁺. A disseminação de *Leishmania* é pouco estudada, mas dados em humanos (Martinez *et al.*, 1991; Martinez *et al.*, 1992) e em hamsters (Bertho *et al.*, 1994) sugerem que os novos sítios são colonizados por macrófagos infectados que viajam por via hematogênica ou linfática. O potencial dos linfócitos T CD8⁺ de contribuir para a metástase de *L. braziliensis* nunca foi observado em modelo experimental. Contudo, diversos estudos de caso mostram que pacientes infectados pelo vírus HIV apresentam metástase da Leishmaniose após tratamento com anti-retrovirais que induzem aumento na contagem de linfócitos T (Sinha *et al.*, 2008; Carnauba *et al.*, 2009; Torrico *et al.*, 2009; Auyeung *et al.*, 2010). Posada-Vergara e colaboradores (2005) descrevem dois pacientes com HIV que, após recuperação da contagem de linfócitos, apresentaram o que é conhecido como síndrome inflamatória da reconstituição imune. Um dos pacientes desenvolveu úlceras cutâneas e lesões papulares na genitália e braços, respectivamente, após um mês de tratamento e, posteriormente, apareceram lesões também nas mucosas oral e nasal, bem como na face. Da mesma maneira, outro indivíduo também apresentou lesões nas mucosas e disseminação cutânea das lesões, neste caso identificadas como causadas por *L. braziliensis*. Neste trabalho, contudo, apenas a contagem de linfócitos T CD4⁺ foi levada em consideração e os autores associaram a síndrome observada ao aumento na contagem deste subtipo de linfócitos. No entanto, um estudo mais recente mostrou que ambos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ aumentam em pacientes com essa síndrome e que a magnitude de aumento de linfócitos T CD8⁺ foi maior que para T CD4⁺ (Chrusciak-Talhari *et al.*, 2009). Neste trabalho os autores discutem que pacientes com baixas contagens de linfócitos que apresentam infecções subclínicas ou respostas suprimidas têm maior chance de desenvolver esta síndrome, que é resultado de uma resposta inflamatória exagerada. A comparação do desenvolvimento desta síndrome observada em humanos tratados com anti-retrovirais e camundongos RAG reconstituídos com linfócitos T CD8⁺ não é direta e deve ser cautelosa. No entanto, observamos que a transferência de linfócitos T CD8⁺ em um ambiente linfopênico levou à exacerbação da lesão e disseminação de *L. braziliensis* no modelo murino, indicando que um fenômeno semelhante pode estar ocorrendo.

Em nosso modelo não podemos determinar de que forma os linfócitos T CD8⁺ facilitam a

disseminação parasitária e a destruição tecidual, mas o potencial citotóxico destas células parece contribuir para este efeito, já que estes foram previnidos em camundongos RAG^{-/-} que receberam células de animais deficientes em perforina. A morte por citotoxicidade não leva à eliminação imediata das amastigotas de leishmania (Smith *et al.*, 1991). Possivelmente, a indução de morte das células infectadas resulta na liberação de amastigotas viáveis que, assim, podem infectar novas células hospedeiras. Em paralelo, a ausência de fagocitose de células mortas pode ocasionar a liberação do conteúdo intracelular, que *per se* é pró-inflamatório, ou a liberação de enzimas que degradam componentes extracelulares também são implicados na indução de inflamação (rev. em Rock e Kono, 2008).

Embora os mecanismos de indução de morte pela liberação de grânulos citotóxicos sejam intensamente estudados, ainda não existe um modelo definido de como a combinação perforina/granzima age nas células. A maior parte dos trabalhos mostra que são as perforinas que “entregam” as granzimas para célula alvo, mas como isto ocorre é ainda um grande debate na literatura. Pipkin e Lieberman (2007) referem-se a hipótese inicial de que, por causa da sua homologia com o complemento, as perforinas multimerizam na membrana plasmática da célula-alvo formando poros por onde passam as granzimas. No entanto, os autores ressaltam o fato de que os poros formados podem ser pequenos demais para a passagem de moléculas grandes como as granzimas. O paradigma foi questionado quando foram publicados trabalhos mostrando que a Granzima B pode ser endocitada mesmo na ausência de perforina (Froelich *et al.*, 1996; Shi *et al.*, 1997). A partir destes dados, Froelich e colaboradores (1996) sugeriram que a perforina age na membrana do endossoma e contribui para a liberação da granzima dentro da célula. Pipkin e Lieberman (2007), por outro lado, propuseram um modelo híbrido, no qual a perforina forma poros na membrana que leva ao influxo de Ca⁺. Este efeito, por sua vez, induz reparo na membrana celular que termina por englobar as granzimas presentes na sinapse imunológica. Os autores sugerem também que a liberação da granzima deste endossoma “gigante” é mediada por perforina, mas como isto acontece ainda não está definido.

Embora não esteja claro como ocorre o processo da indução de morte por apoptose mediada por grânulos citotóxicos, é inegável o seu papel crucial no controle de vírus, tumores e também doenças parasitárias. Por outro lado, diversos modelos já mostraram o papel da citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8⁺ no desenvolvimento de patologias. Estudos em modelos murinos de co-infecção pelo vírus LCMV e uma espécie de fungo oportunista,

Histoplasma capsulatum, mostram que a ausência de linfócitos T CD8⁺ implica no aumento da sobrevivência dos animais (Wu-Hsieh *et al.*, 2001). Linfócitos T CD8⁺ também foram correlacionados com o desenvolvimento de malária cerebral, pois camundongos β_2 -m (Yanez *et al.*, 1996) bem como animais deficientes de CD8 (Boubou *et al.*, 1999) são resistentes a esta implicação grave da doença. A infecção intracranial de camundongos C57BL/6 por LCMV resulta numa doença no sistema nervoso central que é mediada por linfócitos T CD8⁺ (Buchmeier *et al.*, 1980) e este efeito é prevenido em camundongos deficientes de perforina (Kagi *et al.*, 1994). O efeito deletério da citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ em outras infecções virais que acarretam problemas no sistema nervoso central (Lin *et al.*, 1997) e miocardite (Gebhard *et al.*, 1998) também já foram demonstrados. A citólise mediada por perforina induzida por linfócitos T CD8⁺ também foi implicada como o principal mecanismo de desenvolvimento de malária cerebral no modelo murino (Nitcheu *et al.*, 2003). Esse conjunto de dados demonstra que a citotoxicidade mediada por linfócitos T CD8⁺ pode ter efeito deletério para o hospedeiro em diversos modelos experimentais e o nosso trabalho mostra, pela primeira vez, este efeito na infecção por *L. braziliensis*.

Parasitas intracelulares necessitam das células hospedeiras para completar o seu ciclo de vida e a citólise de células infectadas pode ser um mecanismo efetor relevante para o controle da infecção. Contudo, dados da literatura mostram que citólise mediada por perforina tem um papel limitado para o controle da infecção por *Toxoplasma gondii* (Denkers *et al.*, 1997) bem como para o controle de infecções secundárias por este parasita (Suzuki e Remington, 1990). Também estudos de infecção por *T. cruzi* mostram que a citotoxicidade induzida pelas células T CD8⁺ não é necessária para a resistência à infecção por *T. cruzi* (Kumar e Tarleton, 1998), embora estes linfócitos sejam essenciais para o controle parasitário (Tarleton, 1990). Poucos trabalhos tratam da citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8⁺ na leishmaniose. Citado anteriormente nesta discussão, Brodskyn e colaboradores (1997) associaram a citotoxicidade induzida por células NK e linfócitos T CD8⁺ à destruição tecidual observada na lesão em pacientes infectados por *L. amazonensis* com LM. Em pacientes com LCL causada por *L. major*, linfócitos do sangue periférico apresentam maior atividade citotóxica específica quando comparado com linfócitos de indivíduos curados (Bousoffara *et al.*, 2004). Além disso, o recrutamento de linfócitos T CD8⁺ expressando granzima A na lesão de pacientes infectados por *L. braziliensis* foi associado à progressão da doença na LC (Faria *et al.*, 2009). Portanto, em pacientes parece existir uma

correlação clara entre a citotoxicidade induzida por linfócitos T CD8⁺ e imunopatologia. No entanto, um trabalho recente da literatura mostra que somente linfócitos T CD8⁺ provenientes de pacientes com LC e não de LCD, ambas causadas por *L. mexicana*, possuem atividade citotóxica (Hernandez-Ruiz *et al.*, 2010). Neste trabalho os autores mostram exaustão dos linfócitos T CD8⁺ na LCD e associam este efeito à disseminação do parasita.

No modelo murino, a ausência de granzima na infecção por *L. major* não foi capaz de alterar o curso da infecção (Eisert *et al.*, 2002). A produção de IFN- γ e a citotoxicidade induzidas por linfócitos T CD8⁺ foram associada com a imunidade protetora contra infecção por *L. chagasi* (Resende *et al.*, 2008). Em outro modelo de vacinação foi mostrado que camundongos perforina^{-/-} vacinados com antígeno de *L. amazonensis* não foram capazes de controlar o desafio com este parasita (Colmenares *et al.*, 2003). No nosso trabalho, não avaliamos a importância destes linfócitos T na proteção contra re-infecção. Assim, baseados nos dados em humanos e murinos, podemos concluir que a espécie do parasita é fundamental na determinação do papel dos linfócitos T CD8⁺ na Leishmaniose. No caso da *L. braziliensis*, podemos propor que linfócitos T CD8⁺ estão associados à patologia na infecção e que este efeito está relacionado com a inibição do recrutamento de polimorfonucleares e com o seu potencial citotóxico. O nosso modelo responde a pergunta proposta mas abre novas perspectivas. Uma delas é estabelecer o mecanismo pelo qual os linfócitos T CD8⁺ inibem o recrutamento de neutrófilos e eosinófilos para o sítio de infecção. Além disso, precisamos determinar qual o mecanismo da citotoxicidade responsável pela indução da patologia. Uma possibilidade é que a morte induzida por perforina gera a liberação de parasitas no meio extracelular e este efeito promove a infecção de novas células e a metástase do parasita. Além disso, nos animais RAG^{-/-} que receberam linfócitos T CD8⁺, a morte de um grande número de células e um “clearance” insuficientemente rápido pode ser responsável pelos efeitos observados (Figura 20).

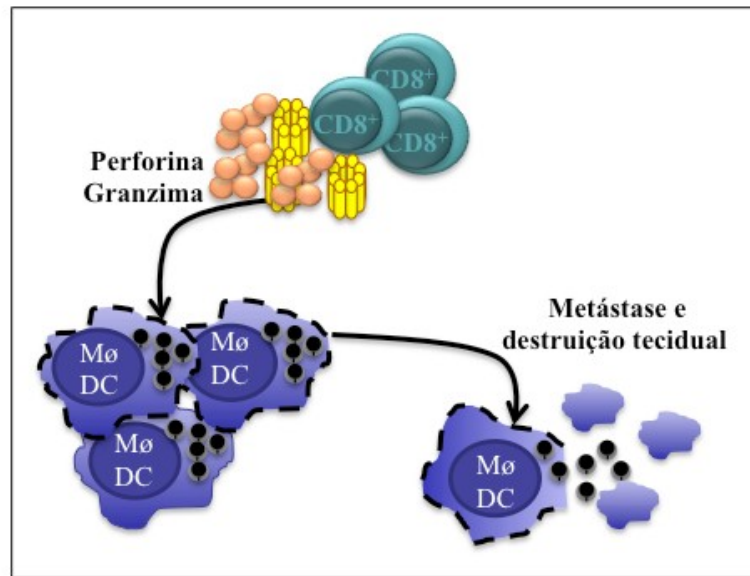


Figura 20 – Modelo de indução de metástase e patogênese pelos linfócitos T CD8⁺ na infecção por *L. braziliensis*. A indução de citotoxicidade mediada por perforina e granzima leva à morte de células infectadas. Este efeito induz a liberação de parasitas no meio extracelular e estas infectam novas células hospedeiras. Em paralelo, a liberação de conteúdo intracelular acarreta em inflamação.

Neste contexto, os linfócitos T CD4⁺ são importantes e suficientes para o controle desta patologia. Na co-transferência de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, houve controle da patologia e do número de parasitas. Duas alternativas podem explicar este efeito: (1) linfócitos T CD4⁺ diretamente inibem a citotoxicidade de linfócitos T CD8⁺ através da produção de IL-10 (ou até mesmo IL-4) sugerindo um possível papel das células Treg; (2) os linfócitos T CD4⁺ são recrutados em maior número para o sítio de infecção e ativam macrófagos que levam à morte dos parasitas (Figura 21). Na ausência de um número grande de parasitas, a patologia induzida por linfócitos T CD8⁺ é controlada devido à menor liberação de parasitas (e de conteúdo intracelular). Uma maneira de testar a primeira hipótese é através da transferência de uma população de linfócitos T CD4⁺, previamente depletados de células Treg, e de linfócitos T CD8⁺ ou, diretamente, através do tratamento dos animais co-transferidos com anti-IL-10. Para testar a segunda hipótese, pretendemos transferir linfócitos T CD4⁺ de camundongos IFN- γ ^{-/-} juntamente com linfócitos T CD8⁺ de camundongos selvagens. Assumindo que a morte de parasitas induzida por linfócitos T CD4⁺ é mediada por IFN- γ , determinaríamos se, na ausência desta citocina (e na

presença de IL-10), a morte induzida por linfócitos T CD4⁺ é capaz de controlar a infecção e consequente patologia induzida pelos linfócitos T CD8⁺.

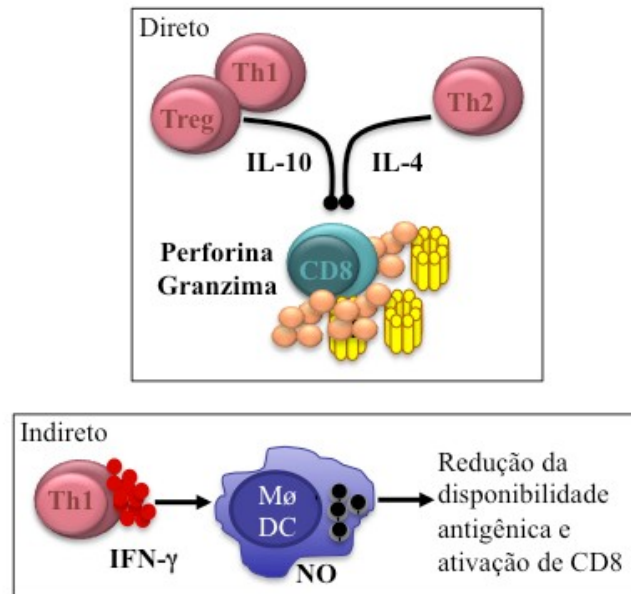


Figura 21 – Possíveis mecanismos de controle da patogênese induzida por linfócitos T CD8⁺ na infecção por *L. braziliensis*. Efeito direto: a produção de IL-10 ou de IL-4 por linfócitos T CD4⁺ inibe diretamente a citotoxicidade pelos linfócitos T CD8⁺. Efeito indireto: a eliminação eficaz dos parasitas reduz a disponibilidade antigênica/número de parasitas, o que indiretamente reduz os efeitos deletérios dos linfócitos T CD8⁺.

Por fim, os resultados obtidos neste trabalho reforçam os dados publicados com pacientes que sugerem que linfócitos T CD8⁺ estão envolvidos na gravidade da doença causada por *L. braziliensis*. Mais que isso, este modelo abre perspectivas para elucidar os mecanismos envolvidos na patogênese da leishmaniose cutânea.

8 CONCLUSÃO

Os linfócitos T CD8⁺ estão associados ao desenvolvimento da lesão em camundongos infectados por *L. braziliensis* e são capazes de induzir disseminação de parasitas em camundongos RAG^{-/-}. O seu envolvimento na patologia foi associado com inibição no recrutamento de neutrófilos e de eosinófilos e ao seu potencial citotóxico.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Afonso, L., V. M. Borges, H. Cruz, F. L. Ribeiro-Gomes, G. A. Dosreis, A. N. Dutra, J. Clarencio, C. I. De Oliveira, A. Barral, M. Barral-Netto e C. I. Brodskyn. Interactions with apoptotic but not with necrotic neutrophils increase parasite burden in human macrophages infected with *Leishmania amazonensis*. J Leukoc Biol, v.84, n.2, Aug, p.389-96. 2008.

Auyeung, P., M. A. French e P. N. Hollingsworth. Immune restoration disease associated with *Leishmania donovani* infection following antiretroviral therapy for HIV infection. J Microbiol Immunol Infect, v.43, n.1, Feb, p.74-6. 2010.

Banchereau, J. e R. M. Steinman. Dendritic cells and the control of immunity. Nature, v.392, n.6673, Mar 19, p.245-52. 1998.

Barral, A., J. Guerreiro, G. Bomfim, D. Correia, M. Barral-Netto e E. M. Carvalho. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. Am J Trop Med Hyg, v.53, n.3, Sep, p.256-9. 1995.

Bejarano, M. T., R. De Waal Malefyt, J. S. Abrams, M. Bigler, R. Bacchetta, J. E. De Vries e M. G. Roncarolo. Interleukin 10 inhibits allogeneic proliferative and cytotoxic T cell responses generated in primary mixed lymphocyte cultures. Int Immunol, v.4, n.12, Dec, p.1389-97. 1992.

Belkaid, Y., S. Kamhawi, G. Modi, J. Valenzuela, N. Noben-Trauth, E. Rowton, J. Ribeiro e D. L. Sacks. Development of a natural model of cutaneous leishmaniasis: powerful effects of vector saliva and saliva preexposure on the long-term outcome of *Leishmania major* infection in the mouse ear dermis. J Exp Med, v.188, n.10, Nov 16, p.1941-53. 1998.

Belkaid, Y., E. Von Stebut, S. Mendez, R. Lira, E. Caler, S. Bertholet, M. C. Udey e D. Sacks. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. J Immunol, v.168, n.8, Apr 15, p.3992-4000. 2002.

Bertho, A. L., M. A. Santiago e S. G. Coutinho. An experimental model of the production of metastases in murine cutaneous leishmaniasis. J Parasitol, v.80, n.1, Feb, p.93-9. 1994.

Boaventura, V. S., C. S. Santos, C. R. Cardoso, J. De Andrade, W. L. Dos Santos, J. Clarencio, J. S. Silva, V. M. Borges, M. Barral-Netto, C. I. Brodskyn e A. Barral. Human mucosal leishmaniasis: neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. Eur J Immunol, v.40, n.10, Oct, p.2830-6. 2010.

Bomfim, G., B. B. Andrade, S. Santos, J. Clarencio, M. Barral-Netto e A. Barral. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. Am J Trop Med Hyg, v.77, n.5, Nov, p.854-9. 2007.

Boubou, M. I., A. Collette, D. Voegtle, D. Mazier, P. A. Cazenave e S. Pied. T cell response in malaria pathogenesis: selective increase in T cells carrying the TCR V(beta)8 during experimental cerebral malaria. Int Immunol, v.11, n.9, Sep, p.1553-62. 1999.

Bousoffara, T., H. Louzir, A. Ben Salah e K. Dellagi. Analysis of granzyme B activity as a surrogate marker of Leishmania-specific cell-mediated cytotoxicity in zoonotic cutaneous leishmaniasis. J Infect Dis, v.189, n.7, Apr 1, p.1265-73. 2004.

Brodskyn, C. I., A. Barral, V. Boaventura, E. Carvalho e M. Barral-Netto. Parasite-driven in vitro human lymphocyte cytotoxicity against autologous infected macrophages from mucosal leishmaniasis. J Immunol, v.159, n.9, Nov 1, p.4467-73. 1997.

Buchmeier, M. J., R. M. Welsh, F. J. Dutko e M. B. Oldstone. The virology and immunobiology of lymphocytic choriomeningitis virus infection. Adv Immunol, v.30, p.275-331. 1980.

Campanelli, A. P., A. M. Roselino, K. A. Cavassani, M. S. Pereira, R. A. Mortara, C. I. Brodskyn, H. S. Goncalves, Y. Belkaid, M. Barral-Netto, A. Barral e J. S. Silva. CD4+CD25+ T cells in skin lesions of patients with cutaneous leishmaniasis exhibit phenotypic and functional characteristics of natural regulatory T cells. J Infect Dis, v.193, n.9, May 1, p.1313-22. 2006.

Carnauba, D., Jr., C. T. Konishi, V. Petri, I. C. Martinez, L. Shimizu e V. L. Pereira-Chioccola. Atypical disseminated leishmaniasis similar to post-kala-azar dermal leishmaniasis in a Brazilian AIDS patient infected with Leishmania (Leishmania) infantum chagasi: a case report. Int J Infect Dis, v.13, n.6, Nov, p.e504-7. 2009.

Carvalho, E. M., A. Barral, J. M. Costa, A. Bittencourt e P. Marsden. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. Acta Trop, v.56, n.4, Apr, p.315-25. 1994.

Castilho, T. M., J. J. Shaw e L. M. Floeter-Winter. New PCR assay using glucose-6-phosphate dehydrogenase for identification of Leishmania species. J Clin Microbiol, v.41, n.2, Feb, p.540-6. 2003.

Childs, G. E., L. K. Lightner, L. Mckinney, M. G. Groves, E. E. Price e L. D. Hendricks. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with Leishmania braziliensis, L. mexicana, and L. aethiopica. Ann Trop Med Parasitol, v.78, n.1, Feb, p.25-34. 1984.

Chrusciak-Talhari, A., R. Ribeiro-Rodrigues, C. Talhari, R. M. Silva, Jr., L. C. Ferreira, S. F. Botileiro, L. O. Santos, R. Dietze e S. Talhari. Tegumentary leishmaniasis as the cause of immune reconstitution inflammatory syndrome in a patient co-infected with human immunodeficiency virus and Leishmania guyanensis. Am J Trop Med Hyg, v.81, n.4, Oct, p.559-64. 2009.

Cocchi, F., A. L. Devico, A. Garzino-Demo, S. K. Arya, R. C. Gallo e P. Lusso. Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells. Science, v.270, n.5243, Dec 15, p.1811-5. 1995.

Colmenares, M., P. E. Kima, E. Samoff, L. Soong e D. McMahon-Pratt. Perforin and gamma interferon are critical CD8+ T-cell-mediated responses in vaccine-induced immunity against

- Leishmania amazonensis infection. Infect Immun, v.71, n.6, Jun, p.3172-82. 2003.
- D'souza, M. P. e V. A. Harden. Chemokines and HIV-1 second receptors. Confluence of two fields generates optimism in AIDS research. Nat Med, v.2, n.12, Dec, p.1293-300. 1996.
- Da Conceicao-Silva, F., B. L. Perlaza, J. A. Louis e P. Romero. Leishmania major infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8+ cytotoxic T cell responses. Eur J Immunol, v.24, n.11, Nov, p.2813-7. 1994.
- Da-Cruz, A. M., F. Conceicao-Silva, A. L. Bertho e S. G. Coutinho. Leishmania-reactive CD4+ and CD8+ T cells associated with cure of human cutaneous leishmaniasis. Infect Immun, v.62, n.6, Jun, p.2614-8. 1994.
- Da-Cruz, A. M., M. P. Oliveira-Neto, A. L. Bertho, C. O. Mendes-Aguiar e S. G. Coutinho. T cells specific to leishmania and other nonrelated microbial antigens can migrate to human leishmaniasis skin lesions. J Invest Dermatol, v.130, n.5, May, p.1329-36. 2010.
- De Moura, T. R., F. O. Novais, F. Oliveira, J. Clarencio, A. Noronha, A. Barral, C. Brodskyn e C. I. De Oliveira. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis. Infect Immun, v.73, n.9, Sep, p.5827-34. 2005.
- De Souza Carmo, E. V., S. Katz e C. L. Barbieri. Neutrophils reduce the parasite burden in Leishmania (Leishmania) amazonensis-infected macrophages. PLoS One, v.5, n.11, p.e13815. 2010.
- De Souza-Neto, S. M., C. M. Carneiro, L. Q. Vieira e L. C. Afonso. Leishmania braziliensis: partial control of experimental infection by interleukin-12 p40 deficient mice. Mem Inst Oswaldo Cruz, v.99, n.3, May, p.289-94. 2004.
- Dekrey, G. K., H. C. Lima e R. G. Titus. Analysis of the immune responses of mice to infection with Leishmania braziliensis. Infect Immun, v.66, n.2, Feb, p.827-9. 1998.
- Denkers, E. Y., G. Yap, T. Scharton-Kersten, H. Charest, B. A. Butcher, P. Caspar, S. Heiny e A. Sher. Perforin-mediated cytolysis plays a limited role in host resistance to Toxoplasma gondii. J Immunol, v.159, n.4, Aug 15, p.1903-8. 1997.
- Dong, C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. Nat Rev Immunol, v.8, n.5, May, p.337-48. 2008.
- Donnelly, K. B., H. C. Lima e R. G. Titus. Histologic characterization of experimental cutaneous leishmaniasis in mice infected with Leishmania braziliensis in the presence or absence of sand fly vector salivary gland lysate. J Parasitol, v.84, n.1, Feb, p.97-103. 1998.
- Eisert, V., U. Munster, M. M. Simon e H. Moll. The course of Leishmania major infection in mice lacking granzyme-mediated mechanisms. Immunobiology, v.205, n.3, Jul, p.314-20. 2002.
- Engeman, T., A. V. Gorbachev, D. D. Kish e R. L. Fairchild. The intensity of neutrophil

infiltration controls the number of antigen-primed CD8 T cells recruited into cutaneous antigen challenge sites. J Leukoc Biol, v.76, n.5, Nov, p.941-9. 2004.

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 e W. O. Dutra. Decreased in situ expression of interleukin-10 receptor is correlated with the exacerbated inflammatory and cytotoxic responses observed in mucosal leishmaniasis. Infect Immun, v.73, n.12, Dec, p.7853-9. 2005.

Faria, D. R., P. E. Souza, F. V. Duraes, E. M. Carvalho, K. J. Gollob, P. R. Machado e W. O. Dutra. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. Parasite Immunol, v.31, n.8, Aug, p.432-9. 2009.

Froelich, C. J., K. Orth, J. Turbov, P. Seth, R. Gottlieb, B. Babior, G. M. Shah, R. C. Bleackley, V. M. Dixit e W. Hanna. New paradigm for lymphocyte granule-mediated cytotoxicity. Target cells bind and internalize granzyme B, but an endosomolytic agent is necessary for cytosolic delivery and subsequent apoptosis. J Biol Chem, v.271, n.46, Nov 15, p.29073-9. 1996.

Gebhard, J. R., C. M. Perry, S. Harkins, T. Lane, I. Mena, V. C. Asensio, I. L. Campbell e J. L. Whitton. Coxsackievirus B3-induced myocarditis: perforin exacerbates disease, but plays no detectable role in virus clearance. Am J Pathol, v.153, n.2, Aug, p.417-28. 1998.

Groux, H., M. Bigler, J. E. De Vries e M. G. Roncarolo. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. J Immunol, v.160, n.7, Apr 1, p.3188-93. 1998.

Haring, J. S., V. P. Badovinac e J. T. Harty. Inflaming the CD8+ T cell response. Immunity, v.25, n.1, Jul, p.19-29. 2006.

Harty, J. T. e V. P. Badovinac. Influence of effector molecules on the CD8(+) T cell response to infection. Curr Opin Immunol, v.14, n.3, Jun, p.360-5. 2002.

Harty, J. T. e V. P. Badovinac. Shaping and reshaping CD8+ T-cell memory. Nat Rev Immunol, v.8, n.2, Feb, p.107-19. 2008.

Harty, J. T., A. R. Tvinnereim e D. W. White. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. Annu Rev Immunol, v.18, p.275-308. 2000.

Herath, S., P. Kropf e I. Muller. Cross-talk between CD8(+) and CD4(+) T cells in experimental cutaneous leishmaniasis: CD8(+) T cells are required for optimal IFN-gamma production by CD4(+) T cells. Parasite Immunol, v.25, n.11-12, Nov-Dec, p.559-67. 2003.

Hernandez Sanabria, M. X., L. C. Afonso, D. Golgher, W. L. Tafuri e L. Q. Vieira. CD8+ T cells are not required for vaccine-induced immunity against *Leishmania amazonensis* in IL-12/23P40(-/-) C57BL/6 mice. Microbes Infect, v.9, n.9, Jul, p.1124-34. 2007.

Hernandez-Ruiz, J., N. Salaiza-Suazo, G. Carrada, S. Escoto, A. Ruiz-Remigio, Y. Rosenstein, A. Zentella e I. Becker. CD8 cells of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis display

functional exhaustion: the latter is reversed, in vitro, by TLR2 agonists. PLoS Negl Trop Dis, v.4, n.11, p.e871. 2010.

Heusel, J. W., R. L. Wesselschmidt, S. Shresta, J. H. Russell e T. J. Ley. Cytotoxic lymphocytes require granzyme B for the rapid induction of DNA fragmentation and apoptosis in allogeneic target cells. Cell, v.76, n.6, Mar 25, p.977-87. 1994.

Huber, M., E. Timms, T. W. Mak, M. Rollinghoff e M. Lohoff. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. Infect Immun, v.66, n.8, Aug, p.3968-70. 1998.

Jordan, K. A. e C. A. Hunter. Regulation of CD8+ T cell responses to infection with parasitic protozoa. Exp Parasitol, v.126, n.3, Nov, p.318-25. 2010.

Kagi, D., B. Ledermann, K. Burki, P. Seiler, B. Odermatt, K. J. Olsen, E. R. Podack, R. M. Zinkernagel e H. Hengartner. Cytotoxicity mediated by T cells and natural killer cells is greatly impaired in perforin-deficient mice. Nature, v.369, n.6475, May 5, p.31-7. 1994.

Kienzle, N., K. Buttigieg, P. Groves, T. Kawula e A. Kelso. A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of noncytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression. J Immunol, v.168, n.4, Feb 15, p.1672-81. 2002.

Kienzle, N., S. Olver, K. Buttigieg, P. Groves, M. L. Janas, A. Baz e A. Kelso. Progressive differentiation and commitment of CD8+ T cells to a poorly cytolytic CD8low phenotype in the presence of IL-4. J Immunol, v.174, n.4, Feb 15, p.2021-9. 2005.

Kim, J. J., L. K. Nottingham, J. I. Sin, A. Tsai, L. Morrison, J. Oh, K. Dang, Y. Hu, K. Kazahaya, M. Bennett, T. Dentchev, D. M. Wilson, A. A. Chalian, J. D. Boyer, M. G. Agadjanyan e D. B. Weiner. CD8 positive T cells influence antigen-specific immune responses through the expression of chemokines. J Clin Invest, v.102, n.6, Sep 15, p.1112-24. 1998.

Kish, D. D., X. Li e R. L. Fairchild. CD8 T cells producing IL-17 and IFN-gamma initiate the innate immune response required for responses to antigen skin challenge. J Immunol, v.182, n.10, May 15, p.5949-59. 2009.

Kisielow, P., J. A. Hirst, H. Shiku, P. C. Beverley, M. K. Hoffman, E. A. Boyse e H. F. Oettgen. Ly antigens as markers for functionally distinct subpopulations of thymus-derived lymphocytes of the mouse. Nature, v.253, n.5488, Jan 17, p.219-20. 1975.

Klein, E. Lymphocyte-mediated lysis of tumor cells in vitro. Antigen-restricted clonal and unrestricted polyclonal effects. Springer Semin Immunopathol, v.5, n.2, p.147-59. 1982.

Kumar, S. e R. L. Tarleton. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol, v.20, n.5, May, p.207-16. 1998.

Leon, B., M. Lopez-Bravo e C. Ardavin. Monocyte-derived dendritic cells formed at the

infection site control the induction of protective T helper 1 responses against Leishmania. Immunity, v.26, n.4, Apr, p.519-31. 2007.

Liew, F. Y., S. Millott, C. Parkinson, R. M. Palmer e S. Moncada. Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. J Immunol, v.144, n.12, Jun 15, p.4794-7. 1990.

Lin, M. T., S. A. Stohlman e D. R. Hinton. Mouse hepatitis virus is cleared from the central nervous systems of mice lacking perforin-mediated cytotoxicity. J Virol, v.71, n.1, Jan, p.383-91. 1997.

Locksley, R. M. e P. Scott. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. Immunol Today, v.12, n.3, Mar, p.A58-61. 1991.

Marsden, P. D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). Trans R Soc Trop Med Hyg, v.80, n.6, p.859-76. 1986.

Martinez, J. E., Alba, L. Arias, M. A. Escobar e N. G. Saravia. Haemoculture of Leishmania (Viannia) braziliensis from two cases of mucosal leishmaniasis: re-examination of haematogenous dissemination. Trans R Soc Trop Med Hyg, v.86, n.4, Jul-Aug, p.392-4. 1992.

Martinez, J. E., B. L. Travi, A. Z. Valencia e N. G. Saravia. Metastatic capability of Leishmania (Viannia) panamensis and Leishmania (Viannia) guyanensis in golden hamsters. J Parasitol, v.77, n.5, Oct, p.762-8. 1991.

Marzo, A. L., H. Yagita e L. Lefrancois. Cutting edge: migration to nonlymphoid tissues results in functional conversion of central to effector memory CD8 T cells. J Immunol, v.179, n.1, Jul 1, p.36-40. 2007.

McMahon-Pratt, D., E. Bennett e J. R. David. Monoclonal antibodies that distinguish subspecies of Leishmania braziliensis. J Immunol, v.129, n.3, Sep, p.926-7. 1982.

Mendes-Aguiar Cde, O., A. Gomes-Silva, E. Nunes, Jr., R. Pereira-Carvalho, R. S. Nogueira, P. Oliveira-Neto Mde, A. L. Bertho e A. M. Da-Cruz. The skin homing receptor cutaneous leucocyte-associated antigen (CLA) is up-regulated by Leishmania antigens in T lymphocytes during active cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol, v.157, n.3, Sep, p.377-84. 2009.

Mosmann, T. R., L. Li e S. Sad. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns. Semin Immunol, v.9, n.2, Apr, p.87-92. 1997.

Muller, I. Role of T cell subsets during the recall of immunologic memory to Leishmania major. Eur J Immunol, v.22, n.12, Dec, p.3063-9. 1992.

Muller, I., P. Kropf, J. A. Louis e G. Milon. Expansion of gamma interferon-producing CD8+ T cells following secondary infection of mice immune to Leishmania major. Infect Immun, v.62, n.6, Jun, p.2575-81. 1994.

- Nagata, S. e P. Golstein. The Fas death factor. Science, v.267, n.5203, Mar 10, p.1449-56. 1995.
- Narni-Mancinelli, E., L. Campisi, D. Bassand, J. Cazareth, P. Gounon, N. Glaichenhaus e G. Lauvau. Memory CD8⁺ T cells mediate antibacterial immunity via CCL3 activation of TNF/ROI⁺ phagocytes. J Exp Med, v.204, n.9, Sep 3, p.2075-87. 2007.
- Neal, R. A. e C. Hale. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous leishmaniasis. Parasitology, v.87 (Pt 1), Aug, p.7-13. 1983.
- Nitcheu, J., O. Bonduelle, C. Combadiere, M. Tefit, D. Seilhean, D. Mazier e B. Combadiere. Perforin-dependent brain-infiltrating cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes mediate experimental cerebral malaria pathogenesis. J Immunol, v.170, n.4, Feb 15, p.2221-8. 2003.
- Novais, F. O., R. C. Santiago, A. Bafica, R. Khouri, L. Afonso, V. M. Borges, C. Brodskyn, M. Barral-Netto, A. Barral e C. I. De Oliveira. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. J Immunol, v.183, n.12, Dec 15, p.8088-98. 2009.
- Overath, P. e D. Harbecke. Course of *Leishmania* infection in beta 2-microglobulin-deficient mice. Immunol Lett, v.37, n.1, Jul, p.13-7. 1993.
- Peters, N. e D. Sacks. Immune privilege in sites of chronic infection: *Leishmania* and regulatory T cells. Immunol Rev, v.213, Oct, p.159-79. 2006.
- Pipkin, M. E. e J. Lieberman. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. Curr Opin Immunol, v.19, n.3, Jun, p.301-8. 2007.
- Pompeu, M. M., C. Brodskyn, M. J. Teixeira, J. Clarencio, J. Van Weyenberg, I. C. Coelho, S. A. Cardoso, A. Barral e M. Barral-Netto. Differences in gamma interferon production in vitro predict the pace of the in vivo response to *Leishmania amazonensis* in healthy volunteers. Infect Immun, v.69, n.12, Dec, p.7453-60. 2001.
- Posada-Vergara, M. P., J. A. Lindoso, J. E. Tolezano, V. L. Pereira-Chioccola, M. V. Silva e H. Goto. Tegumentary leishmaniasis as a manifestation of immune reconstitution inflammatory syndrome in 2 patients with AIDS. J Infect Dis, v.192, n.10, Nov 15, p.1819-22. 2005.
- Rafati, S., A. Kariminia, S. Seyde-Eslami, M. Narimani, T. Taheri e M. Lebbatard. Recombinant cysteine proteinases-based vaccines against *Leishmania major* in BALB/c mice: the partial protection relies on interferon gamma producing CD8(+) T lymphocyte activation. Vaccine, v.20, n.19-20, Jun 7, p.2439-47. 2002.
- Reiner, S. L. e R. M. Locksley. The regulation of immunity to *Leishmania major*. Annu Rev Immunol, v.13, p.151-77. 1995.
- Resende, D. M., B. C. Caetano, M. S. Dutra, M. L. Penido, C. F. Abrantes, R. M. Verly, J. M. Resende, D. Pilo-Veloso, S. A. Rezende, O. Bruna-Romero, A. P. Fernandes e R. T. Gazzinelli.

Epitope mapping and protective immunity elicited by adenovirus expressing the Leishmania amastigote specific A2 antigen: correlation with IFN-gamma and cytolytic activity by CD8+ T cells. Vaccine, v.26, n.35, Aug 18, p.4585-93. 2008.

Rocha, F. J., U. Schleicher, J. Mattner, G. Alber e C. Bogdan. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of Leishmania (Viannia) braziliensis in mice. Infect Immun, v.75, n.8, Aug, p.3823-32. 2007.

Rock, K. L. e H. Kono. The inflammatory response to cell death. Annu Rev Pathol, v.3, p.99-126. 2008.

Sacks, D. e N. Noben-Trauth. The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. Nat Rev Immunol, v.2, n.11, Nov, p.845-58. 2002.

Samuelson, J., E. Lerner, R. Tesh e R. Titus. A mouse model of Leishmania braziliensis braziliensis infection produced by coinjection with sand fly saliva. J Exp Med, v.173, n.1, Jan 1, p.49-54. 1991.

Shi, L., S. Mai, S. Israels, K. Browne, J. A. Trapani e A. H. Greenberg. Granzyme B (GraB) autonomously crosses the cell membrane and perforin initiates apoptosis and GraB nuclear localization. J Exp Med, v.185, n.5, Mar 3, p.855-66. 1997.

Shin, H. C., N. Benbernou, S. Esnault e M. Guenounou. Expression of IL-17 in human memory CD45RO+ T lymphocytes and its regulation by protein kinase A pathway. Cytokine, v.11, n.4, Apr, p.257-66. 1999.

Sinha, S., G. Fernandez, R. Kapila, W. C. Lambert e R. A. Schwartz. Diffuse cutaneous leishmaniasis associated with the immune reconstitution inflammatory syndrome. Int J Dermatol, v.47, n.12, Dec, p.1263-70. 2008.

Smith, L. E., M. Rodrigues e D. G. Russell. The interaction between CD8+ cytotoxic T cells and Leishmania-infected macrophages. J Exp Med, v.174, n.3, Sep 1, p.499-505. 1991.

Smyth, M. J. e J. A. Trapani. Granzymes: exogenous proteinases that induce target cell apoptosis. Immunol Today, v.16, n.4, Apr, p.202-6. 1995.

Soong, L., C. H. Chang, J. Sun, B. J. Longley, Jr., N. H. Ruddle, R. A. Flavell e D. McMahon-Pratt. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with Leishmania amazonensis infection. J Immunol, v.158, n.11, Jun 1, p.5374-83. 1997.

Spath, G. F. e S. M. Beverley. A lipophosphoglycan-independent method for isolation of infective Leishmania metacyclic promastigotes by density gradient centrifugation. Exp Parasitol, v.99, n.2, Oct, p.97-103. 2001.

Stager, S., T. Joshi e R. Bankoti. Immune evasive mechanisms contributing to persistent Leishmania donovani infection. Immunol Res, v.47, n.1-3, Jul, p.14-24. 2010.

Stern, J. J., M. J. Oca, B. Y. Rubin, S. L. Anderson e H. W. Murray. Role of L3T4+ and LyT-2+ cells in experimental visceral leishmaniasis. J Immunol, v.140, n.11, Jun 1, p.3971-7. 1988.

Sutton, C., C. Brereton, B. Keogh, K. H. Mills e E. C. Lavelle. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. J Exp Med, v.203, n.7, Jul 10, p.1685-91. 2006.

Suzuki, Y. e J. S. Remington. The effect of anti-IFN-gamma antibody on the protective effect of Lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. J Immunol, v.144, n.5, Mar 1, p.1954-6. 1990.

Tarleton, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Immunol, v.144, n.2, Jan 15, p.717-24. 1990.

Terabe, M., T. Kuramochi, T. Hatabu, M. Ito, Y. Ueyama, K. Katakura, S. Kawazu, T. Onodera e Y. Matsumoto. Non-ulcerative cutaneous lesion in immunodeficient mice with *Leishmania amazonensis* infection. Parasitol Int, v.48, n.1, Mar, p.47-53. 1999.

Torrico, F., R. Parrado, R. Castro, C. J. Marquez, M. C. Torrico, M. Solano, R. Reithinger e A. L. Garcia. Co-Infection of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and HIV: report of a case of mucosal leishmaniasis in Cochabamba, Bolivia. Am J Trop Med Hyg, v.81, n.4, Oct, p.555-8. 2009.

Trapani, J. A. e M. J. Smyth. Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. Nat Rev Immunol, v.2, n.10, Oct, p.735-47. 2002.

Tsagozis, P., E. Karagouni e E. Dotsika. CD8(+) T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. Parasite Immunol, v.25, n.11-12, Nov-Dec, p.569-79. 2003.

Tsagozis, P., E. Karagouni e E. Dotsika. Function of CD8+ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. Parasitol Int, v.54, n.2, Jun, p.139-46. 2005.

Uzonna, J. E., K. L. Joyce e P. Scott. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. J Exp Med, v.199, n.11, Jun 7, p.1559-66. 2004.

Van Parijs, L. e A. K. Abbas. Role of Fas-mediated cell death in the regulation of immune responses. Curr Opin Immunol, v.8, n.3, Jun, p.355-61. 1996.

Wang, Z. E., S. L. Reiner, F. Hatam, F. P. Heinzl, J. Bouvier, C. W. Turck e R. M. Locksley. Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental leishmaniasis. J Immunol, v.151, n.4, Aug 15, p.2077-86. 1993.

Watanabe, Y., E. Hamaguchi-Tsuru, N. Morimoto, Y. Nishio, K. Yagyu, Y. Konishi, M. Tominaga, J. Miyazaki, M. Furuya e A. Tominaga. IL-5-Induced Eosinophils Suppress the

Growth of *Leishmania amazonensis* In Vivo and Kill Promastigotes In Vitro in Response to Either IL-4 or IFN-gamma. DNA Cell Biol, v.23, n.7, Jul, p.412-8. 2004.

Wu-Hsieh, B. A., J. K. Whitmire, R. De Fries, J. S. Lin, M. Matloubian e R. Ahmed. Distinct CD8 T cell functions mediate susceptibility to histoplasmosis during chronic viral infection. J Immunol, v.167, n.8, Oct 15, p.4566-73. 2001.

Yanez, D. M., D. D. Manning, A. J. Cooley, W. P. Weidanz e H. C. Van Der Heyde. Participation of lymphocyte subpopulations in the pathogenesis of experimental murine cerebral malaria. J Immunol, v.157, n.4, Aug 15, p.1620-4. 1996.