

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**Papel das células T invariantes de mucosa (MAIT) na
leishmaniose visceral**

por

Marcela de Lima Moreira

Belo Horizonte

2018

TESE DCS - IRR

M. L. MOREIRA

2018

Marcela de Lima Moreira

**Papel das células T invariantes de mucosa (MAIT) na
leishmaniose visceral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Coorientação: Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo

Belo Horizonte

2018

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

M838p
2018

Moreira, Marcela de Lima.

Papel das células T invariantes de mucosa (MAIT) na leishmaniose visceral/ Marcela de Lima Moreira. – Belo Horizonte, 2018.

XVII, 122 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 105-122

Tese (doutorado) –Tese para obtenção do título de Doutora em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

1. Células MAIT 2. Leishmaniose Visceral 3. Células T
I. Título. II. Magalhães, Vanessa Pascoal Peruhype (Orientação). III. Reis, Jordana Graziela Alves Coelho dos (Coorientação); Araújo, Márcio Sobreira Silva (Coorientação)

CDD – 22. ed. – 616.936

Marcela de Lima Moreira

**Papel das células T invariantes de mucosa (MAIT) na
leishmaniose visceral**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências - área de concentração Biologia Celular e Molecular.

Orientação: Dra. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal

Coorientação: Dra. Jordana Graziela Alves Coelho dos Reis

Dr. Márcio Sobreira Silva Araújo

Banca Examinadora:

Dr^a. Vanessa Peruhype Magalhães Pascoal (IRR/FIOCRUZ MINAS) Orientadora/
Presidente

Dr^a. Érica Alessandra Rocha Alves (IRR/FIOCRUZ MINAS) Titular

Dr^a. Adriana Bozzi (IRR/FIOCRUZ MINAS) Titular

Dr^a. Liliane Martins dos Santos (UFMG) Titular

Prof^a Dr^a. Teresa Cristina de Abreu Ferrari (UFMG) Titular

Dr. Edward José de Oliveira (IRR/FIOCRUZ MINAS) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 11 / 06 / 2018

Às minhas amadas Luciana, Fernanda, Lucineire e Rosária.

A todos os pacientes portadores de LV.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por estar sempre presente em minha vida, guiando meus passos, me abençoando e me dando forças para superar todas as dificuldades da vida.

Aos meus orientadores Jordana, Márcio, Olindo e Vanessa, pela generosidade durante toda esta trajetória. Por me acolherem e compartilharem seu conhecimento e experiência, vocês são grandes exemplos de competência, honestidade e dedicação, que vou levar para a minha vida profissional e pessoal. Muito obrigada pela confiança, por todos os ensinamentos, pelo apoio, pela convivência e por todo o tempo despendido na minha formação. Serei sempre muito grata e tenho uma enorme admiração por vocês, é uma grande honra concluir esta etapa sob suas orientações.

À Sidonia pela recepção, orientação, pelo suporte, diretrizes e dicas dadas para a realização dos experimentos, por toda a dedicação, confiança e pela convivência tão agradável.

Aos estudantes de iniciação científica que trabalharam no projeto, Guilherme, Ágata, Ludmila e Luana: muito obrigada, a união faz a força!

A todos os amigos do Grupo integrado de Pesquisas em Biomarcadores. Ao apoio técnico por proporcionar um ambiente organizado para a realização dos experimentos. À Dra. Andréa pela colaboração e pelo auxílio na citometria. À Jucélia, pela convivência agradável e pelo suporte dado no nosso dia-a-dia.

À plataforma de Citometria e às colegas Carol, Tiza, Lorena e Bruna pelo auxílio nas leituras e compreensão das necessidades do projeto.

Ao grupo Pesquisa Clínica e Políticas Públicas em Doenças Infecciosas e Parasitárias – PCPP, pela disponibilização do laboratório para a realização de experimentos.

Ao Dr. Daniel Avelar pelos ensinamentos e auxílio para realização dos experimentos de qPCR.

Ao Dr. Marcelo Pascoal pela colaboração na realização das análises histopatológicas.

À Fundação Oswaldo Cruz, ao Instituto René Rachou e à diretoria por possibilitarem o desenvolvimento do projeto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à coordenadora Dra. Luzia, aos professores e à Secretária Andrea.

À Dra. Mariângela Carneiro pela colaboração.

À equipe do Hospital Infantil João Paulo II, pela colaboração e auxílio nas coletas, principalmente Dra. Andrea Luchesi, Dra. Maria Vitória, Dra. Flávia, Dra. Fernanda e Marineide.

Ao grupo de pesquisas do Professor McConville, por me receber e oferecer a estrutura do seu laboratório para a realização de muitos experimentos, especialmente à Dra. Eleanor Saunders pelo auxílio na execução dos experimentos.

Ao todos os membros do laboratório do Dr. Professor James McCluskey por me acolherem tão bem e me deixarem tão à vontade para trabalhar, agradeço especialmente a ele, à Dra. Alexandra Corbett e à Dra. Sidonia Eckle por fornecerem o suporte e estrutura necessários para a realização dos experimentos. À Bronwyn pela ajuda com as linhagens celulares. Ao Tony por fornecer as linhagens THP1. À Luda pela amizade, carinho e toda a ajuda no laboratório. Ao Dr. ZhenJun pelo fornecimento dos camundongos MR1^{-/-} e pelo suporte dado na realização dos experimentos. Troi, Mai e Zhe, obrigado também pela ajuda com os experimentos em modelo murino.

Aos órgãos financiadores: FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais) e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - concessão da bolsa de doutorado; bolsa de doutorado Sanduíche: processo 88881.133017/2016-01). O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À minha mãe por sempre me apoiar e acreditar em mim mais do que eu mesma. Por toda sua dedicação à minha criação e educação e por todos os esforços realizados com tanto amor para que eu pudesse chegar até aqui. Pela paciência, por todo o suporte emocional e por trazer sempre tanta segurança e felicidade para a minha vida.

À minha irmã, pela amizade, carinho e por ser minha inspiração. Por me ajudar a acreditar no futuro e ser minha grande parceira nesta jornada.

Ao Fernando, pelo apoio e pelos conselhos. Por ter estado ao meu lado durante todo o doutorado, especialmente quando mais precisei.

À minha querida Rosária, por todas as orações, por me guiar no caminho da fé e da esperança, pelo exemplo de humildade e amor que estarão para sempre em meu coração.

À minha tia Lucineire por tanto carinho e apoio. Ao Flávio pela paciência e cuidado. Ao meu pai. Aos meus queridos avós (*in memoriam*) pela dedicação e amor que me trouxeram até aqui. A todos os meus familiares, pela compreensão nas minhas ausências, pelo carinho e pela felicidade de fazer parte de uma família tão unida.

Às minhas amigas “Divas quase doutoras”, pela amizade, pelo apoio, por trazerem mais leveza pro meu dia-a-dia e pela convivência tão agradável, amor vocês pra sempre!

Aos meus amigos de Melbourne, especialmente Alessandra que é um anjo na minha vida. Aos amigos do PDSE-Melbourne com quem compartilhei momentos incríveis, principalmente Fernanda e Bruna, amo vocês! Aos amigos de “PDI”: Cassandra, Fernando, Sônia, Michael e Matthias, o meu dia-a-dia foi muito melhor com vocês! Muito obrigada.

Aos amigos do comitê estudantil, pelas discussões de qualidade e pela conversa fiada.

Aos pacientes participantes deste trabalho e aos seus responsáveis.

Sou eternamente grata a todas as pessoas que mesmo em sua mais breve passagem ou curta convivência me ofereceram sua contribuição, de qualquer natureza, para a realização deste trabalho.

Resumo

O presente trabalho estudou o papel de células T invariantes de Mucosa, ou células MAIT, na leishmaniose visceral (LV) em humanos e em modelo experimental murino. Para tal, foram realizados estudos *in vitro* e *ex vivo*, utilizando-se sangue total de indivíduos saudáveis e com LV assintomática (AS) e em pacientes com LV clássica não grave (LV). Para avaliar o impacto do MR1 no parasitismo e na histopatologia do fígado e do baço de camundongos *in vivo*, bem como no recrutamento de células MAIT e linfócitos T convencionais para estes órgãos entre 3 e 6 semanas após a infecção foi utilizado o modelo de camundongo MR1 nocaute (MR1^{-/-}). Os resultados obtidos em humanos demonstraram diminuição da frequência de células MAIT circulantes e redução da expressão de CD69 nestas células, em crianças com LV clássica. As culturas *in vitro* mostraram a capacidade das células MAIT em responder à *Leishmania*, por meio da produção de TNF- α e IFN- γ , de modo dependente de MR1, enquanto que a produção de IL-10 foi MR1-independente, em indivíduos saudáveis e nos pacientes com LV clássica. Por outro lado, a ativação da produção de IL-17A, que também foi dependente de MR1, foi observada apenas no grupo de indivíduos com LV assintomática. Foi observado também que o bloqueio das respostas restritas ao MR1 ocasionou aumento da ativação de linfócitos T convencionais nas culturas no grupo AS. Com relação à atividade leishmanicida de monócitos e neutrófilos, o bloqueio da molécula MR1 gerou redução na produção de óxido nítrico (NO) por indivíduos do grupo AS e LV clássica. Além disso, a produção de NO por monócitos correlacionou-se à expressão de IFN- γ por células MAIT. Em ensaios de co-cultivo foi possível comprovar a ativação de células MAIT restritas ao MR1-5-OP-RU em resposta a células infectadas com *Leishmania*, e a dependência do MR1. Nos ensaios *in vivo*, em comparação a camundongos selvagens, os camundongos MR1^{-/-} apresentaram maior parasitismo no fígado 3 semanas após a infecção e no baço, 4 e 6 semanas após a infecção. Adicionalmente, camundongos MR1^{-/-} apresentaram inflamação portal (fígado) significativa entre 3-6 semanas após a infecção. No baço, as análises histopatológicas demonstraram aumento das áreas de linfócitos T em camundongos selvagens infectados com *L. donovani* e camundongos MR1^{-/-}, entre a terceira e a sexta semana após a infecção. O número de células MAIT no fígado dos camundongos selvagens infectados com *L. donovani* foi inversamente proporcional ao parasitismo neste órgão e um maior recrutamento de células T CD8⁺ convencionais foi observado no fígado e no baço após 4 e 6 semanas de infecção, respectivamente. De modo geral, os resultados demonstraram que as células MAIT podem ser ativadas no curso da LV, de modo dependente ou independente de MR1 e contribuir no microambiente da infecção como importante fonte de citocinas pró-inflamatórias e na ativação de mecanismos leishmanicidas de macrófagos. Além disso, os resultados apresentados neste trabalho representam a primeira evidência existente na literatura acerca da participação das células MAIT na resposta imunológica à *Leishmania*.

Palavras-chave: células MAIT; leishmaniose visceral; células T da imunidade inata.

Abstract

The present work studied the role of mucosal invariant T (MAIT) cells during visceral leishmaniasis (VL), in humans and mouse model. Peripheral whole blood samples from healthy and infected children, with asymptomatic (AS) and classic VL (VL), were evaluated *in vitro* and *ex vivo*. Furthermore, aiming at studying the *in vivo* impact of MR1 in parasitism and inflammation in liver and spleen as well as the recruitment of MAIT and conventional T cells to these organs, experimental infection was performed in MR1 knockout mice (MR1^{-/-}). The results showed depletion of circulating MAIT cells in children with classic VL, followed by downregulation of CD69 expression by these cells. *In vitro* assays were important to demonstrate MAIT cells ability to respond to *Leishmania* by TNF- α e IFN- γ production in a MR1 dependent-manner; meanwhile the IL-10 production was MR1-independent in all groups. The activation of IL-17A production was observed only in asymptomatic individuals and it was also dependent on MR1. Moreover, the blockage of MR1-restricted immune responses led to activation of conventional T lymphocytes in the asymptomatic group. Regarding to leishmanicidal activity of phagocytes, a downregulation of nitric oxide (NO) production by monocytes and neutrophils was observed in the presence of MR-1 blocking antibody, in VL and AS groups. In addition, NO production by monocytes was correlated to MAIT cells IFN- γ production. By means of co-cultivation assays, it was proved the 5-OP-RU-restricted MAIT cells activation in response to *Leishmania* infected cells and the importance of MR1. As regards to *in vivo* experiments, MR1^{-/-} mice showed higher hepatic parasite load 3 weeks after infection and in spleen 4-6 weeks after infection when compared to wild type mice. Additionally, significative portal (liver) inflammation was observed in MR1^{-/-} mice between 3-6 weeks of infection. In the spleen, the histopathological analysis showed increase in T lymphocyte areas between the third and sixth weeks in MR1^{-/-} and wild type mice. In wild type mice the number of MAIT cells was inversely proportional to parasitism in liver. Besides, the number of CD8 T cells increased in liver and spleen after 4 and 6 weeks of infection, respectively. In summary, it was shown that MAIT cells can be activated during VL infection early in a MR1 dependent or late in an independent manner. MAIT are able to contribute as an important source of proinflammatory cytokines, ultimately resulting in activation of leishmanicidal mechanisms. In addition, these results are the first evidence in literature about the participation of MAIT cells in immune response against *Leishmania*.

Key words: MAIT cells; visceral leishmaniasis; innate immunity T cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Localização das Células T Invariantes de Mucosa (MAIT).	37
Figura 2: Cinética da frequência de Células MAIT ao longo da vida..	37
Figura 3: Etapas da maturação das Células MAIT em camundongos..	39
Figura 4: Receptores de superfície e ativação de células MAIT.	41
Figura 5: População de estudo.....	47
Figura 6: Estratégia de análise para a identificação de células MAIT e outras subpopulações de linfócitos do sangue periférico.....	50
Figura 7: Estratégia para avaliar a marcação de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> com fluorocromo Alexa Flúor 647.....	52
Figura 8: Estratégia de análise do percentual de células citocina ⁺	55
Figura 9: Estratégia de análise para a seleção e avaliação do perfil de ativação de monócitos e neutrófilos do sangue periférico.	58
Figura 10: Estratégia de análise da capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos.....	59
Figura 11: Estratégia de análise para a avaliação da ativação de células MAIT por meio da frequência de MAIT TNF- α ⁺	63
Figura 12: Desenho experimental para avaliação do papel das células MAIT durante a infecção por <i>Leishmania donovani in vivo</i> em modelo murino.	65
Figura 13: Curvas padrão para a quantificação do parasitismo no fígado e no baço de camundongos.....	67
Figura 14: Estratégia de análise para quantificação de células MAIT, células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ do fígado e do baço, empregadas nos experimentos em modelo murino.	69
Figura 15: Frequência de células MAIT circulantes em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica.	74
Figura 16: Perfil de ativação de células nMAIT, MAIT, MAIT CD8 ⁻ e MAIT CD8 ⁺ em crianças com LV assintomática e clássica.....	76
Figura 17: Perfil de ativação e expressão de citocinas intracelulares por células MAIT de indivíduos dos grupos NI, AS e LV, após culturas <i>in vitro</i> na presença de <i>L. infantum</i> e de anticorpo de bloqueio anti-MR1.....	78

Figura 18: Produção de citocinas por células T CD4 ⁺ e CD8 ⁺ convencionais e células MAIT de indivíduos dos grupos NI, AS e LV, após culturas <i>in vitro</i> na presença de <i>L. infantum</i> e de anticorpo de bloqueio anti-MR1.	80
Figura 19: Frequência, perfil fenotípico de ativação e perfil funcional de monócitos e neutrófilos de indivíduos dos grupos NI, AS e LV, após cultura <i>in vitro</i> com formas promastigotas de <i>L. infantum</i> , na ausência e presença de bloqueio anti-MR1.....	81
Figura 20: Produção de TNF- α por células MAIT MR1-5-OP-RU ⁺ após ativação com células THP1 infectadas com <i>L. mexicana</i>	84
Figura 21: Parasitismo e frequência de células MAIT e T convencionais no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e MR1 ^{-/-} 3, 4 e 6 semanas após infecção com <i>L. donovani</i>	86
Figura 22: Análises histopatológicas do fígado e do baço de camundongos C57BL/6 <i>naïve</i> e camundongos C57BL6 e MR1 ^{-/-} infectados com <i>L. donovani</i>	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Caracterização da população estudada	47
Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção das populações de linfócitos e avaliação do estado de ativação destas células.....	49
Tabela 3: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares.	54
Tabela 4: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção da população de monócitos e avaliação do estado de ativação desta população.	57
Tabela 5: Painel de anticorpos monoclonais específicos utilizados para a seleção das células MAIT nos ensaios envolvendo células THP1.....	62
Tabela 6: Ciclo térmico utilizado para a qPCR.	66
Tabela 7: Painel de anticorpos monoclonais específicos para modelo murino utilizados para a seleção das populações de linfócitos.	68
Tabela 8: Análises de correlação da produção de NO e internalização de <i>L. infantum</i> por monócitos e neutrófilos e a produção de citocinas por células MAIT em indivíduos dos grupos NI, AS e LV.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS

AF700- Alexa Flúor 700
APC- Aloficocinina
AS- Grupo assintomático
BV-605- Brilliant violet 605
CD- Cluster de diferenciação
CC- Cultura controle
CL- Cultura estimulada com promastigotas de *Leishmania infantum*
CLB- cultura estimulada com promastigotas de *Leishmania infantum*, na presença de anticorpo anti-MR1
Ct- Cycle threshold
CTLA-4 - *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*
DAF-2DA- Diacetato de 4,5-diaminofluoresceína
DAF-2- 4,5-Diaminofluoresceína
DAF-2T- Triazolofluoresceína
DCs- Células dendríticas
DN- Duplo negativas
EDTA- Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FHEMIG- Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais
FITC- Isotiocianato de fluoresceína
FSC- *Forward Scatter*
GIPB- Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores
GM-CSF- Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
gMFI- Média geométrica da intensidade de fluorescência
GSPL- Glicosíngofosfolípídeos
HCV- Vírus da hepatite C
HIJPII- Hospital infantil João Paulo II
HIV- Vírus da imunodeficiência humana
HLA- *Human Leukocyte Antigen*
IL- Interleucina
IFN- Interferon
iNOS- Enzima óxido nítrico sintase induzível
LIT- Liver infusion tryptose
LPG- Lipofosfoglicano
LPS Lipopolissacarídeo
LV- Leishmaniose visceral
MAIT – Células T invariáveis de mucosa
MDDC- Células dendríticas derivadas de monócitos
MHC- Complexo principal de histocompatibilidade
MO- Medula óssea
MR1- Proteína relacionada ao MHC de classe I
mRNA- RNA mensageiro

MS- Ministério da Saúde
MyD88- *Myeloid differentiation primary response gene 88*
NETs- Redes extracelulares de neutrófilos
NFκB- fator nuclear κB
NI- Grupo não infectado
NK- Células *natural killer*
NKT- células T *natural killer*
NNN- Ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle
NO- Óxido nítrico
PBS- Tampão fosfato salino 0,015M, pH 7,2-7,4
PBS-W- Solução de PBS acrescida de 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica
PBS-P- Solução de PBS acrescida de 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina
PCLV- Programa de controle da leishmaniose visceral
PD-1 Proteína de morte celular programada 1
PE- Ficoeritrina
PerCP- Proteína Clorofila Piridinina
PLZF- *promyelocytic leukemia zinc finger*
PMA- Forbol 12-miristato 13-acetato
qPCR- Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RE- Retículo endoplasmático
RIFI- Reação de imunofluorescência indireta
ROC -Receiver operating characteristics curve
SFB- Soro fetal bovino
SSC- *Side scatter*
TCR- Receptor de células T
TCLE- Termo de consentimento livre e esclarecido
TGF- Fator de transformação do crescimento
TIM-3 –T cell immunoglobulin domain, mucin domain-3
TLR- Receptor do tipo toll
TNF – Fator de necrose tumoral
Treg- Células T reguladoras
UTI- Unidade de Terapia intensiva
WHO- *World Health Organization*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA	18
2. OBJETIVOS	21
3. REVISÃO DE LITERATURA	24
4. METODOLOGIA.....	44
4.1 Papel das células T invariantes de mucosa (MAIT) na leishmaniose visceral humana	45
4.1.1 Caracterização da população avaliada e desenho do estudo	45
4.1.1.1 Critérios de elegibilidade	46
4.1.1.2 Aspectos éticos.....	47
4.1.1.3 Amostras biológicas	48
4.1.2 Avaliação <i>ex vivo</i> da frequência e do estado de ativação de células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico	48
4.1.2.1 Aquisição e estratégias de análise para avaliação <i>ex vivo</i> da frequência e do estado de ativação de células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico	49
4.1.3 Obtenção de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> e marcação com Alexa Flúor 647	51
4.1.4 Ensaio <i>in vitro</i> para avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de produção de citocinas intracelulares por células MAIT.....	52
4.1.4.1 Aquisição e estratégias de análise do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de produção de citocinas intracelulares por células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico	54
4.1.5 Ensaio de fagocitose e avaliação do perfil de ativação e produção de óxido nítrico por monócitos do sangue periférico.....	55
4.1.5.1 Aquisição e estratégia de análise da capacidade fagocítica, produção de óxido nítrico e perfil de ativação de monócitos do sangue periférico	57
4.2 Ativação de células MAIT do sangue periférico por diferentes linhagens de células THP1 infectadas com <i>Leishmania</i>	59
4.2.1 Diferenciação e infecção das células THP1, THP1.MR1 e THP1.MR1.K0	60
4.2.2 Obtenção e preparação das células mononucleares do sangue periférico	60
4.2.3 Ensaio de ativação de células MAIT, fenotipagem e marcação intracelular de TNF- α	60
4.2.3.1 Estratégia de análise para avaliação da ativação de células MAIT do sangue periférico após contato com diferentes linhagens de células THP1 infectadas com <i>Leishmania</i>	62
4.3 Determinação do papel das Células T invariantes de mucosas durante a infecção por <i>Leishmania donovani</i> <i>in vivo</i> em modelo murino	63
4.3.1 Animais e infecção	63

4.3.2	Quantificação da carga parasitária no fígado e no baço do modelo murino <i>knock out</i> para MR1 e nos camundongos C57BL/6 selvagens, após infecção experimental com amastigotas de <i>Leishmania donovani</i>	65
4.3.3	Quantificação de células MAIT, células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ no fígado e no baço de modelo murino <i>knock out</i> para MR-1 e nos camundongos C57BL/6 selvagens, após infecção experimental com amastigotas de <i>Leishmania donovani</i>	67
4.3.3.1	Estratégias de análise para a quantificação de células MAIT, células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ no fígado e no baço em modelo murino.....	68
4.3.4	Avaliações histopatológicas do fígado e do baço em modelo murino MR1 ^{-/-} e nos camundongos C57BL/6 selvagens, após infecção experimental com amastigotas de <i>Leishmania donovani</i>	70
4.4	Análise estatística.....	70
4.4.1	Análise de variável contínua	70
4.4.2	Análise de variável categórica dos resultados do estudo clínico.....	71
4.4.3	Análise histopatológica	71
5.	RESULTADOS	72
5.1	Frequência e perfil fenotípico no contexto <i>ex vivo</i> de células MAIT e nMAIT do sangue periférico em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave.....	73
5.2	Ativação e perfil funcional de células MAIT do sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave, após cultura <i>in vitro</i> com formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> , na ausência e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1.....	77
5.3	Produção de citocinas por células T CD4 ⁺ e células T CD8 ⁺ convencionais do sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave, após cultura <i>in vitro</i> com formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> , na ausência e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1	79
5.4	Influência do bloqueio de MR1 nas características fenotípicas, capacidade fagocítica e produção de NO por monócitos e neutrófilos do sangue periférico após cultura <i>in vitro</i> com formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> , em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave	81
5.5	Ativação de células MAIT do sangue periférico de indivíduos saudáveis, após contato com células THP1 infectadas com <i>Leishmania mexicana</i>	83
5.6	Parasitismo e concentração de células MAIT e de linfócitos T convencionais no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 MR1 ^{-/-} e C57BL/6 selvagens após infecção experimental com amastigotas de <i>L. donovani</i>	85
5.7	Análises histopatológicas do fígado e do baço de camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos C57BL/6 MR1 ^{-/-} , após infecção experimental com amastigotas de <i>L. donovani</i>	86
6.	DISCUSSÃO	90
7.	CONCLUSÃO	102

8. REFERÊNCIAS.....	104
---------------------	-----

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A Leishmaniose Visceral é uma doença de elevada morbimortalidade especialmente em crianças. No Brasil, entre os anos de 2007 e 2017, foram notificados 38.720 casos da LV, dos quais 2.932 (7,57% dos casos notificados) evoluíram para óbito (MS/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 2018). O desfecho desfavorável da doença está possivelmente relacionado à expansão da co-infecção com o vírus HIV, ao acometimento de grupos vulneráveis e ao diagnóstico tardio da doença. Seu amplo espectro clínico reflete o balanço entre a multiplicação do parasito em fagócitos mononucleares e a resposta imune do hospedeiro. De acordo com isso, vários estudos têm apontado a relevante contribuição de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais no perfil misto e basal de citocinas associadas à resistência em indivíduos assintomáticos; enquanto que aqueles portadores de LV clássica apresentam um perfil exacerbado de produção de citocinas pró-inflamatórias e reguladoras, principalmente IL-10, indicando ausência de contra-regulação (CALDAS *et al.*, 2005; ANSARI *et al.*, 2006; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2006; KHOSHDEL *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012; RAMOS *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017).

Nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais frequentes os estudos que avaliam o papel de células T não convencionais na leishmaniose visceral, como células NKT e células T $\gamma\delta$ (RAZIUDDIN *et al.*, 1992; LAGER *et al.*, 2003; AMPREY *et al.*, 2004; KUMARI *et al.*, 2015; SHEEL *et al.*, 2015). Também fazem parte deste grupo, as células T invariantes associadas à mucosa, ou células MAIT, que se destacam por sua elevada expressão tanto no sangue circulante como no fígado, no intestino, em órgãos linfóides e mucosas, condizente com o perfil abundante e diferenciado de receptores de quimiocinas que expressam em sua superfície (MARTIN *et al.*, 2009; GAPIN *et al.*, 2009; LE BOURHIS *et al.*, 2010; DUSSEAUX *et al.*, 2010; DUSSEAUX *et al.*, 2011; GODFREY, ROSSJOHN, MCCLUSKEY, 2010).

As células MAIT são capazes de responder à antígenos apresentados via molécula relacionada ao MHC de classe Ib não-clássico, MR1 (TREINER *et al.*, 2005; GAPIN *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2008; GOLDFINCH *et al.*, 2010). Uma vez ativadas, as células MAIT produzem e secretam principalmente IL-4, IFN- γ , TNF- α e IL-17A, e induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias por células presentes no microambiente, sugerindo a habilidade destas células em atuar como reguladoras da resposta inflamatória (SHIMAMURA *et al.*, 2009; MEIEROVICS *et al.*, 2013; BOOTH *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2016).

Muitos estudos relataram a ativação destas células em resposta a antígenos de origem bacteriana e fúngica (MARTIN *et al.*, 2009; LE BOURHIS *et al.*, 2010; GODFREY, ROSSJOHN, MCCLUSKEY, 2010; GOLDFINCH *et al.*, 2010; GOLD *et al.*, 2010), no entanto, poucas evidências existem em relação à atividade exclusivamente bactericida/fungicida destas células. A apresentação antigênica de MR1 pode ocorrer de dois modos: (1) através da via endocítica e (2) através do processamento de antígenos endógenos (HUANG *et al.*, 2008), sendo possível que esta via também participe da resposta imunológica durante infecções por parasitas protozoários intracelulares, como a *Leishmania*.

Dessa forma, considerando-se não somente a possível ativação de células MAIT por meio do reconhecimento de antígenos de *Leishmania* e o potencial destas células em desencadear e regular resposta imune inflamatória; mas também a importância da descrição de novos mecanismos imunológicos no que tange células com potencial atividade anti-*Leishmania* e que tenham acesso as mucosas (como células MAIT), conclui-se ser de grande relevância o estudo do papel das células MAIT na leishmaniose visceral.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo 1:

Avaliar o papel das células MAIT na leishmaniose visceral humana.

2.1.1 Objetivos específicos 1:

- Avaliar a frequência e o perfil fenotípico no contexto *ex vivo* de células que expressam o receptor de células T TCRV α 7.2 ou TRAV1-2⁺ (MAIT) no sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave;

- Avaliar o perfil funcional e de ativação de células MAIT do sangue periférico pela produção de citocinas e expressão de marcador de ativação, após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave;

- Avaliar o perfil de produção de citocinas de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ do sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave, após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *L. infantum*, na presença e na ausência de anticorpo de bloqueio anti-MR1;

- Avaliar a influência do bloqueio de MR1 nas características fenotípicas, capacidade fagocítica e produção de NO por monócitos e neutrófilos do sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave, após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *L. infantum*;

- Avaliar os níveis de ativação de células MAIT do sangue periférico de indivíduos saudáveis, após contato com células THP1 infectadas com *Leishmania*, provenientes de linhagens celulares com níveis diferentes de expressão da molécula apresentadora MR1.

2.2. Objetivo 2:

Avaliar o papel das células MAIT na leishmaniose visceral *in vivo* em modelo murino.

2.2.1. Objetivos específicos 2:

- Determinar e comparar a carga parasitária no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e nocaute para MR1 e, após infecção experimental com amastigotas de *Leishmania (L.) donovani*;

- Avaliar o número de células MAIT no fígado e no baço dos camundongos C57BL/6 selvagens após infecção experimental com amastigotas de *L. donovani*, em comparação a camundongos C57BL/6 *naïve*;

- Avaliar e comparar a concentração de células T CD4⁺ e de células T CD8⁺ no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e nocaute para MR1, após infecção experimental com amastigotas de *L. donovani*;
- Avaliar alterações histopatológicas no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e nocautes para MR1, após infecção experimental com amastigotas de *L. donovani*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

As Leishmanioses são doenças causadas por parasitos protozoários pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, à família *Trypanosomatidae* e ao gênero *Leishmania*, que compreende um grande número de espécies, capazes de desencadear diferentes formas clínicas da doença e encontram-se diferentemente distribuídas geograficamente (HERWALDT, 1999). Clinicamente as leishmanioses são divididas em leishmaniose tegumentar, que pode ser classificada como cutânea, mucocutânea ou difusa; e a leishmaniose visceral (LV), que acomete principalmente o fígado, o baço e a medula óssea dos indivíduos. A transmissão da doença ocorre pela picada de fêmeas dos insetos vetores pertencentes à ordem *Diptera*, família *Psychodidae*, subfamília *Phlebotominae*, dos gêneros *Phlebotomous* e *Lutzomyia* no velho e no novo mundo respectivamente (READY, 2013).

Ao todo, estima-se que 12 a 14 milhões de pessoas estejam infectadas por parasitos do gênero *Leishmania* e que, nos 88 países onde a leishmaniose é considerada endêmica, cerca de 1 bilhão de pessoas vivam expostas ao risco de contrair uma das formas da doença (WHO, 2018). Sua incidência anual é aproximadamente de 700 mil a 1 milhão de novas infecções, das quais 50 a 90 mil correspondem a LV (ALVAR *et al.*, 2012; WHO, 2018). Em 2015, mais de 90% dos casos de LV se concentraram em apenas sete países, sendo eles: Brasil, Etiópia, Índia, Kênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2018). No Brasil, entre os anos de 2007 e 2017, foram notificados 38.720 casos da LV, dos quais 2.932 (7,57% dos casos notificados) evoluíram para óbito (MS/SVS - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net, 2018). Atualmente, processos de urbanização, migração e desmatamento, a co-infecção com o HIV e as imunodeficiências congênitas/adquiridas, relativas ao tratamento de pacientes transplantados ou com doenças autoimunes têm sido associadas à expansão da LV, além de aumentarem o índice de sua letalidade (ANTINORI *et al.*, 2008; ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012; TÁVORA; NOGUEIRA; GOMES, 2015; MENON *et al.*, 2016).

As espécies causadoras da LV estão compreendidas no subgênero *Leishmania* e pertencem ao complexo *donovani*, sendo a espécie *Leishmania (Leishmania) donovani* a representante no velho mundo; e a *Leishmania (Leishmania) infantum* (sin. *Leishmania (L.) chagasi*), no novo mundo. Além dos sinais clássicos de hepato e/ou esplenomegalia, a forma visceral da doença também é caracterizada por anemia, leucopenia, plaquetopenia e febre intermitente com duração de várias semanas, podendo levar ao óbito em até 95% dos casos, quando não tratada (WHO 2018).

Dentre os fatores que têm sido associados à resistência ou susceptibilidade às leishmanioses, a resposta imunológica do hospedeiro destaca-se como o fator mais crítico para o desfecho da infecção e as formas clínicas desenvolvidas refletem o balanço entre a multiplicação do parasito em fagócitos mononucleares e a resposta imune do hospedeiro. Outros fatores já relacionados à susceptibilidade à infecção também estão associados ao desempenho do sistema imunológico, como determinantes genéticos, idade e estado nutricional (BADARÓ *et al.*, 1986; ANSTEAD *et al.*, 2001; HUGHES; KELLY, 2006; FALEIRO *et al.*, 2014; WHO 2018). Além disso, a espécie e a virulência da cepa de *Leishmania*, e até mesmo os componentes da saliva do vetor são fatores que podem implicar no estabelecimento da infecção (OLIVEIRA, DE CARVALHO, DE OLIVEIRA, 2013; ATAYDE *et al.*, 2016; MENEZES *et al.*, 2016).

A infecção inicia-se durante o repasto sanguíneo do vetor infectado, que resulta na inoculação de formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, ao mesmo tempo em que são provocados danos teciduais e extravasamento de sangue pelo rompimento de vasos sanguíneos locais. Nesse microambiente, aproximadamente 90% dos parasitos são lisados pela via clássica do complemento, por meio do complexo de ataque à membrana C5b-C9 (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2002, 2003; VON STEBUT, 2007). Paralelamente, a interação dos parasitos remanescentes com os fagócitos é favorecida pelo recrutamento de leucócitos ao sítio da infecção, atraídos pelo processo inflamatório de reparação tecidual que é iniciado. Além disso, outros fatores quimiotáticos encontram-se presentes, dentre eles componentes da saliva do vetor, o PSG (*promastigote secretory gel*) proveniente dos parasitos e fatores do próprio hospedeiro, como clivagem do fator C3 do complemento e a liberação de quimiocinas como CXCL8, que atua no recrutamento de neutrófilos e CXCL9/CXCL10 que, apesar de atuarem no recrutamento de linfócitos Th1, estão associadas ao aumento da carga parasitária e severidade da doença (MULLER *et al.*, 2001; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2002; JACOBS *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2006; ROGERS *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2009; DE MOURA *et al.*, 2010; MENEZES *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2017).

Os neutrófilos são as primeiras células a migrarem massivamente para o sítio da infecção por *L. donovani* (MCFARLANE *et al.*, 2008) e *L. infantum* (THALHOFER *et al.*, 2011). O contato destes fagócitos com os parasitos pode levar a formação das NETs (*Neutrophil Extracellular Traps*), que consistem em um mecanismo de morte dos neutrófilos, o qual resulta na formação de teias compostas por cromatina e proteínas

granulares que enlaçam os parasitos ao mesmo tempo em que concentram moléculas antimicrobianas (GUIMARÃES-COSTA *et al.*, 2009). Perfil diferenciado de NETose, é observado dependendo do status clínico do indivíduo, onde aqueles com LV clássica apresentam NETs com capacidade funcional menos efetiva (GARDINASSI *et al.*, 2017). No sítio da infecção, os neutrófilos ativados também atuam por meio da fagocitose e da produção de espécies reativas de oxigênio e enzimas proteolíticas, exercendo importante papel na destruição inicial dos parasitos e no recrutamento de fagócitos mononucleares (OLIVEIRA *et al.*, 1997; OLIVEIRA *et al.*, 1998; MURRAY & NATHAN, 1999). Entretanto, já foi demonstrado que neutrófilos podem fagocitar promastigotas e aumentar a expressão de HLA-DR na sua superfície, sem nenhuma associação com ativação de linfócitos T. Ocorre, na verdade, inibição da ativação de linfócitos T através da indução de exaustão dessas células, mediada pelos neutrófilos (SHARMA *et al.*, 2016 e 2017). Além disso, a capacidade da *Leishmania* em bloquear a resposta oxidativa dos neutrófilos favorece sua sobrevivência no interior da célula, que atuará como reservatório para liberação tardia dos parasitos (LAUFS *et al.*, 2002; SHARMA *et al.*, 2016 e 2017). A *Leishmania* pode, ainda, atuar inibindo a via de sinalização da caspase 3, prolongando a sobrevivência dos neutrófilos por até dois ou três dias, que coincide com o período de maior recrutamento de macrófagos para o sítio da infecção (SUNDERKÖTTER *et al.*, 1993; MULLER *et al.*, 2001; AGA *et al.*, 2002). Neste momento, quando os neutrófilos infectados entram em apoptose, a fosfatidilserina expressa em suas membranas é reconhecida pelos macrófagos que engolfam as células ou corpos apoptóticos, culminando na entrada dos parasitos na célula alvo sem que haja ativação de funções efetoras microbicidas (LASKAY; VAN ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003; 2008). Outra via de infecção dos macrófagos consiste na fagocitose direta dos parasitos remanescentes por estes fagócitos (MOSSER; ROSENTHAL, 1993).

A interação inicial dos macrófagos com os parasitos, por meio de seus receptores e moléculas de superfície, é crucial na determinação da capacidade do patógeno em estabelecer a infecção, bem como influencia no tipo de resposta imune adaptativa a ser desencadeada. Em relação às moléculas inerentes aos macrófagos, já foi descrito o envolvimento de diferentes receptores no processo de reconhecimento, como receptores manose-fucose e fibronectina, Fc γ , receptores do complemento e os receptores de reconhecimento de padrão (PRRs) (MOSSER; EDELSON, 1985; MOSSER; HANDMAN, 1992; MOSSER; SPRINGER; DIAMOND, 1992; GUY; BELOSEVIC,

1993; JANSSENS; BEYAERT, 2003). Dentre os PRRs destacam-se os receptores do tipo Toll (TLR2, TLR4 e TLR9), cuja participação na resposta leishmanicida tem sido atribuída não só ao reconhecimento do patógeno, mas também à ativação da expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e do fator nuclear κ B (NF κ B), estando envolvidos no direcionamento à resposta imune inflamatória (KROPF *et al.*, 2004; FLANDIN; CHANO; DESCOTEAUX, 2006; SIMON; SAMUEL, 2007; KAWAI; AKIRA, 2010; TAKEUCHI; AKIRA, 2010).

As células dendríticas (DCs) também compõem o grupo de células da imunidade inata envolvidas na resposta à infecção por *Leishmania* e no direcionamento da resposta imune adaptativa a ser desenvolvida. Neste contexto, o reconhecimento de *L. infantum* via TLR9 está relacionado à ativação da produção de IFN- α/β e de IL-12 por estas células e à ativação da produção de IFN- γ e citotoxicidade de células NK (SCHLEICHER *et al.*, 2007). Evidências recentes também demonstram que o tratamento com paramomicina/miltefosina induz ativação de DCs via TLR9/MyD88, que seria crucial para o controle da infecção (DAS *et al.*, 2014). Após o contato com os parasitos, as DCs iniciam um processo de maturação, que envolve a redução de sua capacidade fagocítica e o aumento da secreção de citocinas/quimiocinas e da expressão de moléculas do complexo de histocompatibilidade maior (MHC) e coestimuladoras, como CD40, CD80 e CD83, permitindo a ativação da resposta imune adaptativa (SANABRIA *et al.*, 2008; FEIJÓ *et al.*, 2016). Adicionalmente, ocorrem alterações na expressão de receptores de quimiocinas, principalmente CCR2, favorecendo a migração das DCs para os órgãos linfoides regionais (SATO *et al.*, 2000; MOLL, 2003; REIS E SOUSA, 2004; SANABRIA *et al.*, 2008). Ao alcançar os órgãos linfóides, as DCs maduras produtoras de IL-12 ativam linfócitos T (LT) CD4⁺ *naïve* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; PANDEY; SUNDAR; PRAJAPATI, 2016). Por outro lado, quando o microambiente induz a secreção de IL-4 e IL-10 pelas DCs ativadas, as células T CD4⁺ *naïve* serão ativados e direcionados a produzir resposta do tipo 2 (KHANNA *et al.*, 2000; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

As células NK também podem atuar na resposta por meio da produção de IFN- γ , que otimiza a produção de IL-12 pelas DCs e a expressão de IL-12R pelos linfócitos T. Também, pode promover a lise de células infectadas via secreção de granulinas. No entanto, existem questionamentos e lacunas em relação à importância destas células

para a resolução da infecção por *Leishmania* (SCHARTON; SCOTT, 1993; WAKIL *et al.*, 1998; SATOSKAR *et al.*, 1999; BOGDAN *et al.*, 2012).

Muitos estudos vêm sendo desenvolvidos com o intuito de associar padrões de resposta imunológica a quadros de susceptibilidade ou resistência à doença. Dentre as citocinas envolvidas na resposta protetora durante a LV, diversos estudos demonstraram a importância de IL-12, TNF- α , IL-17A e IFN- γ (SQUIRES *et al.*, 1989; MURRAY *et al.*, 1992; ENGWERDA *et al.*, 1998; ENGWERDA *et al.*, 2004; GHOSH *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015). Em modelo murino, tem sido descrito que a citocina IL-12 atua na maturação dos granulomas, ativação de mecanismos leishmanicidas de células de Kupffer e indução da produção de IFN- γ por linfócitos do granuloma que, por sua vez, atuará em sinergia à IL-12 na ativação dos macrófagos (MURRAY *et al.*, 1992; ENGWERDA *et al.*, 1998). Em um trabalho de Rolão e colaboradores (2007), observou-se a correlação entre aumento da produção de IFN- γ e redução do parasitismo no baço de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum*. Além da ativação dos monócitos, a expressão de IFN- γ parece estar relacionada à regulação da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas durante a LV experimental, dentre as quais se destaca a CCL5, que foi associada ao recrutamento de linfócitos T CD4⁺ e ao controle inicial do parasitismo nos sítios da infecção. Além disso, a ausência desta quimiocina levou à persistência da infecção por *L. donovani* no fígado de camundongos C57BL/6 CCL5^{-/-} (MURRAY *et al.*, 2017). Outra citocina que contribui para a maturação dos granulomas é o TNF- α . A ausência desta citocina possibilita o crescimento rápido de parasitos no fígado, associado ao atraso na formação dos granulomas (TUMANG *et al.*, 1994; MURRAY *et al.*, 2000; ENGWERDA *et al.*, 2004). No baço, um estudo recente de Nascimento e colaboradores (2015) demonstrou que o papel protetor da citocina IL-17A está relacionado à ativação da produção e IFN- γ por linfócitos T CD4⁺.

Em contrapartida, a citocina IL-10 está associada à susceptibilidade na LV (VOULDOUKIS *et al.*, 1997; KANE; MOSSER, 2001; MURPHY *et al.*, 2001; MURRAY, HENRY *et al.*, 2003; KUMAR; NYLÉN, 2012). Murray e colaboradores (2003) demonstraram que o bloqueio do receptor da IL-10 aumenta a resistência à infecção por *L. donovani*, e o bloqueio desta citocina em culturas *in vitro* promove o aumento da produção de IFN- γ e o *clearance* de amastigotas (GAUTAM *et al.*, 2011). Macrófagos, DCs, NKTs, células T CD4⁺ e CD8⁺ e células B já foram descritas como fontes de IL-10 (MAROOF *et al.*, 2008; BANKOTI *et al.*, 2012; NANDAN *et al.*,

2012; RESENDE *et al.*, 2013). Especificamente, estudos recentes descreveram a existência de células T CD4⁺ que secretam simultaneamente IFN- γ e IL-10 (OWENS *et al.*, 2012; RESENDE *et al.*, 2013), após serem ativadas por IL-12 e IL-27 provenientes de DCs infectadas (RESENDE *et al.*, 2013). A depleção destas DCs aumenta a resistência à doença (OWENS *et al.*, 2012). Além da IL-10, altos níveis de expressão da citocina TGF- β também foram relacionados a picos de parasitismo no fígado e no baço (ROLÃO *et al.*, 2007)

No âmbito da LV humana, a resposta de indivíduos assintomáticos é caracterizada por um perfil sérico misto/balanceado e basal de citocinas tanto pró-inflamatórias, como IFN- γ , TNF- α , IL-12, essenciais para a eliminação do parasito, quanto de citocinas reguladoras, dentre elas IL-4, IL-10, IL-5 e IL-13, que previnem a exacerbação da resposta celular (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005, 2006; ANSARI; RAMESH; SALOTRA, 2006; KHOSHDEL *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013; RAMOS *et al.*, 2016). Adicionalmente, em estudo avaliando o perfil de produção de citocinas por células da imunidade inata de indivíduos assintomáticos, observou-se que o estímulo com antígeno solúvel de *L. chagasi* induziu aumento do número de neutrófilos, eosinófilos, células NK e monócitos produtores de citocinas tanto pró-inflamatórias, como moduladoras por esses indivíduos, semelhante ao observado na análise de citocinas circulantes (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005). Outros estudos mostraram, também, que linfócitos T CD4⁺ de indivíduos assintomáticos apresentam maior resposta proliferativa e produzem quantidades mais elevadas das citocinas IFN- γ e TNF- α em resposta a estímulos específicos ou inespecíficos, as quais são fundamentais na ativação da produção de espécies reativas de oxigênio pelos fagócitos e na eliminação dos parasitos (CARVALHO *et al.*, 1992; COSTA *et al.*, 1999; HOLADAY *et al.*, 1993; KAYE; AEBISCHER, 2011; KAYE; SCOTT, 2011).

Além destas citocinas, foi demonstrado que células mononucleares do sangue periférico de indivíduos assintomáticos produzem níveis mais elevados de citocinas Th17 em relação aos pacientes com a forma ativa da doença (PITTA *et al.*, 2009; GHOSH *et al.*, 2013). Embora alguns estudos tenham demonstrado que esta citocina possa estar envolvida na patogênese durante a leishmaniose cutânea (BACELLAR *et al.*, 2009; MAGALHÃES *et al.*, 2013), na leishmaniose visceral causada por *Leishmania donovani* foi demonstrado que indivíduos assintomáticos produzem níveis mais elevados de IL-17A, juntamente a citocinas Th1, quando comparado aos pacientes

com LV clássica (PITTA *et al.*, 2009). Também, Nascimento e colaboradores (2015) demonstraram aumento de IL-17A em pacientes com LV e acredita-se que esta citocina atuaria sinergicamente ao IFN- γ , aumentando a produção de NO por macrófagos infectados (NASCIMENTO *et al.*, 2015). Com relação à IL-10, tem sido demonstrado que culturas de leucócitos obtidos de indivíduos assintomáticos, quando estimuladas com antígenos de *L. infantum*, apresentam baixos níveis desta citocina, equivalentes aos níveis produzidos por indivíduos saudáveis (COSTA *et al.*, 1999; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005).

Em contrapartida, a LV clássica está associada à exacerbação na ativação do sistema imune, com predomínio da produção de citocinas reguladoras como IL-4, IL-10 e TGF- β , embora também sejam observados níveis elevados de citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α , IL-6 e CXCL8/IL-8, indicando ausência de contra regulação (RAZIUDDIN *et al.*, 1994; VAN DER POLL; ZIJLSTRA; MEVISSSEN, 1995; CALDAS *et al.*, 2005; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2006; DUARTE *et al.*, 2009; FRADE *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2016). Dentre estas citocinas, a IL-10 tem sido descrita como um dos principais mediadores do estabelecimento e desenvolvimento da LV clássica não grave e grave, e desempenha importante papel na supressão da resposta imunológica (CALDAS *et al.*, 2005; ANSARI; RAMESH; SALOTRA, 2006; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2006; KHOSHDEL *et al.*, 2009; COSTA, *et al.*, 2013).

Durante a LV, os diferentes mecanismos já descritos de atuação da IL-10 incluem: (i) desativação da função leishmanicida de macrófagos, via produção de NO; (ii) redução drástica dos níveis de produção de TNF- α por monócitos e macrófagos; (iii) diminuição da expressão de MHC-II, de moléculas coestimuladoras e da produção de IL-12 por macrófagos e DCs; (iv) inibição da maturação e migração de DCs para os órgãos linfóides e (v) inibição da maturação de células B, especialmente células B reguladoras produtoras de IL-10 e indutoras de exaustão de LT (WU *et al.*, 1993; VOULDOUKIS *et al.*, 1997; BHATTACHARYYA *et al.*, 2001; GANTT *et al.*, 2001; KANE; MOSSER, 2001; MOORE *et al.*, 2001; ATO *et al.*, 2002; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005; NYLEN; SACKS, 2007; SCHAUT *et al.*, 2016). As principais fontes desta citocina na LV clássica são monócitos, macrófagos, DCs, linfócitos B reguladoras IgD⁺, células T CD8⁺ e células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ FOXP3⁺ (ATO *et al.*, 2002; BROWN; REINER, 1999; HOLADAY, 2000; NYLEN;

SACKS, 2007; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2006; SMELT *et al.*, 2000; SCHAUT *et al.*, 2016). Neste sentido, diversos trabalhos têm relatado altos níveis de IL-10 no soro e no plasma de pacientes com LV clássica (CALDAS *et al.*, 2005; HAILU *et al.*, 2005; ANSARI; SALUJA; SALOTRA, 2006; KURKJIAN *et al.*, 2006), bem como aumento da expressão de mRNA codificador de IL-10 por linfócitos T presentes no baço dos pacientes (NYLEN *et al.*, 2007).

Recentemente, a expressão de níveis elevados de IL-10 e de IL-6, têm sido associadas à gravidade da LV causada por *L. infantum* (DOS SANTOS *et al.*, 2016; RAMOS *et al.*, 2016). Em crianças, a IL-6 tem sido descrita como a principal citocina associada à letalidade na LV, embora a gravidade da doença também tenha sido relacionada à produção de IL-1 β , CXCL8/IL-8 e TNF- α (COSTA *et al.*, 2013; LIMA *et al.*, 2014; DOS SANTOS *et al.*, 2016). Por outro lado, já foi reportado que na infecção por *L. donovani*, a gravidade da LV está associada à produção de elevados níveis de IL-10, CXCL8/IL-8 e baixos níveis de IL-12 (KURKJIAN *et al.*, 2006). Além disso, a diminuição da expressão da molécula CD2 por linfócitos T CD4⁺ e o aumento de apoptose relacionado à expressão de CD95L, particularmente em linfócitos Th1, têm sido associados à depressão do sistema imune em pacientes com LV clássica (POTESTIO *et al.*, 2004; BIMAL *et al.*, 2008). Também podemos citar como biomarcadores da LV a diminuição da frequência de células T CD8⁺CD18⁺ e CD8⁺CD45RO⁺ circulantes e o aumento destas populações na medula óssea (MO) (CLARÊNCIO *et al.*, 2009). Paralelamente, linfócitos T CD8⁺ provenientes de pacientes com LV clássica expressam níveis mais elevados dos marcadores de exaustão celular CTLA-4 (*Cytotoxic T lymphocyte antigen-4*) e PD-1 (proteína de morte celular programada 1), em relação aos níveis apresentados por indivíduos saudáveis e por pacientes após o tratamento (GAUTAM *et al.*, 2014).

No âmbito das células T da imunidade inata, diversos trabalhos demonstraram aumento da frequência de linfócitos T $\gamma\delta$ no sangue periférico de pacientes com diferentes formas clínicas das leishmanioses, tanto de células T $\gamma\delta$ CD4⁺ ou CD8⁺, quanto de células duplo negativas (DN), embora o papel destas células não esteja bem esclarecido (RAZIUDDIN *et al.*, 1992; RUSSO *et al.*, 1993; ANTONELLI *et al.*, 2006). O estudo de Lagler e colaboradores (2003) sobre a expressão de citocinas pelas células T $\gamma\delta$ sugere que sua função seja reguladora, com co-expressão de IFN- γ e IL-10. Na LV

uma grande proporção das células T $\gamma\delta$ CD4⁺ também co-expressam marcadores de ativação como CD25, CD38, CD71 e HLA-DR (RAZIUDDIN *et al.*, 1992).

Outro tipo de célula T da imunidade inata amplamente estudado são as células NKTs, as quais compartilham marcadores de superfície de células NK, como o NK1.1 (CD161), e apresentam TCRV α 14 (murino) e TCRV α 24 (humano) (BENDELAC; SAVAGE; TEYTON, 2007). Classicamente, estas células são ativadas ao reconhecerem antígenos glicolipídicos apresentados por moléculas CD1d de DCs, porém já foi demonstrado que as NKT podem ser indiretamente ativadas pela secreção de IL-12 por DCs (TSUJI, 2006; SLAUENWHITE; JOHNSTON, 2015; ZAJONC; GIRARDI, 2015). Quando ativadas, as NKTs atuam por meio da produção de citocinas como IFN- γ , TNF- α , IL-4, IL-10 e IL-13 e podem apresentar ação citotóxica (GODFREY *et al.*, 2000; METELITSA *et al.*, 2001; COQUET *et al.*, 2008). No âmbito da leishmaniose visceral, estudos demonstraram que o reconhecimento de lipofosfoglicanos (LPG) e glicosíngofosfolípídeos (GSPL) derivados de *L. donovani*, via apresentação de antígenos pela molécula CD1d, é capaz de ativar as células NKT e sugerem a importância desta via na fase inicial da resposta imunológica (AMPREY *et al.*, 2004; KARMAKAR; PAUL; DE, 2011). Além disso, a infecção de células apresentadoras de antígenos (APCs) por *L. donovani* e *L. infantum* pode ocasionar aumento da expressão do CD1d na superfície destas células (CAMPOS-MARTÍN *et al.*, 2006; KARMAKAR; PAUL; DE, 2011). Quanto às células NKT invariantes, ou iNKT, estas parecem atuar no desenvolvimento e sustentação da resposta inflamatória hepática na infecção por *L. donovani*, por meio da produção de IFN- γ , contribuindo para a organização eficiente de granulomas e redução da carga parasitária (BEATTIE *et al.*, 2011; ROBERT-GANGNEUX *et al.*, 2012)

Com relação às células T invariantes de mucosa, ou células MAIT, as quais são o foco do presente trabalho, estas são caracterizadas pela expressão de elevados níveis do marcador de superfície CD161 de células NKT e pela expressão do receptor de células T (TCR) semi-invariante, cuja cadeia alfa contém hAV7S2 e AJ33, denominado TCRV α 7.2J α 33 (TILLOY *et al.*, 1999; SHIMAMURA *et al.*, 2009; DUSSEAU *et al.*, 2011). O TCR semi-invariante das células MAIT responde exclusivamente à antígenos apresentados pela molécula relacionada ao MHC-I (MR1), que pertence ao grupo de proteínas do MHC de classe Ib não clássicas (TILLOY *et al.*, 1999; TREINER *et al.*, 2003). Esta via de apresentação de antígenos foi inicialmente evidenciada em estudo *in*

vitro de ativação de células MAIT e bloqueio por anticorpo monoclonal anti-MR1 (HUANG *et al.*, 2005). Posteriormente, estudos de cristalografia demonstraram a afinidade do MR1 por ligantes derivados de metabólitos de vitaminas, como moléculas da via de síntese da riboflavina bacteriana (vitamina B2), que é única em bactérias e fungos, porém ausente em mamíferos (TILLOY *et al.*, 1999; KJER-NIELSEN *et al.*, 2012; CORBETT *et al.*, 2014; GHERARDIN *et al.*, 2016). A identificação destes ligantes permitiu a confirmação desta via de apresentação de antígenos, por meio da ativação de células MAIT por metabólitos de vitamina B2 que foram capazes de se ligarem ao MR1, dentre os quais o 5-(2-oxopropylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil (5-OP-RU) e o 5-(2-oxoethylideneamino)-6-D-ribitylaminouracil (5-OE-RU) se destacaram como os mais potentes (KJER-NIELSEN *et al.*, 2012; CORBETT *et al.*, 2014; MAK *et al.*, 2017). Estes compostos, embora sejam muito sensíveis à desidratação, são estabilizados pela ligação ao MR1. Os ligantes derivados de sua degradação também são capazes de ativar as células MAIT, entretanto a ativação é muito menos potente (KJER-NIELSEN *et al.*, 2012; CORBETT *et al.*, 2014; MAK *et al.*, 2017).

Kjer-Nielsen e colaboradores (2012) também identificaram que o 6-formylpterin (6FP), um metabólito de vitamina B9, e um composto sintético relacionado ao metabólito, o acetyl-6-formylpterin (Ac-6-FP), também são capazes de se ligar ao MR1. Estes dois compostos se diferem apenas pela presença do grupo acetil no composto sintético e são capazes de aumentar a expressão do MR1 na superfície das APCs, embora eles não ativem a maioria das células MAIT (KJER-NIELSEN *et al.*, 2012; REANTRAGOON *et al.*, 2013; ECKLE *et al.*, 2014). Ambos os compostos competem pela ligação ao MR1 com moléculas ativadoras de células MAIT, como o 5-OP-RU, e por esse motivo são considerados ligantes de inibição destas células, sendo o composto sintético 100 vezes mais potente nesta função em comparação ao metabólito (KJER-NIELSEN *et al.*, 2012; REANTRAGOON *et al.*, 2013; ECKLE *et al.*, 2014).

Recentemente foi descrita a capacidade de algumas drogas e de metabólitos de drogas em se ligar ao MR1, como salicilatos (3-formil-salicílico) e metabólitos do anti-inflamatório diclofenaco (5-hidroxi-diclofenaco, 5-OH-DCF). A maioria das moléculas testadas não exibiu atividade estimuladora, embora algumas delas tenham atuado como agonistas dos compostos estimuladores de células MAIT (KELLER *et al.*, 2017).

Diferentemente das moléculas apresentadoras de antígenos clássicas, o MR1 é pouco expresso na superfície de células apresentadoras de antígenos em estado de

repouso, sendo estocado no retículo endoplasmático (RE) em uma configuração imatura, que favorece a interação com o ligante (MCWILLIAM *et al.*, 2016). O acoplamento do antígeno por ligação covalente ao sítio de ligação, denominado *Schiff base*, induz a reorganização estrutural do MR1 para sua configuração final e permite o seu transporte para a superfície da célula (MCWILLIAM *et al.*, 2016). Subsequentemente, os complexos MR1-ligante são internalizados e a maior parte é degradada independentemente da afinidade do ligante pela molécula apresentadora de antígenos (MCWILLIAM *et al.*, 2017). Entretanto, a via de acesso dos ligantes ao MR1 no RE permanece desconhecida, tendo sido sugerida a fusão com endossomos, o extravasamento de antígenos no citosol e a liberação pelo fagolisossomo (MCWILLIAM *et al.*, 2016).

Com relação ao TCRV α 7.2J α 33, sua cadeia TCR α é composta por um segmento TRAV1-2, geralmente combinado com o segmento TRAJ33, embora o uso menos comum de TRAJ12 e TRAJ20 também já tenha sido descrito dentro do repertório das células MAIT (REANTRAGOON *et al.*, 2013). A observação de modificações e inserções nas junções V α -J α faz com que a cadeia TCR α não seja considerada completamente invariável, mesmo que as modificações encontrem-se nas bases da região determinante de complementaridades 3 α (CDR3 α) e não nas regiões que interagem com os antígenos (REANTRAGOON *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2013). A cadeia TCR β é determinada por uma família rica de genes TRBV e sua combinação com o TRAV garante ao receptor relativa heterogeneidade e variedade já demonstradas em estudos de sequenciamento, que têm sido relacionadas à diversidade funcional desta população, sugerindo a especialização oligoclonal destas células para respostas específicas a patógenos (TILLOY *et al.*, 1999; GOLD *et al.*, 2014; LEPORE *et al.*, 2014; GHERARDIN *et al.*, 2016). Neste sentido, já foi demonstrada a expansão clonal de células MAIT específicas expressando diferentes TCRs em resposta a diferentes grupos de patógenos, incluindo bactérias gram-positivas, gram-negativas e fungos (GOLD *et al.*, 2010; LEPORE *et al.*, 2014).

Recentemente, Gherardin e colaboradores (2016) descreveram a existência de uma população restrita ao MR1, que expressa TCR TRAV1-2^{neg} capaz de se ligar a uma região mais central do MR1, sugerindo sua capacidade de reconhecer diferentes antígenos. De acordo com essa proposta, foi demonstrado que esta população TRAV1-2^{neg} é capaz de responder à bactéria *Streptococcus pyogenes*, que não metaboliza a

riboflavina, indicando que o MR1 pode induzir ativação pela apresentação de antígenos independentemente da via de metabolização da riboflavina (MEERMEIER *et al.*, 2016).

Com relação ao fenótipo, as células MAIT são CD3⁺, predominantemente CD8αα⁺ ou DN e, em estado de repouso, expressam fenótipo de memória efetora caracterizado por CD45RA^{lo}CD45RO⁺CD27^{neg} (TILLOY *et al.*, 1999; DUSSEAUX *et al.*, 2011; GOLD *et al.*, 2013). Também, apresentam em sua superfície os receptores de quimiocinas CCR9^{int}CCR5^{hi}CXCR6^{hi}CCR6^{hi}, condizentes com sua preferente localização em tecidos de mucosa, onde atuam como sentinelas prontas para responder a infecções (TREINER *et al.*, 2003; DUSSEAUX *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2015). De acordo com essas características, as células MAIT têm sido descritas na lâmina própria do intestino, no fígado e nos pulmões, dentre outros tecidos, bem como no sangue periférico (TREINER *et al.*, 2003; KAWACHI *et al.*, 2006; LE BOURHIS *et al.*, 2011) (Figura 1). Entretanto, assim como diversos outros fatores do sistema imunológico, os percentuais de células MAIT variam ao longo da vida. A frequência de células MAIT em recém-nascidos e crianças é baixa, porém crescente, atingindo o platô entre 30 e 40 anos, com posterior redução progressiva ao longo do envelhecimento (Figura 2), semelhantemente à cinética de funcionalidade do timo (LEE *et al.*, 2014; NOVAK *et al.*, 2014). Recentemente Youssef e colaboradores (2017) demonstraram que as células MAIT são geradas desde estágios iniciais da gestação, porém a maioria das células T TCRVα7.2⁺CD161^{hi} existentes no sangue de cordão não são capazes de reconhecer tetrâmeros de MR1-5-OP-RU e não apresentam um repertório TRAV/TRBV semelhante ao de indivíduos adultos. Após poucas semanas de vida, apenas as células TCRVα7.2⁺CD161^{hi} reativas a MR1-5-OP-RU adquirem fenótipo de memória e expandem para gerar o “pool” de células MAIT do indivíduo adulto (Youssef *et al.*, 2017).

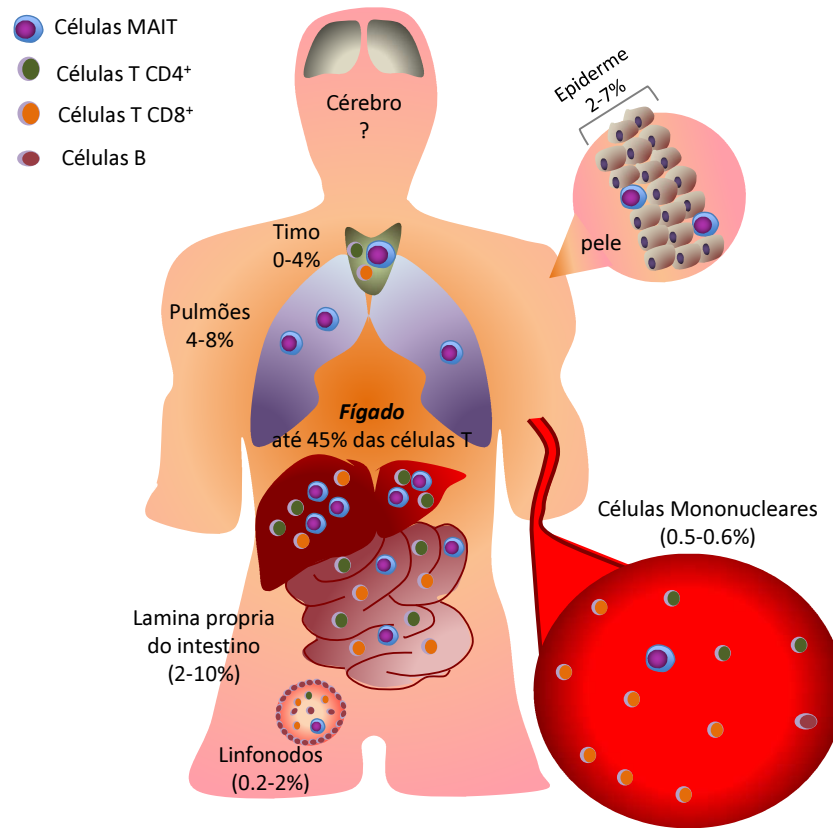


Figura 1: Localização das Células T Invariantes de Mucosa (MAIT). Frequências significativas de células MAIT têm sido observadas nos pulmões, no timo, nos linfonodos, na epiderme e principalmente no fígado, na lâmina própria do intestino e no sangue periférico. *Adaptado de Moreira et al. (2017).*

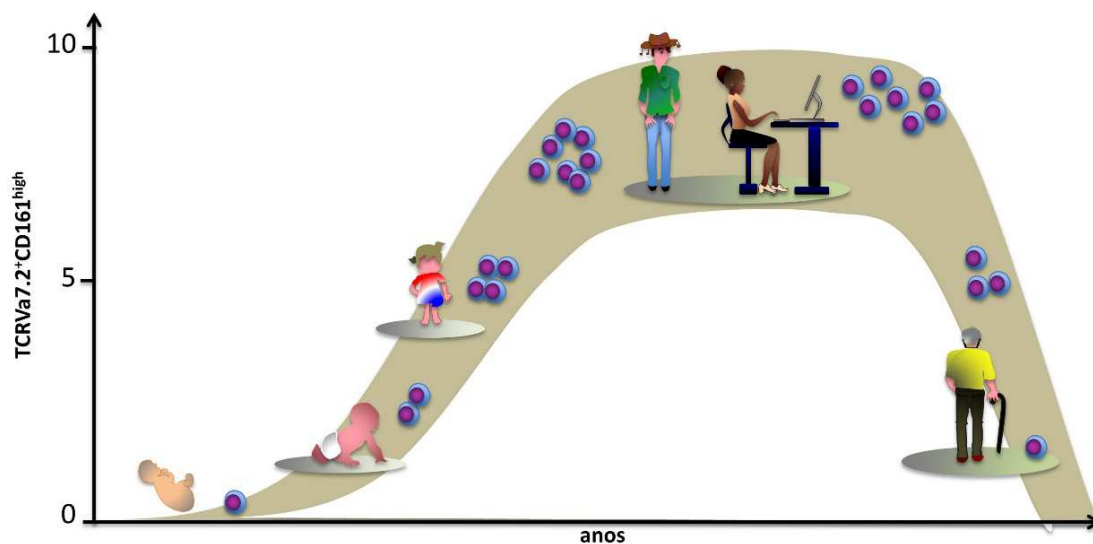


Figura 2: Cinética da frequência de Células MAIT ao longo da vida. A frequência de células MAIT é baixa em recém-nascidos, e estas permanecem como células raras ao longo da infância, apesar de apresentarem aumento constante de sua frequência até a fase adulta, quando atingem o platô entre 30 e 40 anos de idade. Após esse período, as quantidades de células MAIT diminuem gradualmente (LEE *et al.*, 2014; NOVAK *et al.*, 2014). *Adaptado de Moreira et al. (2017).*

Enquanto o MR1 é bastante conservado entre mamíferos (BOUDINOT *et al.*, 2016), as células MAIT de camundongos apresentam algumas diferenças em relação às células MAIT humanas. Uma delas consiste na expressão do TCRV α 19, diferentemente das células humanas que expressam o TCRV α 7.2. Até o momento, não há disponibilidade de anticorpos para a marcação do TCRV α 19. Por isso, o desenvolvimento de tetrâmeros de MR1 foi de grande importância para a identificação da presença de células MAIT em diversos tecidos de camundongos C57BL/6 e BALB/c (REANTRAGOON *et al.*, 2013; CORBETT *et al.*, 2014; GHERARDIN *et al.*, 2016), bem como permitiu o aprofundamento dos estudos em modelo murino.

As células MAIT murinas, ao contrário das humanas, exibem um fenótipo de células *naïve*, quando em estado de repouso, caracterizado pela baixa expressão de CD44 (DUSSEAUX *et al.*, 2011; CUI *et al.*, 2015). Por outro lado, assim como em humanos, a maioria das células MAIT observadas em camundongos são CD8 $\alpha\alpha^+$ ou duplo negativas (CD4 $^-$ CD8 $^-$). Embora também sejam observadas células MAIT CD4 $^+$, em camundongos as células MAIT CD8 $^+$ aparentam ter maior propensão à resposta pró-inflamatória e esta atividade parece envolver a molécula CD8, além do reconhecimento de antígenos via MR1 (SHIMAMURA *et al.*, 2009; DUSSEAUX *et al.*, 2011). Quando estimuladas, as células MAIT murinas são capazes de produzir IFN- γ , TNF- α e IL-17A (CROXFORD *et al.*, 2006; IVANOV *et al.*, 2006; SHIMAMURA *et al.*, 2008; SHIMAMURA *et al.*, 2009; LE BOURHIS *et al.*, 2010; DUSSEAUX *et al.*, 2011; TANG *et al.*, 2013; GOLD *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2016).

Em ambos, humanos e murinos, estudos recentes sugerem que as células MAIT apresentam restrição ao MR1 desde estágios iniciais, como no cordão umbilical e no timo, contudo apresentam capacidade efetora reduzida em comparação às células do sangue periférico, sugerindo a necessidade de um processo de maturação extratímica para a funcionalidade destas células (Figura 3) (MARTIN *et al.*, 2009; GOLD *et al.*, 2013; KOAY *et al.*, 2016). Neste sentido, o trabalho de Koay e colaboradores (2016) propõe, em modelo murino, que a maturação das células MAIT passe por três estágios, caracterizados fenotipicamente como: CD24 $^+$ CD44 $^-$ no estágio 1, CD24 $^-$ CD44 $^-$ no estágio 2 e CD24 $^-$ CD44 $^+$ no estágio 3. O primeiro processo de maturação (estágio 1) ocorre no timo e é dependente de MR1, enquanto que a segunda maturação (estágios 2 e 3), extratímica, parece ser dependente de contato com a microbiota comensal. Essa dependência do contato com a microbiota comensal para maturação final das células

segunda etapa acontece nos tecidos periféricos e parece ser dependente do contato com a microbiota comensal. *Adaptado de Moreira et al. (2017).*

O papel das células MAIT na resposta a infecções, bem como a participação do MR1 na resposta têm recebido atenção crescente nos últimos anos. Já foi demonstrado que esta população celular é capaz de ser ativada por diferentes tipos de bactérias e leveduras, incluindo *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Lactobacillus acidophilus*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Sacharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* and *Candida glabrata* (LE BOURHIS *et al.*, 2010). Também já foi descrita a ativação de células MAIT, via MR1, por macrófagos infectados com *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* e *Shigella flexneri*, o que resultou em aumento da expressão dos marcadores de ativação CD69 e CD25 e do marcador de degranulação CD107a, bem como aumento da produção das citocinas IFN- γ e TNF- α (GOLD *et al.*, 2010; LE BOURHIS *et al.*, 2010, 2013; DIAS *et al.*, 2016) (Figura 4).

Em geral, pacientes com infecção bacteriana severa apresentam perda significativa de células MAIT circulantes em comparação a indivíduos saudáveis. Além disso, a incidência de infecções hospitalares em pacientes de centros de terapia intensiva foi maior em indivíduos com diminuição persistente de células MAIT (GRIMALDI *et al.*, 2014). Já entre pacientes com infecções generalizadas, a diminuição de células MAIT foi menos acentuada nos indivíduos com infecção estreptocócica, em relação aos pacientes com infecção não-estreptocócica (GRIMALDI *et al.*, 2014). Estes resultados podem estar relacionados à possíveis perdas de vias metabólicas por espécies de *Streptococcus*, as quais seriam necessárias para a produção de ligantes capazes de ativar células MAIT via MR1 (GHAZARIAN, CAILLAT-ZUCMAN & HOUDOUIN, 2017).

Além disso, diversos estudos têm relatado a diminuição da frequência de células MAIT no curso da infecção com diferentes micro-organismos e atribuído estes resultados a inúmeros fatores, como migração, exaustão e apoptose. De fato, vários trabalhos publicados relataram redução da frequência e do número absoluto de células MAIT circulantes em pacientes infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, em comparação a indivíduos saudáveis (GOLD *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2015). No estudo realizado por Le Bourhis e colaboradores (2010), a hipótese de migração das células MAIT foi reforçada pela identificação de alta frequência destas células no pulmão. Por outro lado, Kwon e colaboradores (2015) relataram que a

diminuição de células MAIT circulantes pode estar relacionada à elevada expressão de PD-1 e correlacionou a deficiência destas células com a severidade da doença. Além disso, células MAIT de pacientes com tuberculose ativa produzem menores quantidades de IFN- γ , TNF- α , IL-17F, granulinas e granzima B e expressam mais CD69 (JIANG *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2015).

Embora a participação das células MAIT na resposta a infecções virais não tenha sido tão explorada quanto o seu papel nas infecções bacterianas, alguns estudos têm proposto a ativação indireta destas células (JO *et al.*, 2014; LOH *et al.*, 2016). Resultados publicados por Sattler e colaboradores (2015) demonstraram que, na ausência da sinalização via MR1 e TCRV α 7.2J α 33, as células MAIT humanas podem ser ativadas e produzir IFN- γ e granzima B, por meio de mecanismo dependente de sinalização por STAT-5 e secreção de IL-18 por monócitos (SATTLER *et al.*, 2015) (Figura 4).

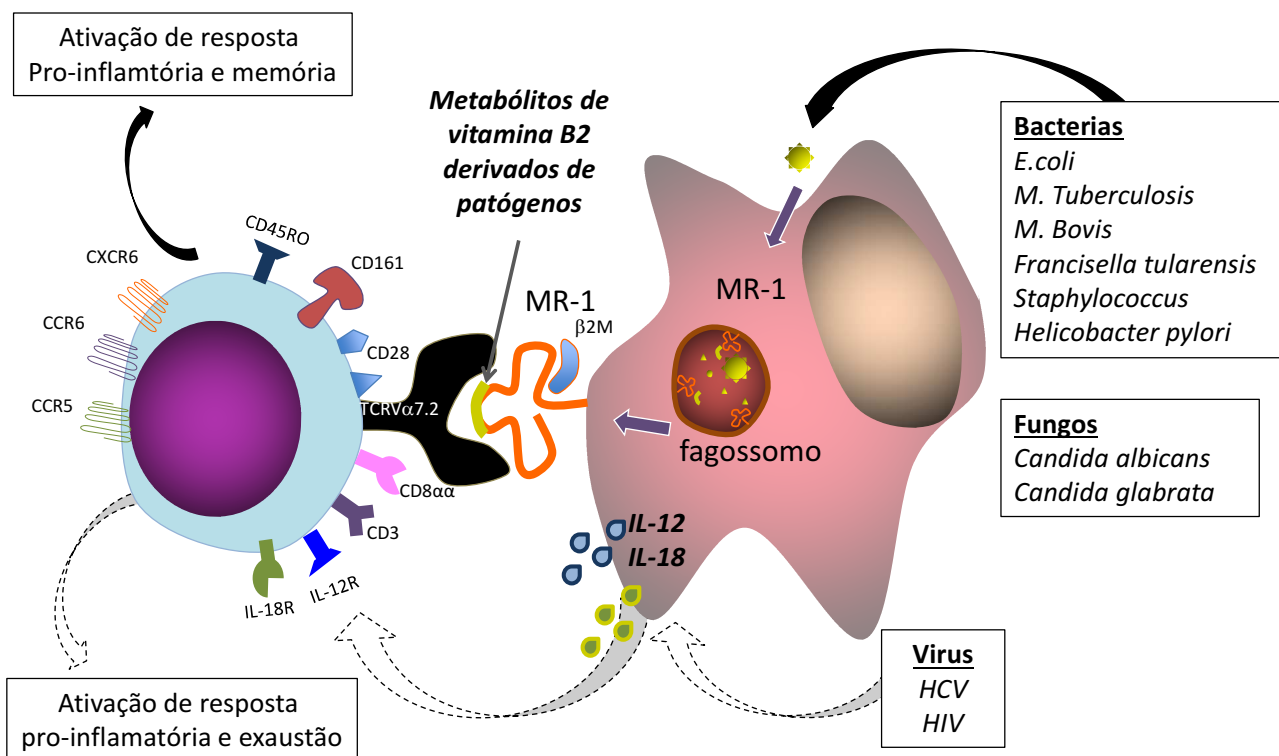


Figura 4: Receptores de superfície e ativação de células MAIT. As células MAIT são caracterizadas pela expressão do TCRV α 7.2 e de altos níveis de CD161. Em adultos saudáveis, as células MAIT são predominantemente CD8 α ⁺ ou duplo-negativas e em estado de repouso expressam fenótipo de memória efetora (CD45RA^{low}CD45RO⁺CD27^{neg}), altos níveis dos receptores das citocinas IL-12 e IL-18 e apresentam perfil de expressão de receptores de superfície caracterizados por CCR9^{hi}CCR7⁻CCR5^{hi}CXCR6^{hi}CCR6^{hi}. As células MAIT podem ser ativadas diretamente via MR1, pela apresentação de antígenos relacionados à via metabólica da vitamina B2. Indiretamente, elas podem ser ativadas pelas citocinas IL-12 e IL-18 produzidas

por células apresentadoras de antígenos. Quando ativadas, as células MAIT são capazes de desencadear forte resposta pró-inflamatória. *Adaptado de Moreira et al. (2017).*

No caso da infecção pelo vírus influenza H7N9, a redução da frequência de células MAIT está relacionada ao quadro fatal da doença, enquanto que indivíduos convalescentes apresentam aumento da frequência destas células no sangue periférico, indicando seu papel na primeira linha de defesa em infecções graves por *Influenza* (LOH *et al.*, 2016).

No contexto da infecção pelo vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), muitos estudos apontaram redução no número de células MAIT circulantes associada à deficiente expressão de CCR6 e, que apesar do sucesso do tratamento, os pacientes são incapazes de recuperar os níveis basais desta população celular (COSGROVE *et al.*, 2013; LEEANSYAH *et al.*, 2013; WONG *et al.*, 2013; EBERHARD *et al.*, 2014; GREATHEAD *et al.*, 2014; USSHER *et al.*, 2015). De modo semelhante, também foi relatada na infecção por HCV a redução na frequência de células MAIT no sangue periférico. Nos dois casos há exacerbação da ativação das células MAIT, com aumento da expressão de CD38, CD69 e HLA-DR. Uma hipótese para ocorrência da perda de células estaria relacionada à exaustão, uma vez que foi observado aumento da expressão das moléculas TIM-3, PD-1, CTLA-4 e CD57 e diminuição de CD127, CCR5 e CD103 por estas células (LEEANSYAH *et al.*, 2013; EBERHARD *et al.*, 2014; JO *et al.*, 2014; FERNANDEZ *et al.*, 2015; MUTTIAH *et al.*, 2015).

Desde a sua primeira descrição, há cerca de dezoito anos, até o os dias atuais, todo o conhecimento acumulado a respeito das células MAIT sugere importante papel desta população na resposta às infecções por bactérias, fungos e vírus, independentemente da via de ativação ser direta via MR1 e TCRV α 7.2J α 33, ou indireta via IL-18 (MARTIN *et al.*, 2009; LE BOURHIS *et al.*, 2010; JO *et al.*, 2014; SATTLER *et al.*, 2015). Entretanto, até o presente momento, não há na literatura trabalhos que descrevam o comportamento destas células na infecção por parasitos do gênero *Leishmania*. Considerando que foi demonstrado o tráfego do MR1 por compartimentos endocíticos e sua capacidade de apresentar antígenos endógenos ou da via endocítica (HUANG *et al.*, 2008), é possível que antígenos de parasitos do gênero *Leishmania* sejam apresentados por MR1, ativando diretamente células MAIT.

Além disso, a abundância de células MAIT circulantes e seu perfil de expressão de receptores de quimiocinas, que favorece sua migração para o fígado e tecidos

inflamados, bem como sua capacidade de produzir IFN- γ , TNF- α e IL-17 (TREINER *et al.*, 2003; KAWACHI *et al.*, 2006; SHIMAMURA *et al.*, 2009; LE BOURHIS *et al.*, 2011) reforçam o interesse sobre investigações acerca de seu papel na leishmaniose. Dessa forma, considerando a possibilidade do envolvimento das células MAIT na leishmaniose, bem como suas características de célula de memória e seu papel ativador/regulador de resposta imunológica em doenças infecciosas, torna-se relevante o estudo desta população celular na leishmaniose visceral humana.

4. METODOLOGIA

4.1 Papel das células T invariantes de mucosa (MAIT) na leishmaniose visceral humana

4.1.1 Caracterização da população avaliada e desenho do estudo

O presente estudo é transversal comparativo e inclui crianças não infectadas, crianças infectadas com LV assintomática e crianças infectadas com LV clássica não grave, conforme ilustrado na figura 5.

As crianças não infectadas e com LV assintomática foram recrutadas entre as crianças participantes de um estudo de coorte do Programa de Controle da Leishmaniose Visceral (PCLV), na regional Noroeste de Belo Horizonte (bairros Serrano, Pindorama e Glória), coordenado pela pesquisadora Dra. Mariângela Carneiro da Universidade Federal de Minas Gerais. Para o recrutamento, levaram-se em consideração os resultados sorológicos e de PCR para diagnóstico de LV, bem como a avaliação clínica das crianças realizada pela médica infectologista Dra. Janaína de Moura Freire. As coletas de sangue foram realizadas nas residências das crianças por profissional enfermeiro da equipe médica participante do estudo do PCLV.

Crianças com LV clássica não grave, residentes na região metropolitana de Belo Horizonte, foram recrutadas no Hospital Infantil João Paulo II (HIJPII), da rede FHEMIG, por profissionais médicos colaboradores do estudo, seguindo os critérios de inclusão e exclusão propostos no projeto. A partir das análises clínicas foi possível observar que todas as crianças com LV clássica envolvidas no estudo apresentaram febre, a maioria delas apresentou distensão abdominal (aproximadamente 65% das crianças). Pacientes do grupo LV clássica não grave selecionados para o estudo apresentavam alterações em parâmetros bioquímicos de avaliação de função hepática, com elevados níveis médios de transaminases (transaminase glutâmico oxalacética-TGO ($224,69 \pm 220,87$ U/L) e transaminase glutâmico pirúvica-TGP ($114,69 \pm 110,20$ U/L)) e Gama glutamil transpeptidase-GGT ($132,83 \pm 183,26$ U/L). Os pacientes apresentavam níveis normais de fosfatase alcalina-FA ($231,67 \pm 170,59$ U/L), bilirrubina total BT ($0,53 \pm 0,25$ mg/dL), bilirrubina direta ($0,43 \pm 0,24$ mg/dL), proteínas totais ($6,67 \pm 0,77$ g/dL) e albumina ($2,94 \pm 0,44$ g/dL). Também os parâmetros bioquímicos de avaliação de função renal como uréia ($19,28 \pm 3,93$ mg/dL) e creatinina ($0,32 \pm 0,12$ mg/dL), encontravam-se dentro dos níveis normais. Os pacientes apresentavam ainda alteração característica de anemia grave observada através da dosagem dos níveis de hemoglobina ($7,59 \pm 1,68$ g/dL). Os pacientes foram tratados de acordo com as recomendações do Ministério da Saúde (MS, 2001 e nota técnica MS, 2013).

Dessa forma, neste estudo foram avaliados e comparados os seguintes grupos:

Grupo NI – Indivíduos não infectados;
Grupo AS – Indivíduos com LV assintomática;
Grupo LV – Pacientes com diagnóstico de LV clássica não grave confirmada laboratorialmente.

4.1.1.1 Critérios de elegibilidade

Critério de inclusão geral no estudo:

Crianças com idade entre 1 e 12 anos.

Critérios de exclusão geral no estudo:

Crianças com outras infecções ou doenças sistêmicas concomitantes, que sabidamente interferem com a capacidade imunológica do indivíduo (diagnóstico conhecido de infecção por HIV ou outras imunodeficiências ou uso de imunossupressores).

Critérios de inclusão específicos para o grupo NI:

Crianças co-habitantes dos casos assintomáticos (grupo AS), sem história prévia de LV, não apresentando sinais e sintomas clínicos de LV, com resultado sorológico (ELISA-rk39) negativo.

Critérios de inclusão específicos para o grupo AS:

Crianças sem história prévia de LV, não apresentando sinais e sintomas clínicos de LV, com resultados sorológico e/ou molecular (rK39ELISA e/ou presença de carga parasitária determinada por PCR quantitativo) positivos.

Critérios de exclusão específicos para o grupo AS:

Crianças com resultados sorológico e/ou molecular (rK39ELISA e/ou presença de carga parasitária determinada por PCR quantitativo) positivos e que desenvolvam LV durante o período do estudo.

Critérios de inclusão específicos para o grupo LV:

Crianças com quadro clínico compatível com leishmaniose visceral clássica não grave (febre e hepatomegalia e/ou esplenomegalia) e confirmação laboratorial (Teste Rápido IT Leish[®]).

Critérios de exclusão específicos para o grupo LV:

Crianças com infecção bacteriana concomitante, confirmada laboratorialmente ou tratada empiricamente (por exemplo, pneumonia, infecção do trato urinário, neutropenia febril sem foco). Crianças clinicamente instáveis, que estejam internados em unidade de terapia intensiva (UTI) ou necessitando de ventilação mecânica ou aminas vasoativas.

Foram incluídas no estudo 47 crianças, sendo 24 do sexo masculino e 23 do sexo feminino, com idades entre 1 e 9 anos, distribuídos nos três grupos, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1: Caracterização da população estudada

Grupos	Mediana de idades em anos (Variação)	Masculino	Feminino	Total
Grupo NI	7 (2 a 9)	6	9	15
Grupo AS	5,5 (1 a 9)	11	7	18
Grupo LV	3 (2 a 9)	7	7	14

NI= não infectado; AS= leishmaniose visceral assintomática; LV= leishmaniose visceral.

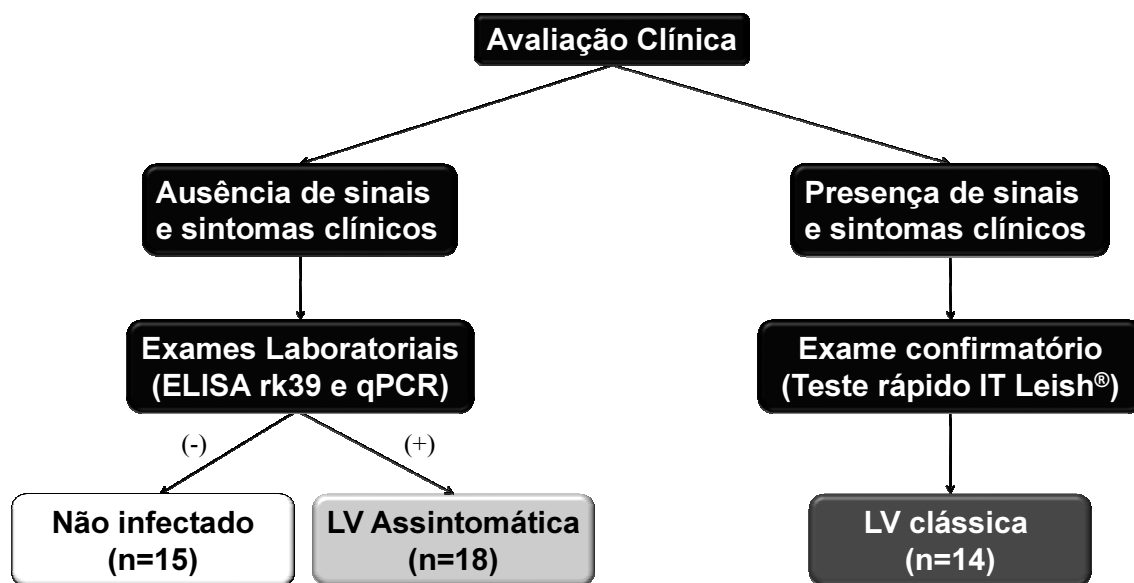


Figura 5: População de estudo. Conforme avaliação clínica e os resultados dos exames laboratoriais, a população foi classificada em três grupos: não infectado (NI), LV Assintomática (AS) e LV clássica (LV).

4.1.1.2 Aspectos éticos

O estudo seguiu a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde que trata das diretrizes e normas de pesquisas envolvendo seres humanos. O projeto proposto, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Assentimento foram

encaminhados para análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto René Rachou e aprovados em 28/07/2014, número do parecer: 782.042. O projeto também foi enviado à instituição co-participante responsável pela seleção e encaminhamento de amostras de pacientes com LV clássica não grave, o HIJPII-FHEMIG, tendo sido aprovado em 05/11/2014, número de parecer:860.893.

4.1.1.3 Amostras biológicas

Das populações de estudo avaliadas, foram coletados 18 mL de sangue periférico de cada criança, sendo 2 mL em microtubos contendo anticoagulante EDTA e 16 mL de sangue em tubos contendo anticoagulante heparina sódica. As amostras de sangue foram encaminhadas ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores (GIPB) do Instituto René Rachou (IRR-FIOCRUZ/Minas), Minas Gerais. O sangue heparinizado foi utilizado nas culturas de sangue total na presença e ausência de formas promastigotas de *L. infantum*, a fim de serem avaliados a frequência e o estado de ativação das células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico, bem como o perfil funcional de células MAIT e de monócitos e neutrófilos. Já as amostras de sangue coletadas na presença do anticoagulante EDTA, foram utilizadas para realização de hemograma e avaliação da frequência e estado de ativação de células MAIT e de outros linfócitos do sangue periférico no contexto *ex vivo*.

4.1.2 Avaliação *ex vivo* da frequência e do estado de ativação de células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico

Para a avaliação *ex vivo* da frequência e da ativação de células MAIT, 150 μ L das amostras de sangue periférico, coletadas na presença do anticoagulante EDTA, foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson – BD, E.U.A.) contendo os anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos específicos para a seleção das células MAIT e nMAIT (anti-CD3 PerCP, anti-TCRV α 7.2 FITC, anti-CD161 BV605 e anti-CD8 AF700) e para a avaliação do estado de ativação destas células (anti-CD69 APC-Cy7). Os anticorpos para marcadores de superfície, bem como as diluições empregadas, encontram-se especificados na tabela 2. A marcação com os anticorpos foi realizada durante 20 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, a lise dos eritrócitos foi realizada pela adição de 2 mL de solução de lise comercial (FACS

Lysing Solution – BD, E.U.A.) sob agitação no vórtex e as suspensões celulares foram incubadas por 10 minutos, nas mesmas condições. Após a incubação, 1 mL de tampão fosfato salino (PBS, 0,015M, pH 7,2-7,4) foi adicionado e os tubos foram submetidos a centrifugação a 600 x g, por 10 minutos a 18°C. Em seguida, os tubos foram vertidos e as células, ressuspensas em 2 mL de PBS. Uma nova centrifugação foi realizada a 600 x g, 18°C por 10 minutos e, após os sobrenadantes serem descartados, as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS. As amostras foram mantidas por 15 minutos a 4°C, e, então, a análise dos parâmetros morfológicos e fenotípicos no contexto *ex vivo* foi realizada com o auxílio do citômetro de fluxo LSRFortessa – BD.

Tabela 2: Painel de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção das populações de linfócitos e avaliação do estado de ativação destas células.

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Fabricante	Nº de catálogo	Clone	Diluição final protocolo <i>ex vivo</i>	Diluição final ensaio de fagocitose
Anti-human CD3	PerCP	BD	552851	SP34-2	1:40	1:50
Anti-human CD8	AF700	BD	561453	RPA-T8	1:100	1:160
Anti-human TCRV α 7.2	FITC	Biologend	351704	3C10	1:100	1:70
Anti-human CD161	BV605	BD	563863	DX12	1:200	1:330
Anti-human CD69	APC-Cy7	BD	557756	FN50	1:100	1:80

4.1.2.1 Aquisição e estratégias de análise para avaliação *ex vivo* da frequência e do estado de ativação de células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico

Para a avaliação da frequência e da ativação de células MAIT e outros linfócitos, o total de 80.000 linfócitos foi adquirido no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD). Os dados obtidos foram analisados por meio do software FlowJo versão 10.2.

A análise dos dados obtidos iniciou-se pela avaliação da qualidade da leitura no citômetro de fluxo (Figura 6A), seguida pela seleção de singletos (Figura 6B) e dos linfócitos totais, de acordo com o tamanho e a granulosidade (Figura 6C). Posteriormente, as células T foram selecionadas (Figura 6D) e foram construídos gráficos de anti-TCRV α 7.2 *versus* anti-CD161 para a seleção das diferentes subpopulações de células T: células MAIT, as células não-MAIT (nMAIT) e células TCRV α 7.2⁺CD161⁻ (denominadas outros linfócitos) (Figura 6E). Posteriormente, a população de células MAIT foi dividida em

células CD8⁺ e células CD8⁻ (Figura 6F) e a população de outros linfócitos, em células T CD4⁺ e células TCD8⁺ (Figura 6G).

Após a seleção das populações, o estado de ativação das células MAIT e nMAIT foi avaliado pelo perfil de expressão do TCRV α 7.2, de CD69 e de CD161, por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência de anti-TCRV α 7.2FITC-A (Figura 6H), de anti-CD69 (Figura 6I) e de anti-CD161 (Figura 6J).

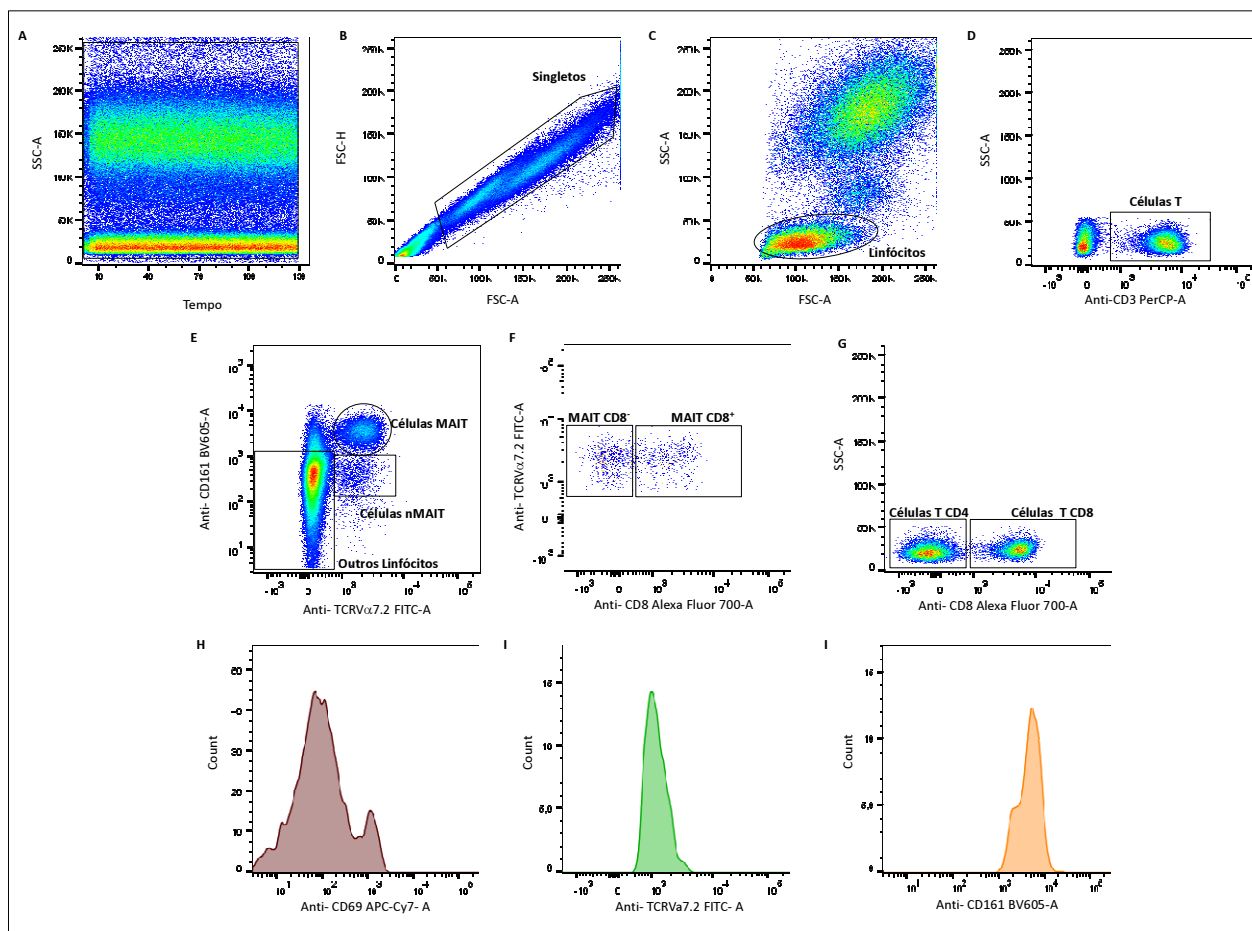


Figura 6: Estratégia de análise para a identificação de células MAIT e outras subpopulações de linfócitos do sangue periférico. (A) Avaliação da qualidade da leitura no citômetro de fluxo, por meio de gráficos de tempo *versus* Side Scatter-A (SSC-A, granulosidade). (B) Seleção de singletos em gráfico de Forward Scatter (FSC- tamanho) - A *versus* FSC-H. (C) Discriminação da população de linfócitos totais com base em sua distribuição em gráficos de FSC-A *versus* SSC-A, como células de baixos tamanho e granulosidade. (D) Seleção de células T, em gráfico de anti-CD3 *versus* SSC-A, como células de baixa granulosidade que expressam o marcador CD3. (E) Gráfico de anti-TCRV α 7.2 *versus* anti-CD161, construído para a seleção das subpopulações de linfócitos: células MAIT (TCRV α 7.2⁺CD161^{high}), células nMAIT (TCRV α 7.2⁺CD161^{low}), e outros linfócitos (TCRV α 7.2⁺CD161^{neg}). (F) A subdivisão da população de células MAIT em células MAIT CD8⁺ e células MAIT CD8⁻ foi feita em gráficos de anti-CD8 *versus* anti TCRV α 7.2. (G) A partir da subpopulação de outros linfócitos, foram construídos gráficos de anti-CD8 *versus* SSC-A para a discriminação da subpopulação de células T CD8⁺ (CD8⁺SSC^{low}) e células T CD4⁺ que foram selecionadas de forma dedutiva como células CD8⁻SSC^{low}. As expressões de TCRV α 7.2, CD69 e CD161 foram avaliadas por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência de cada

marcador nas populações MAIT e nMAIT. Histogramas representativos da fluorescência de anti-TCRV α 7.2 (H), anti-CD69 (I) e anti-CD161 (J) em população de células MAIT.

4.1.3 Obtenção de promastigotas de *Leishmania infantum* e marcação com Alexa Fluor 647

Para a realização dos ensaios funcionais por citometria de fluxo, foi necessária a marcação de formas promastigotas de *Leishmania* com fluorocromo. Para tanto, as formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75), foram obtidas de cultivos de 8 dias (fase estacionária inicial de crescimento), em meio ágar-sangue de Novy e McNeal modificado por Nicolle (NNN) acrescido de Liver Infusion Tryptose (LIT) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), penicilina 100U/mL e estreptomicina 100 μ g/mL, em estufa B.O.D. a temperatura de 26°C. Após o período de cultivo, os parasitos foram transferidos para tubos cônicos de polipropileno de 50 mL (Falcon, Becton Dickinson – BD, E.U.A), e a suspensão foi submetida à centrifugação diferencial a 10 x g, por 10 minutos, a 18°C, para a remoção de grumos de parasitos e eritrócitos. Após 20 minutos de repouso em estufa B.O.D. a 26°C, os parasitos foram recuperados no sobrenadante, transferidos para outro tubo cônico de polipropileno de 50 mL e o sedimento foi desprezado. À suspensão de parasitos foram adicionados 20 mL de PBS suplementado com 10% de SFB e, após homogeneização com movimentos circulares, a suspensão foi centrifugada a 357 x g, por 10 minutos, a 18°C. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento ressuspensionado em 1 mL de PBS 10% SFB e os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e ajustados para 1x10⁸ parasitos/mL.

Para a marcação com o fluorocromo, volumes equivalentes da suspensão de parasitos e de solução de Alexa Fluor 647 a 3,2 μ g/mL, em PBS, foram incubados durante 30 minutos a 37°C. Em seguida, 1 mL de PBS foi adicionado e a suspensão, centrifugada a 357 x g por 10 minutos, a 18°C. Finalmente, o sobrenadante foi desprezado e o sedimento de parasitos, ressuspensionado em volume adequado para obtenção da concentração final de 1x10⁸ parasitos/mL. Uma alíquota dos parasitos marcados foi fixada para avaliação em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD, San Jose, CA, E.U.A.) das características morfométricas e da intensidade de fluorescência acima de 10² apresentada pela maioria dos parasitos marcados (Figura 7) com o intuito de avaliar a qualidade da suspensão de parasitos usados.

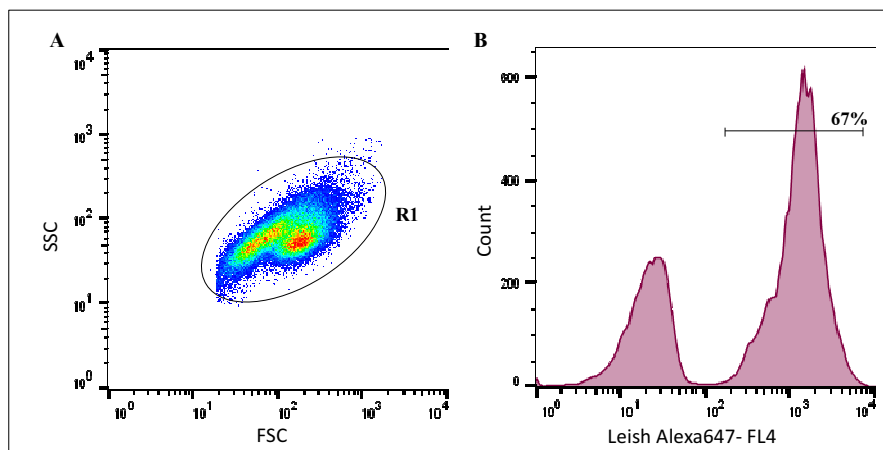


Figura 7: Estratégia para avaliar a marcação de promastigotas de *Leishmania infantum* com fluorocromo Alexa Flúor 647. (A) Inicialmente as promastigotas de *L. infantum* foram selecionadas em gráficos de SSC versus FSC, na região de altos tamanho e granulosidade, como representado pelo gate R1. (B) Histograma representativo da Intensidade de Fluorescência de Alexa647 (LeishAlexa647-FL4) apresentada por formas promastigotas de *L. infantum*.

4.1.4 Ensaio *in vitro* para avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de produção de citocinas intracelulares por células MAIT

Inicialmente, hemogramas foram realizados com as amostras coletadas em tubos contendo o anticoagulante EDTA e, a partir da contagem global de leucócitos, foram realizados os cálculos para os ajustes necessários à obtenção de preparações celulares com 1×10^7 leucócitos/mL. Em seguida, o sangue coletado em tubos contendo heparina sódica foi transferido para um tubo cônico de polipropileno de 50 mL e centrifugado a $660 \times g$, por 10 minutos a temperatura ambiente. Após a centrifugação, o plasma foi retirado, quantidade equivalente de meio RPMI 1640 (GIBCO – Grand Island, NY, E.U.A.) foi adicionada à suspensão celular e a mesma foi homogeneizada e centrifugada a $660 \times g$, durante 10 minutos, a temperatura ambiente. Este procedimento foi repetido e a concentração celular foi ajustada para 1×10^7 leucócitos/mL.

Após o ajuste, a suspensão celular foi transferida para tubos de polipropileno de 14 ml (Falcon, Becton Dickinson – BD, E.U.A.) e incubados por uma hora sob agitação constante em estufa a 37°C e 5% de CO_2 , na ausência (Li) e na presença (Li+ α -MR1) de anticorpo de bloqueio anti-MR1(clone: 26.5, Biolegend, E.U.A.) na concentração final de $10 \mu\text{g/ml}$. Após incubação, foram adicionadas às culturas, formas promastigotas de *L. infantum* (MHOM/BR/74/PP75) vivas marcadas com o corante Alexa Flúor 647 na proporção de 2:1 células/parasito e as culturas foram incubadas nas mesmas condições mencionadas, por 30 minutos. Também, foram realizadas culturas controle (Ctrl) na

ausência do anticorpo de bloqueio e de parasitos. Como controle de funcionalidade (controle positivo) para o estudo de ativação das células e investigação de citocinas intracelulares, foram realizadas culturas na presença de estímulo inespecífico por PMA (Forbol 12-miristato 13-acetato, Sigma Aldrich, E.U.A.) e ionomicina (Sigma Aldrich, E.U.A.) (os dados não serão apresentados). Posteriormente, Brefeldina – BFA (Sigma-Aldrich, E.U.A.) foi adicionada a todos os tubos, na concentração final de 10µg/ml e as culturas foram incubadas por 4 horas nas mesmas condições. Finalmente, a concentração final de 2mM de EDTA foi adicionada e as culturas foram incubadas por 15 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após a incubação, os tubos foram centrifugados a 660 x g, por 10 minutos, a temperatura ambiente, para a retirada do sobrenadante. As suspensões celulares foram homogeneizadas e 300 µL das culturas foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson – BD, San Jose, CA, E.U.A.) contendo anticorpos para avaliação das subpopulações de linfócitos. Para a marcação de moléculas de superfície foram empregados os anticorpos anti-CD3PercP, anti-CD161BV605 e anti-CD8AF700 e, para avaliar o estado de ativação das células, anti-CD69APC-Cy7. Os anticorpos para marcadores de superfície, bem como as diluições empregadas encontram-se especificados na tabela 2. Após a incubação das culturas por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foi realizada a lise dos eritrócitos pela adição de 3 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD, San Jose, CA, E.U.A.) sob agitação no vórtex e os tubos foram incubados por mais 10 minutos nas mesmas condições. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 600 x g, a 18°C, por 7 minutos. Então, os tubos foram vertidos para descarte do sobrenadante, o sedimento celular ressuscitado por agitação no vórtex e 500 µL de PBS-W (solução de PBS acrescida de 0,5% de albumina bovina sérica e 0,1% de azida sódica) foram adicionados aos tubos. Posteriormente foi feita a permeabilização das células pela adição de 3 mL de PBS-P (solução de PBS acrescida de 0,5% de albumina bovina sérica, 0,1% de azida sódica e 0,5% de saponina) e os tubos foram incubados durante 10 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, seguido de centrifugação a 600 x g, a 18°C, por 7 minutos. Após os tubos serem vertidos para descarte do sobrenadante, nova lavagem foi realizada com a adição de 3 mL de PBS-W. As células foram ressuscitadas em 200 µL de PBS-W e o anticorpo monoclonal anti-TCRVα7.2FITC (tabela 2) foi adicionado aos tubos. As suspensões celulares foram transferidas para placas de 96 poços de fundo em U contendo anticorpos monoclonais anti-citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-10, IL-17A acoplados

ao fluorocromo ficoeritrina (PE), previamente diluídos em PBS, conforme especificado na tabela 3. Após incubação por 30 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz, adicionou-se 100 µL de PBS-P em cada poço e a placa foi submetida a centrifugação a 600 x g, 18°C por 10 minutos. Em seguida, a placa foi vertida e a cada poço foram adicionados 200 µL de PBS-W. Após centrifugação a 600 x g, a temperatura ambiente, por 10 minutos, a placa foi vertida e as células de cada poço ressuspensas em 200 µL de PBS. Após um período de 15 minutos a 4°C, realizou-se a análise dos parâmetros morfométricos, fenotípicos e funcionais das células MAIT com o auxílio do citômetro de fluxo LSRFortessa (BD, San Jose, CA, E.U.A.).

Tabela 3: Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares.

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Fabricante	Nº de catálogo	Clone	Diluição final
Anti-human IFN- γ	PE	BD	559326	4S.B3	1:50
Anti-human TNF- α	PE	BD	559321	MAB11	1:50
Anti-human IL-10	PE	BD	559337	JES3-9D7	1:50
Anti-human IL-17A	PE	BD	560436	SCPL1362	1:50

4.1.4.1 Aquisição e estratégias de análise do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de produção de citocinas intracelulares por células MAIT e outros linfócitos do sangue periférico

Para a avaliação do perfil de expressão de marcadores de superfície celular e de produção de citocinas intracelulares por células MAIT e outros linfócitos, o total de 80.000 linfócitos foram adquiridos no citômetro de fluxo LSRFortessa (BD). Os dados obtidos foram analisados por meio do software FlowJo 10.2 (Treestar, San Diego, CA, E.U.A.).

Inicialmente, a seleção das células MAIT, células T CD4⁺ e CD8⁺, bem como a avaliação do estado de ativação destas células, foram realizadas conforme descrito no item 3.2.1 e apresentado na figura 6.

A avaliação da expressão das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-10 intracelulares baseou-se no percentual de células citocina-positivas (Figura 8).

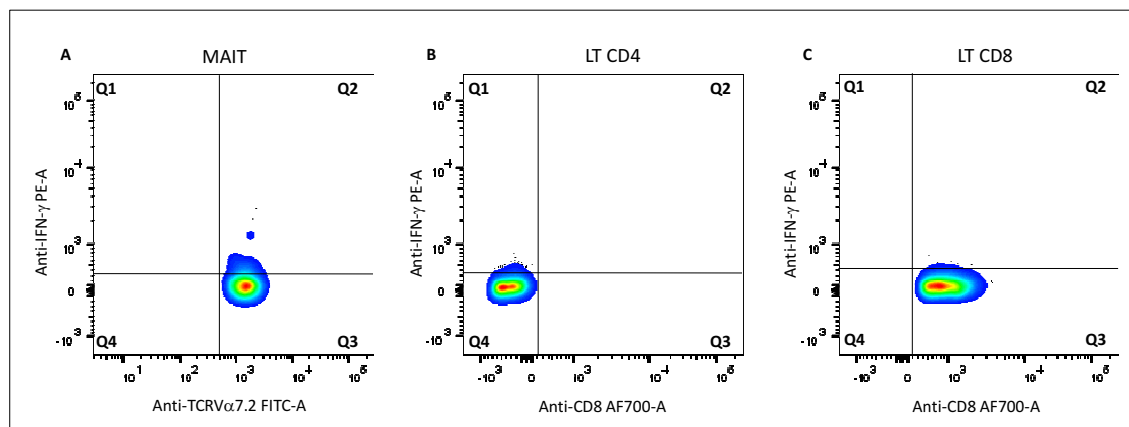


Figura 8: Estratégia de análise do percentual de células citocina⁺. A avaliação da frequência de células citocina⁺ foi feita para todas as citocinas avaliadas, dentro de cada subpopulação de linfócitos avaliada. (A) Para as células MAIT, células citocina⁺ foram selecionadas no quadrante Q2 de gráficos de anti-TCRVα7.2FITC-A *versus* anti-citocina PE-A. (B, C) No caso de células T CD4⁺ e CD8⁺, as células citocina⁺ foram selecionadas em gráficos de anti-CD8 *versus* anti-citocina (PE-A), nos quadrantes Q1 e Q2 respectivamente.

4.1.5 Ensaio de fagocitose e avaliação do perfil de ativação e produção de óxido nítrico por monócitos do sangue periférico

Para avaliação dos níveis de óxido nítrico (NO) intracelular foi empregada estratégia experimental baseada na utilização do reagente diacetato de 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2DA), o qual possui capacidade de penetrar no citoplasma celular, onde é convertido em 4,5-diaminofluoresceína (DAF-2). Esse composto, na presença de NO, sofre processo de oxidação, levando à formação do triazolofluoresceína (DAF-2T) que emite fluorescência na cor verde, cuja intensidade é proporcional à concentração intracelular de NO e pode ser quantificada no citômetro de fluxo.

Nesse estudo, a metodologia empregada foi a descrita inicialmente por Havenga e colaboradores (2001) e Strijdom e colaboradores (2004) e posteriormente adaptada e otimizada por nosso grupo (Schachnik *et al.*, 2009) com algumas modificações, conforme segue abaixo.

Após o ajuste das amostras coletadas em heparina sódica para 1×10^7 leucócitos/mL, conforme descrito no item 4.1.4 deste trabalho, 100 μ L da suspensão celular foram distribuídos em tubos de polipropileno de 5 mL (Falcon® – Becton Dickinson) e incubados sob agitação constante, em estufa a 37°C e 5% de CO₂, durante uma hora na ausência (Li) e na presença (Li+ α -MR1) de anticorpo de bloqueio anti-MR1 na concentração final de 10 μ g/mL (clone: 26.5).

Após a incubação, foram adicionadas às culturas formas promastigotas de *L. infantum* vivas marcadas com Alexa Flúor 647 na proporção 2:1 de célula/parasitos e as culturas foram incubadas por 30 minutos, nas mesmas condições mencionadas. Finalmente, foi adicionado às culturas o DAF-2-DA (Merck Millipore, Alemanha) à concentração final de 2 μ M e a incubação seguiu por mais 3 horas. Cabe ressaltar que foram realizadas culturas controles (Ctrl) na ausência de anticorpo de bloqueio e de formas promastigotas de *L. infantum*, ou seja, apenas na presença da sonda DAF-2DA (avaliação da produção basal de NO); culturas realizadas na presença de LPS (Lipopolissacarídeo de *Escherichia coli*, Sigma-Aldrich, E.U.A.) na concentração final de 1 μ g/mL, como controle de funcionalidade (controle positivo); e culturas na presença de cloridrato de aminoguanidina-AG (Sigma-Aldrich, E.U.A.), a qual bloqueia a ativação de iNOS, como controle de especificidade da produção de NO associado à iNOS. Os dados referentes às culturas na presença de LPS e AG não serão apresentados, foram realizadas apenas para controle interno.

Após a incubação, os tubos foram imediatamente transferidos para o gelo e a suspensão celular foi transferida para tubos de poliestireno de 5 mL (Falcon, Becton Dickinson – BD, San Jose, CA, E.U.A.) contendo os anticorpos monoclonais anti-CD14V450, anti CD16AF700 e anti-HLA-DRPE, que encontram-se especificados na tabela 4. Após homogeneização, as culturas foram incubadas por 20 minutos, a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, foi realizada a lise dos eritrócitos pela adição de 3 mL de solução de lise comercial (FACS Lysing Solution – BD, San Jose, CA, E.U.A.), sob agitação no vórtex, e os tubos foram incubados por 10 minutos nas mesmas condições. Posteriormente, 1 mL de PBS foi adicionado aos tubos e estes foram centrifugados a 600 x g, a 18°C, por 7 minutos. Após a centrifugação, verteu-se os tubos, o sedimento celular foi ressuspenso por agitação no vórtex e 3 mL de PBS foram adicionados aos tubos, seguindo-se nova centrifugação a 600 x g, 18°C, durante 7 minutos. Finalmente, os tubos foram vertidos e os sedimentos celulares, ressuspendidos em 200 μ L de PBS. Após 15 minutos a 4°C, realizou-se a análise dos parâmetros morfométricos, fenotípicos e funcionais com o auxílio do citômetro de fluxo LSRFortessa (BD, San Jose, CA, E.U.A.).

Tabela 4: Pannel de anticorpos monoclonais utilizados para a seleção da população de monócitos e avaliação do estado de ativação desta população.

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Fabricante	Nº de catálogo	Clone	Diluição de uso
Anti-human CD14	V450	BD	560349	MφP9	1:40
Anti-human CD16	AF700	BD	557920	3G8	1:200
Anti-human HLA-DR	PE	BD	555812	G46-6	1:80

4.1.5.1 Aquisição e estratégia de análise da capacidade fagocítica, produção de óxido nítrico e perfil de ativação de monócitos do sangue periférico

Para a avaliação da capacidade fagocítica, da produção de NO e do perfil de ativação, 5.000 monócitos foram adquiridos no citômetro de fluxo LSRFortessa. Os dados obtidos foram analisados por meio do software FlowJo versão 10.2.

Para a identificação dos monócitos, inicialmente foi avaliada a qualidade da leitura no citômetro de fluxo (Figura 9A) e os singletos foram selecionados (Figura 9B). Posteriormente, foram selecionadas as populações celulares caracterizadas por granulosidade intermediária e alta expressão da molécula HLA-DR (HLA-DR⁺) e granulosidade alta e pouca expressão de HLA-DR (HLA-DR⁻SSC^{high}) (Figura 9C). Finalmente, a partir da população HLA-DR⁺, a população de monócitos foi selecionada, caracterizada como CD14⁺HLA-DR^{high} (Figura 9D). Já a população de neutrófilos foi selecionada a partir da população HLA-DR⁻SSC^{high}, como células CD16⁺SSC^{high} (Figura 9G). O estado de ativação dos monócitos foi avaliado pelo perfil de expressão de HLA-DR e CD14 na superfície destas células, caracterizado pela média geométrica da intensidade de fluorescência de HLA-DR e CD14, respectivamente (Figuras 9E, F). Já a ativação de neutrófilos foi caracterizada pela média geométrica da intensidade de fluorescência de HLA-DR (Figura 9H).

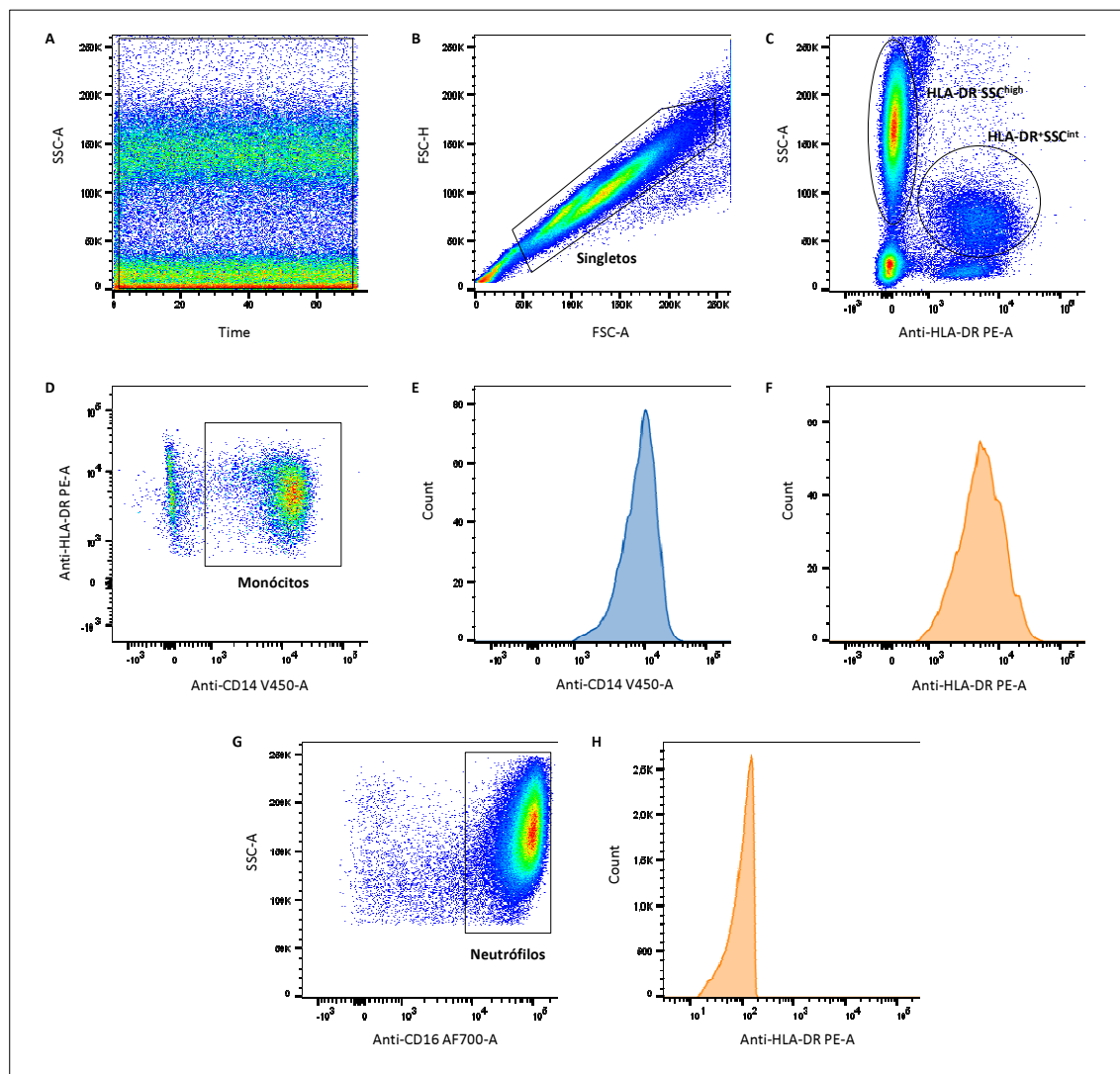


Figura 9: Estratégia de análise para a seleção e avaliação do perfil de ativação de monócitos e neutrófilos do sangue periférico. (A) Gráfico de Tempo versus SSC-A (*Side Scatter-A*, granulidade) para avaliação da qualidade da leitura no citômetro. (B) Seleção de singletos em gráfico de *Forward Scatter* (FSC-tamanho)-A versus FSC-H. (C) Posteriormente, foram construídos gráficos de anti-HLA-DR versus SSC-A, onde foram selecionadas as células com granulidade intermediária, que expressam HLA-DR (HLA-DR⁺SSC^{int}) e células de alta granulidade com pouca expressão de HLA-DR (HLA-DR⁺SSC^{high}). (D) Dentro da população HLA-DR⁺SSC^{int}, a população de monócitos foi selecionada em gráficos de anti-CD14 versus anti-HLA-DR, de acordo com suas características de alta expressão de HLA-DR, concomitantemente a expressão da molécula CD14. (E, F) Histogramas das fluorescências de anti-CD14 e anti-HLA-DR em monócitos. (G) Seleção de neutrófilos como células CD16⁺ dentro da população HLA-DR⁺SSC^{high}, em gráficos de anti-CD16 versus SSC-A. (H) Histograma da fluorescência de anti-HLA-DR em neutrófilos. Os níveis de expressão de CD14 e de HLA-DR foram avaliadas pela média geométrica da intensidade média de fluorescência de CD14 e HLA-DR, respectivamente.

Dentro das populações de monócitos e de neutrófilos, a capacidade fagocítica foi analisada pela frequência de células *L. infantum* positivas (Figura 10A). O perfil de produção de óxido nítrico foi avaliado pela média geométrica da intensidade de

fluorescência do DAF-2T expressa pelas populações de monócitos e neutrófilos (Figura 10B).

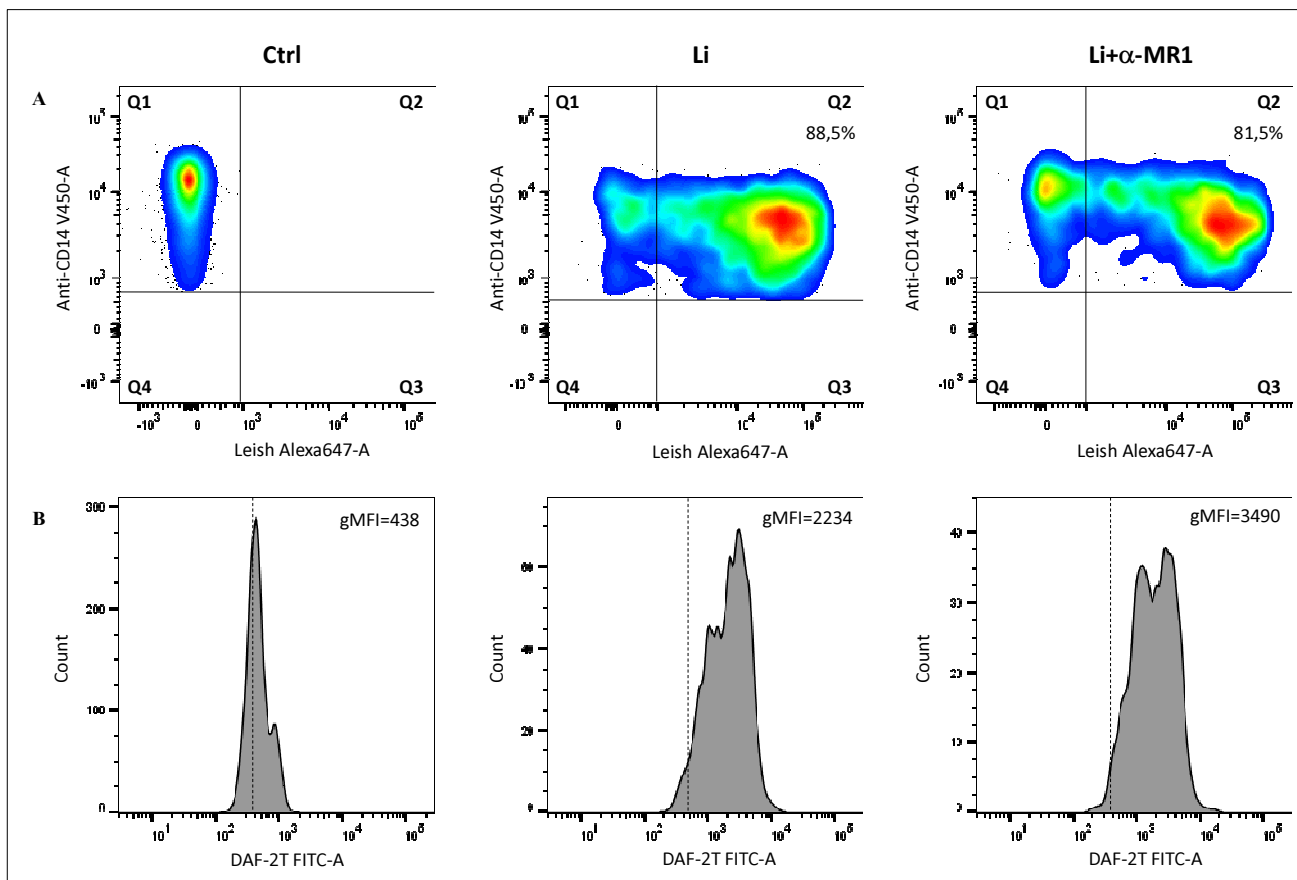


Figura 10: Estratégia de análise da capacidade fagocítica e produção de óxido nítrico por monócitos e neutrófilos. (A) Gráfico representativo da estratégia de análise da capacidade fagocítica por meio da caracterização do percentual de células *Leishmania*⁺, nas culturas Li e Li+α-MR1, em gráficos de Leish^{Alexa647} versus anti-CD14, onde as células que fagocitaram as formas promastigotas de *L. infantum* fluorescentes foram selecionadas no quadrante Q2. (B) Histogramas representativos da média geométrica da intensidade média de fluorescência de DAF-2T, expressa por monócitos provenientes das culturas Ctrl, Li e Li+α-MR1.

4.2 Ativação de células MAIT do sangue periférico por diferentes linhagens de células THP1 infectadas com *Leishmania*

O ensaio consistiu na utilização das linhagens celulares monocíticas THP1, THP1.MR1 (células THP1 com superexpressão de MR1) e THP1.MR1.K0 (células THP1 nocaute para MR1) infectadas por formas promastigotas de *Leishmania*, para a ativação de células MAIT presentes entre células mononucleares do sangue periférico.

4.2.1 Diferenciação e infecção das células THP1, THP1.MR1 e THP1.MR1.K0

Para a realização do ensaio, as linhagens celulares THP1, THP1.MR1 e THP1.MR1.K0, mantidas em cultura a 37°C, 5% de CO₂ em meio RPMI suplementado (meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibiótico/antimicótico), foram diferenciadas. Em placas de 96 poços, um total de 50.000 células THP1, THP1.MR1 ou THP1.MR1.K0 foram adicionadas a cada poço e a diferenciação das células foi induzida pelo seu cultivo a 37°C, 5% de CO₂ durante 48 horas em meio RPMI suplementado acrescido de PMA na concentração final de 50 ng/mL. Após este período, as células foram lavadas 3 vezes com RPMI suplementado e formas promastigotas de *Leishmania mexicana* no início da fase estacionária de crescimento foram adicionadas ou não aos poços na proporção de 0,1:1, 1:1 ou 10:1 parasitos por célula. Após 4 horas de incubação a 35°C e 5% de CO₂, as células foram lavadas 3 vezes com RPMI suplementado e foram incubadas *overnight* nas mesmas condições citadas anteriormente. Ao final do período de incubação, as células foram lavadas 3 vezes em RPMI suplementado e 100 µL do meio de cultura foram adicionados aos poços.

4.2.2 Obtenção e preparação das células mononucleares do sangue periférico

As células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de indivíduos saudáveis foram obtidas para os ensaios de co-cultura por meio do “Australian Red Cross Blood Service” (parecer do comitê de ética n° 1239046.3, The University of Melbourne) e purificadas utilizando-se o método convencional de centrifugação com gradiente de densidade Ficoll-Paque (Sigma-Aldrich, Alemanha). As PBMCs foram lavadas duas vezes por centrifugação a 500 x g por 5 minutos a 4°C em meio de cultura RPMI suplementado, congeladas em solução estéril de soro fetal bovino acrescido de 10% de DMSO e mantidas em nitrogênio líquido até o momento do uso. No dia anterior ao ensaio de ativação, as PBMCs foram descongeladas, lavadas uma vez em RPMI suplementado e mantidas em meio de cultura a 37°C e 5% de CO₂ por cerca de 20 horas, até o momento do ensaio de ativação.

4.2.3 Ensaio de ativação de células MAIT, fenotipagem e marcação intracelular de TNF-α

O ensaio de ativação foi iniciado pela preparação das PBMCs, que foram novamente lavadas e então adicionadas a cada poço da placa de 96 poços contendo as células THP1 das três diferentes linhagens, já diferenciadas e infectadas. A cada poço foram adicionadas

500.000 células viáveis e o volume final foi ajustado para 200 µL utilizando-se meio de cultura RPMI suplementado. Após a incubação das células a 37°C e 5% de CO₂ durante uma hora, o reagente “BD GolgiPlug™ protein transport inhibitor” (BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit with BD GolgiPlug™, catálogo: 555028, concentração final 10µg/mL) foi adicionado às culturas, que foram incubadas durante mais 5 horas nas mesmas condições. Após a incubação, as culturas foram ressuspensas; as células não aderidas à placa foram transferidas para uma nova placa de 96 poços de fundo cônico e centrifugadas a 500 x g, durante 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram vertidas e as células ressuspensas em PBS. Após uma nova lavagem, as células foram ressuspensas em 20 µL PBS acrescido do marcador de viabilidade celular Zombie Yellow™ (Biolegend, catálogo: 423104) na diluição final de 1:100 e as amostras foram incubadas por 15 minutos, no gelo e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi realizada a marcação de superfície celular com os anticorpos monoclonais anti-CD3 PE-CF574, anti-TCRVα7.2 APC-Cy7 e anti-CD161 PE-Vio770, que se encontram especificados na tabela 5. Simultaneamente, foi realizada a marcação com o tetrâmero *human-MRI-5-OP-RU* conjugado ao fluorocromo BV421 (SA-BV421) na concentração final de 0,7µg/mL. As células foram incubadas por mais 20 minutos em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Ao final da marcação de superfície celular, as células foram fixadas com paraformaldeído diluído em PBS na concentração final de 1% e as células foram incubadas por mais 20 minutos a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, as células fixadas foram lavadas duas vezes em PBS utilizando-se o mesmo protocolo de centrifugação descrito anteriormente e as células foram ressuspensas em PBS acrescido de 0,3% de saponina e do anticorpo anti-TNF-α APC (descrito na tabela 5) na diluição final de 1:50. As células foram incubadas *overnight* a 4°C e ao abrigo da luz.

No dia seguinte, as células foram lavadas duas vezes em PBS utilizando-se centrifugação a 500 x g, durante 5 minutos, a temperatura ambiente. Finalmente, as amostras foram ressuspensas em 70 µL de PBS e transferidas para tubos de citometria. Para cada amostra, um total de 200.000 células foram adquiridas com o auxílio do citômetro de fluxo LSRFortessa – BD.

Tabela 5: Painel de anticorpos monoclonais específicos utilizados para a seleção das células MAIT nos ensaios envolvendo células THP1.

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Fabricante	Nº de catálogo	Clone	Diluição final protocolo
Anti-human CD3	PE-CF574	BD	562280	UCHT1	1:200
Anti-human TCRV α 7.2	APC-Cy7	Biologend	351714	3C10	1:25
Anti-human CD161	PE-Vio770	Miltenyi Biotec	130-113-597	REA631	1:50
Anti-human TNF- α	APC	eBioscience	2749165	mAb11	1:50

4.2.3.1 Estratégia de análise para avaliação da ativação de células MAIT do sangue periférico após contato com diferentes linhagens de células THP1 infectadas com *Leishmania*

Os dados obtidos foram analisados por meio do software FlowJo versão 10.2. A análise iniciou-se pela avaliação da qualidade da leitura no citômetro de fluxo (Figura 11A) e, em seguida, os singletos foram selecionados (Figura 11B). Os linfócitos totais foram selecionados em gráfico na região de baixos tamanho e granulosidade (Figura 11C). Em seguida, os linfócitos viáveis foram selecionados como células negativas para a marcação com o corante Zombie Yellow™ (Figura 11D). A partir da população de células CD3⁺ (Figura 11E), a população de células MAIT foi selecionada como células TCRV α 7.2⁺MR1-5-OP-RU⁺ (Figura 11F).

A ativação das células MAIT foi, então, avaliada por meio do percentual de células MAIT TNF- α ⁺, conforme demonstrado na figura 11G.

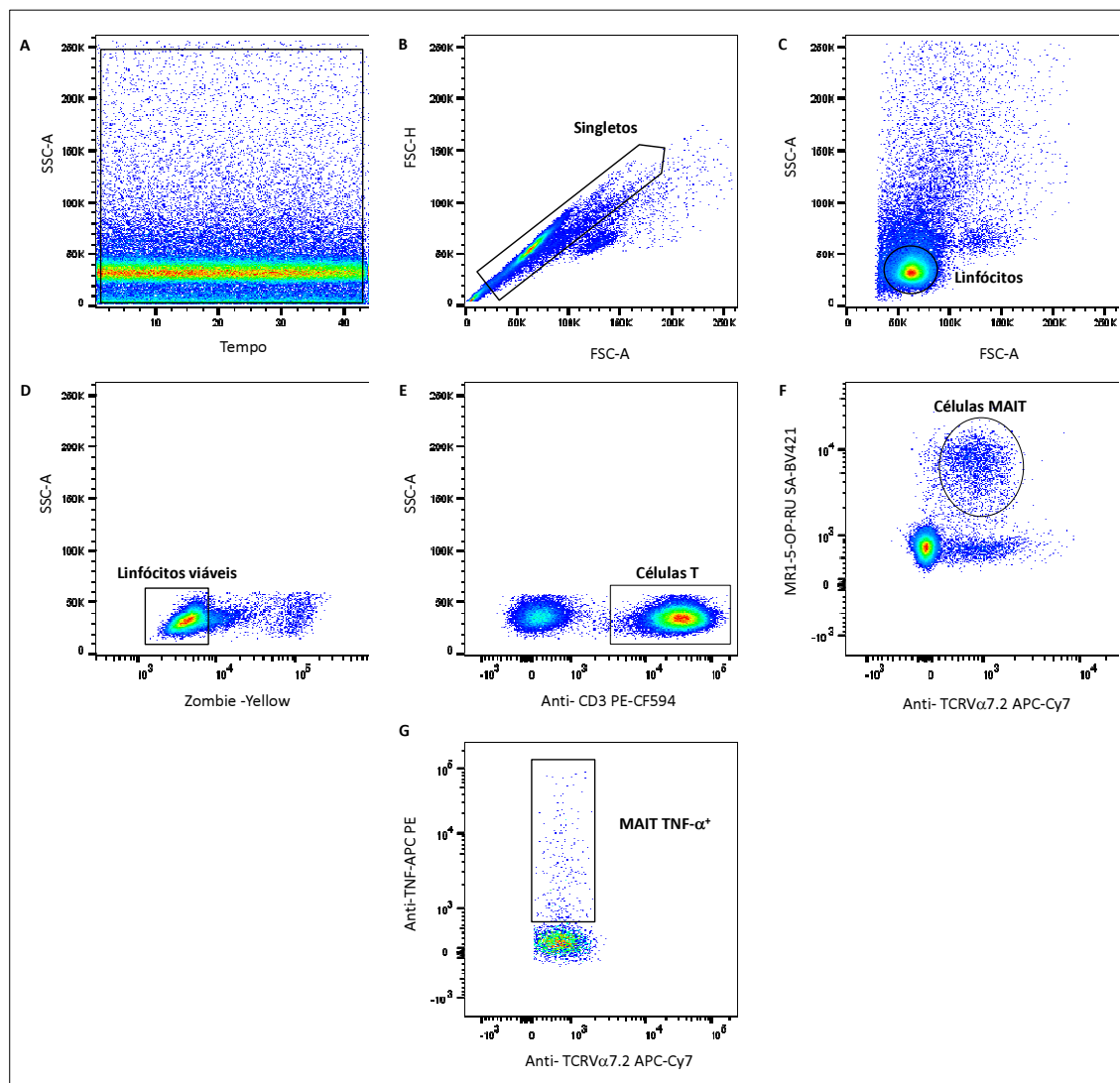


Figura 11: Estratégia de análise para a avaliação da ativação de células MAIT por meio da frequência de MAIT TNF- α^+ . (A) Avaliação da qualidade da leitura em gráficos de tempo versus Side Scatter-A (SSC-A, granulosidade). (B) Seleção de singletos em gráfico de Forward Scatter (FSC- tamanho) - A versus FSC-H. (C) Discriminação da população total de linfócitos com base em sua distribuição em gráficos de FSC-A versus SSC-A, como células de baixos tamanho e granulosidade. (D) Os linfócitos viáveis foram selecionados em gráficos de Zombie Yellow –A versus SSC-A, na região negativa para a marcação com o corante. (E) Seleção de células T, em gráfico de anti-CD3 versus SSC-A, como células de baixa granulosidade que expressam o marcador CD3. (F) Gráfico de anti-TCRV α 7.2 versus tetrâmeros MR1-5-OP-RU, construído para a seleção de células MAIT (TCRV α 7.2⁺MR1-5-OP-RU⁺). (G) Gráfico de anti-TCRV α 7.2 versus anti-TNF α construído para avaliação do percentual de células MAIT TNF- α^+ .

4.3 Determinação do papel das Células T invariantes de mucosas durante a infecção por *Leishmania donovani* in vivo em modelo murino

4.3.1 Animais e infecção

Camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos C57BL/6 MR1^{-/-}, machos com 8 a 12 semanas de idade foram obtidos do biotério do Departamento de Microbiologia e

Imunologia da Universidade de Melbourne e mantidos no biotério do Instituto Bio 21 da Universidade de Melbourne, onde a infecção, a eutanásia e a perfusão dos órgãos foram realizadas. Dessa forma, neste estudo foram avaliados e comparados três grupos de camundongos, compostos por 9 animais cada:

Grupo 1: Grupo controle – Camundongos C57BL/6 selvagens não infectados;

Grupo 2: Camundongos C57BL/6 selvagens infectados com *L. donovani*;

Grupo 3: Camundongos C57BL/6 MR1^{-/-} infectados com *L. donovani*.

Cada um dos animais infectados recebeu, por via intravenosa, $1,5 \times 10^7$ amastigotas de *Leishmania donovani* (cepa LRC-L52), ressuspendidas em 200 μ L de PBS estéril. Cada um dos grupos foi avaliado em três tempos: 3, 4 e 6 semanas após a infecção, com a eutanásia de três animais por grupo em cada tempo, conforme representado na figura 12. A eutanásia dos camundongos foi realizada por asfixia com CO₂ e, após a perfusão, o baço e o fígado de cada animal foram divididos em partes para a execução dos seguintes experimentos: 1) quantificação da carga parasitária nos órgãos por reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR); 2) quantificação das células MAIT e outras células T no baço e no fígado, por meio da técnica de citometria de fluxo e; 3) avaliação histopatológica dos infiltrados inflamatórios no baço e no fígado. Todos os experimentos realizados foram aprovados pelo “University of Melbourne Animal Ethics Committee”, parecer número 1614059.

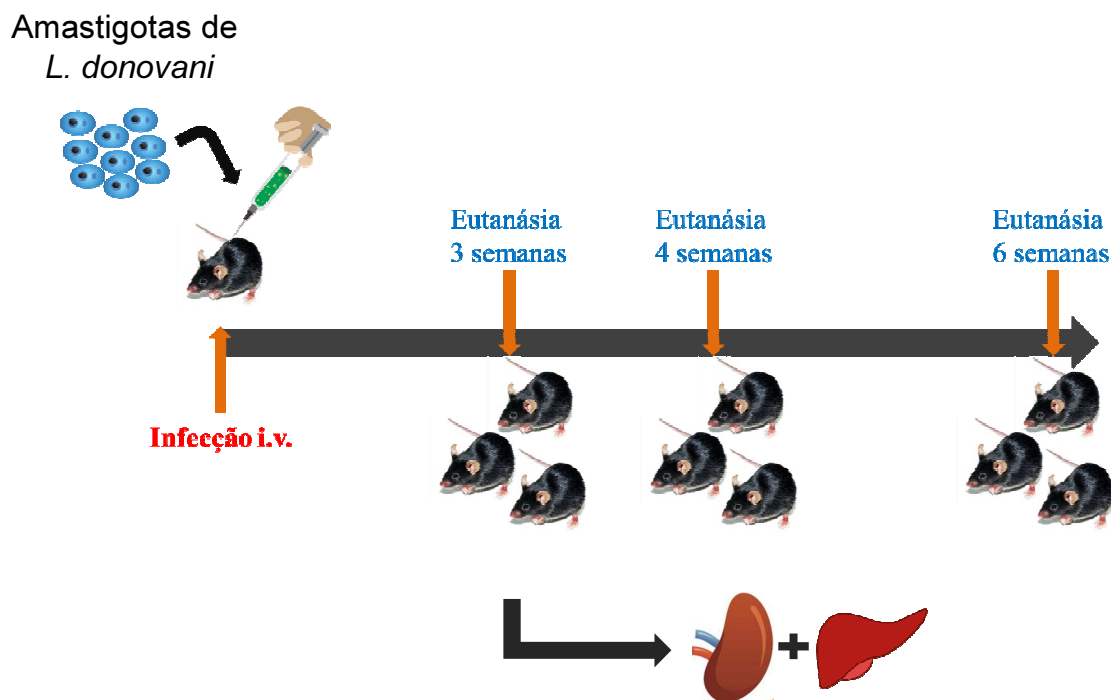


Figura 12: Desenho experimental para avaliação do papel das células MAIT durante a infecção por *Leishmania donovani* *in vivo* em modelo murino.

4.3.2 Quantificação da carga parasitária no fígado e no baço do modelo murino *knock out* para MR1 e nos camundongos C57BL/6 selvagens, após infecção experimental com amastigotas de *Leishmania donovani*

Para a quantificação da carga parasitária nos órgãos, primeiramente foi feita a extração do DNA, utilizando-se o kit QiAmp DNA Mini kit (Qiagen, California), conforme as recomendações do fabricante.

Para a reação de qPCR, foram escolhidos os iniciadores na direção 5'-3' 5'-CCTATTTTACACCAACCCCGAGT-3' e reverso na direção 3'-5' 5'-GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3', descritos por Nicolas e colaboradores (2000) para a detecção de *L. major* em camundongos. Estes iniciadores amplificam um fragmento de 116-bp do DNA do minicírculo do cinetoplasto (kDNA) de *Leishmania*, cujas sequências são conservadas e específicas de *Leishmania spp.* Na espécie *L. donovani*, a presença desta sequência é estimada em 10.000 cópias por parasito (Nicolas et al., 2000, 2002).

O protocolo de qPCR foi realizado conforme descrito por Srivastava e colaboradores (2013), utilizando-se GoTaq® qPCR Master Mix (Promega, USA) e todas as amostras, bem como a curva padrão foram testadas pelo menos em duplicata. Brevemente, a reação foi realizada em volume final de 25 μ L, dos quais: 2,5 μ L do DNA genômico extraído

previamente diluído (diluição das amostras de DNA fígado - 1:20; baço - 1:10; em água livre de nuclease -Promega, USA), 12,5 µL de GoTaq® qPCR Master Mix, 2,5 µL de cada iniciador (diluição final de 100nM), 0,25 µL de corante de referência CRX (Promega, USA) e 4,75 µL de água livre de nuclease. O ciclo térmico utilizado encontra-se descrito na tabela 6.

Tabela 6: Ciclo térmico utilizado para a qPCR.

		Temperatura (°C)	Tempo	No. Ciclos
	Ativação da PCR	95	10 min	1
Ciclo térmico	Desnaturação	95	20seg	45
	Anelamento	60	20seg	
	Extensão	72	16 seg	
	Alongamento final	72	10 min	1
	Curva de Melting	95	20 seg	1
		56	30 seg	
		95	20 seg	
	25	1 min		

Para a construção das curvas padrão, fragmentos do fígado ou do baço de camundongos C57BL/6 selvagens não infectados (*naïve*) foram infectados com 10^6 promastigotas de *L. donovani* (LRC-L52) e a extração do DNA foi realizada paralelamente à extração do DNA das amostras a serem testadas. Para a realização do qPCR, o DNA extraído foi diluído serialmente utilizando-se o fator 10, até a concentração de 10^0 parasitos, ou seja, o limite inferior de detecção da curva foi estabelecido em 1 parasito por amostra. Para a quantificação do parasitismo, os resultados foram considerados somente quando a diferença entre as duplicatas da curva e das amostras foi inferior a 1 Ct. Em cada placa de qPCR foram incluídos um controle positivo, infectado com um número conhecido de parasitos, e dois controles negativos. Um controle negativo sem adição de DNA e um controle negativo com DNA extraído de amostras de fígado ou baço de camundongos do grupo controle não infectado. O software MXPro QPCR software (Stratagene) foi utilizado para o cálculo do número de parasitos em cada amostra testada, comparativamente às curvas padrão (Figura 13), com base nos valores de Ct gerados.

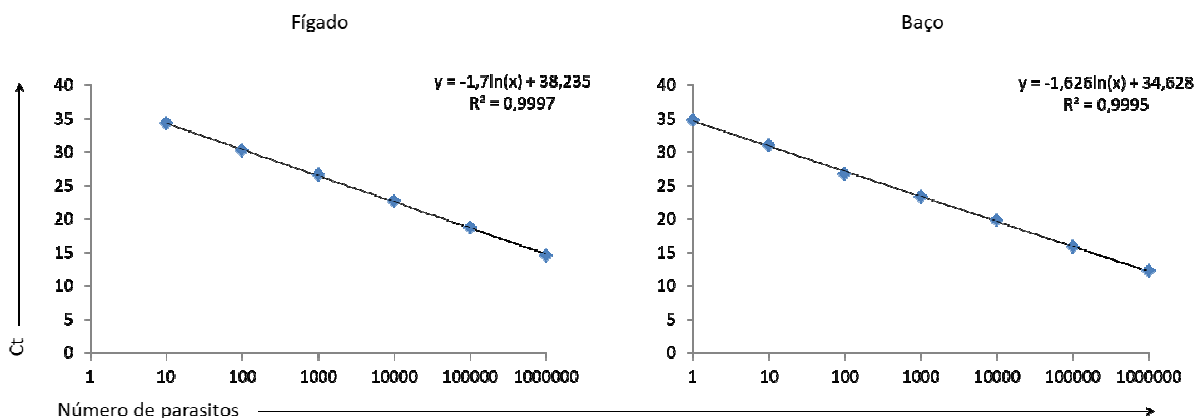


Figura 13: Curvas padrão para a quantificação do parasitismo no fígado e no baço de camundongos.

4.3.3 Quantificação de células MAIT, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ no fígado e no baço de modelo murino *knock out* para MR-1 e nos camundongos C57BL/6 selvagens, após infecção experimental com amastigotas de *Leishmania donovani*

Para a quantificação de células MAIT no fígado e no baço por meio da técnica de citometria de fluxo, inicialmente a fração destes órgãos destinada a este protocolo foi macerada contra filtros de nylon de 70 μ m, para a obtenção de suspensões de células individuais, em solução de PBS acrescido de 2% de soro fetal bovino (FACs W). As suspensões celulares foram centrifugadas a 500 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e os eritrócitos foram lisados com solução hipotônica TAC (Tampão-Tris Cloreto de amônio), durante 5 minutos a 37°C. Após a lise, as suspensões celulares foram lavadas com FACs W, utilizando-se centrifugação a 500 x g por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados.

Para processamento do sedimento celular do fígado, as células foram ressuspensas em solução de Percoll e centrifugadas a 900 x g durante 25 minutos a temperatura ambiente. Os hepatócitos foram, então, descartados e as células lavadas com 10 mL FACs W, por centrifugação a 500 x g, por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado, e as células foram ressuspensas em FACs W e passadas por filtro de nylon de 40 μ m, enquanto as amostras foram transferidas para tubos de poliestireno de 5 mL. As células foram mais uma vez lavadas com FACs W por centrifugação a 500 x g, por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados.

Para o processamento da suspensão celular do baço, após a lavagem, as suspensões celulares foram passadas em filtro de nylon de 40 μ m e transferidas para tubos de

poliestireno de 5 mL. Então, as células foram lavadas com FACs W por centrifugação a 500 x g, por 5 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram descartados.

Posteriormente, foi feita a marcação de superfície celular de ambas as suspensões celulares. Primeiramente foi feito o bloqueio de marcações não específicas durante 15 minutos a temperatura ambiente, utilizando-se tetrâmeros de MR1-6FP (diluição final 1:100) e utilizando-se anticorpo anti-receptor Fc (clone: 2.4G2, BD Pharmingen™ utilizado conforme recomendações do fabricante). Então, foram adicionados o marcador de viabilidade celular 7-AAD (diluição final 1:500) e os anticorpos marcadores de superfície celular obtidos comercialmente anti-CD45.2 FITC, anti-TCR-β APC, anti-CD4 APC-Cy7 e anti-CD8 PE, que se encontram especificados na tabela 7. Ao mesmo tempo foi realizada a marcação com o tetrâmero *mouse*-MR1-5-OP-RU (Corbett, A.J., *et al.*, 2014) conjugado ao fluorocromo BV421 (SA-BV421), durante 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com FACs W a 500 x g, por 5 minutos a 4°C e fixadas com solução de 1% de paraformaldeído em PBS. Finalmente, um número conhecido de beads foi adicionado a cada amostra e as amostras foram adquiridas com o auxílio do citômetro de fluxo LSRFortessa – BD.

Tabela 7: Painel de anticorpos monoclonais específicos para modelo murino utilizados para a seleção das populações de linfócitos.

Anticorpo	Fluorocromo conjugado	Fabricante	Nº de catálogo	Clone	Diluição final protocolo
Anti-mouse CD45.2	FITC	BD	553772	104	1:200
Anti-mouse TCR-β	APC	BD	553174	H57-597	1:200
Anti-mouse CD4	APC-Cy7	BD	552051	GK1.5	1:200
Anti-mouse CD8	PE	BD	553033	53-6.7	1:500
Anti-mouse CD19	PerCP-Cy5.5	BD	551001	1D3	1:200

4.3.3.1 Estratégias de análise para a quantificação de células MAIT, células T CD4⁺ e células T CD8⁺ no fígado e no baço em modelo murino

Os dados obtidos foram analisados por meio do software FlowJo versão 10.2. A análise iniciou-se com a seleção dos linfócitos totais e a seleção das *beads* para a contagem (Figura 14A). Em seguida, foi realizada a seleção dos singletos (Figura 14B) e dos linfócitos viáveis, na região negativa para a marcação com o corante 7-AAD (Figura 14C). As células

T foram de acordo com a expressão de TCR- β . Posteriormente, as células MAIT foram selecionadas como células TCR- β^+ MR1-5-OP-RU $^+$ (Figuras 14E e 14F) e, então, divididas em MAIT CD8 $^+$ e MAIT CD8 $^-$ (Figura 14G). As células T não células MAIT foram divididas em Células T CD4 $^+$ convencionais e células T CD8 $^+$ convencionais, conforme demonstrado na figura 14H.

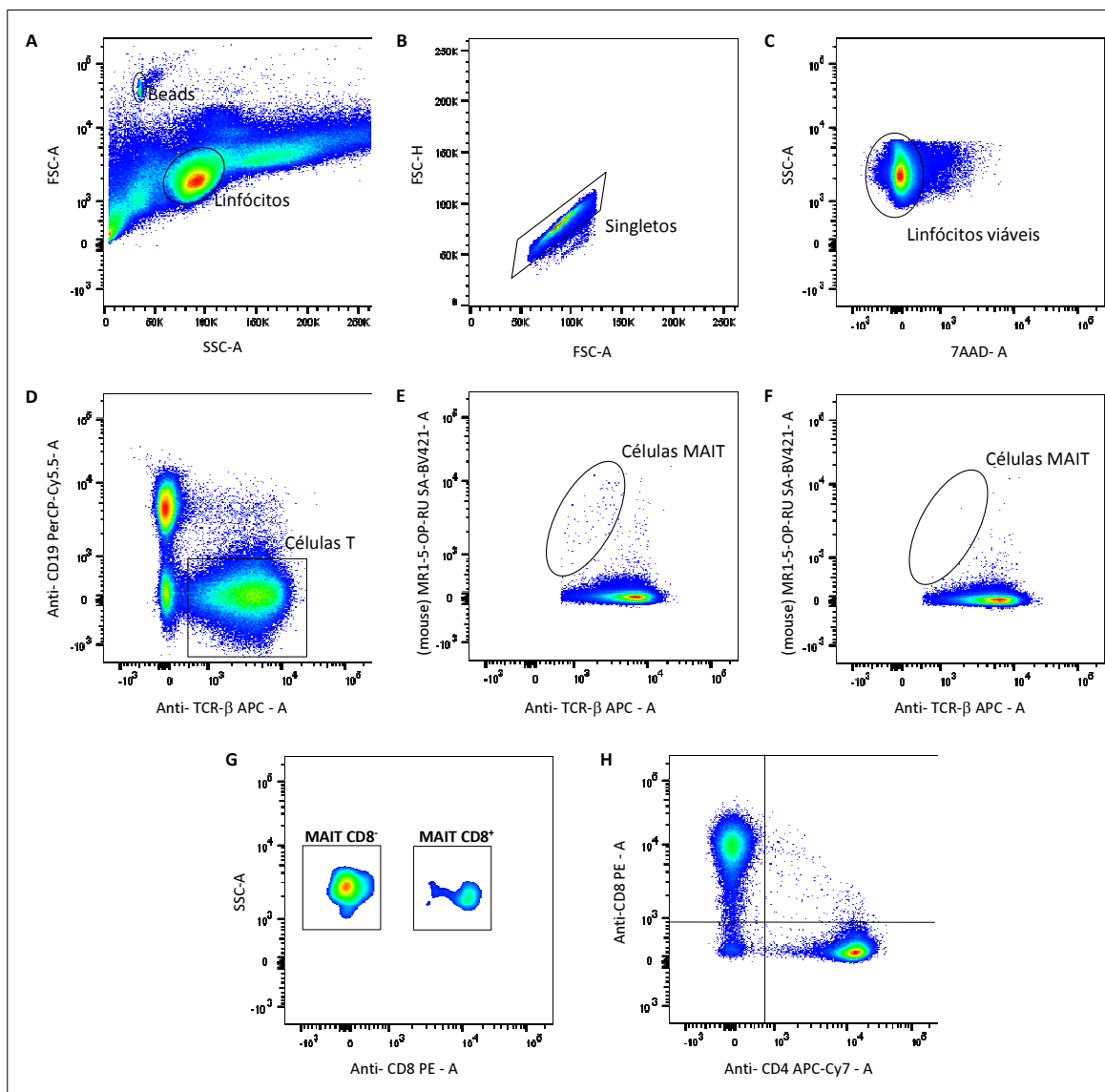


Figura 14: Estratégia de análise para quantificação de células MAIT, células T CD4 $^+$ e células T CD8 $^+$ do fígado e do baço, empregadas nos experimentos em modelo murino. (A) Estratégia de seleção da população de linfócitos totais com base em sua distribuição em gráficos de FSC-A *versus* SSC-A. (B) Seleção de singletos em gráfico de FSC-A *versus* FSC-H. (C) Os linfócitos viáveis foram selecionados em gráficos de 7-AAD -A *versus* SSC-A, na região negativa para a marcação com o corante. (D) Seleção de células T, em gráfico de anti-TCR- β *versus* CD19 como células expressam TCR- β e negativas para CD19. A partir da população de células T, foram construídos gráficos de anti-TCR- β *versus* (mouse) MR1-5-OP-RU, para a seleção de células MAIT, em camundongos C57BL/6 selvagens (E); enquanto que os camundongos MR1 $^{-/-}$ não apresentam níveis significativos de células MAIT (F). (G) Classificação de células MAIT como células MAIT CD8 $^-$ e células MAIT CD8 $^+$, em gráficos de anti-CD8 *versus* SSC-A. (H) Após a exclusão das

células MAIT, as demais células T convencionais foram divididas em células T CD4⁺ e células T CD8⁺, por meio de gráficos de anti-CD4 *versus* anti-CD8.

4.3.4 Avaliações histopatológicas do fígado e do baço em modelo murino MR1^{-/-} e nos camundongos C57BL/6 selvagens, após infecção experimental com amastigotas de *Leishmania donovani*

Após a perfusão, os fragmentos do fígado e do baço destinados às análises histopatológicas foram fixados em solução tamponada de formol a 10%. Após 24 horas, as amostras de tecido foram desidratadas em soluções de concentração decrescente de álcool, diafanizadas em xilol e incluídas em parafina de acordo com o processamento histológico rotineiro. Posteriormente, foram feitos cortes em micrótomo com espessura de 5µm e as lâminas de vidro, montadas foram submetidas a coloração por hematoxilina e eosina (HE) para a avaliação dos infiltrados inflamatórios. As lâminas foram escaneadas na “APN Mouse Histopathology and Digital Slide Service” da University of Melbourne, utilizando-se o equipamento Metasystems Vslide Scanner (MetaSystems headquarters, Heidelberg, Alemanha) e as imagens foram analisadas por meio do software CaseViewer 2.1 (3DHISTECH, Hungria), “às cegas”.

A classificação histopatológica no fígado considerou os parâmetros de inflamação portal, periportal e lobular (0=ausente ou ligeira; 1= moderada e forte). De modo semelhante, no baço foram avaliados a hiperplasia da polpa branca (0=ausente ou ligeira; 1= moderada e forte) e o aumento médio das áreas de linfócitos T e B (µm).

4.4 Análise estatística

4.4.1 Análise de variável contínua

As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do software GraphPad Prism, versão 5.03 (GraphPad Software, E.U.A). Inicialmente, a natureza não paramétrica dos dados gerados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Em seguida, para comparação entre três ou mais grupos, foi aplicado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparações múltiplas Dunn's. Para análise comparativa entre dois grupos independentes, foi empregado o teste não paramétrico Mann-Witney. As análises de correlação foram realizadas empregando-se o teste de Spearman. Diferenças estatisticamente significativas foram

consideradas quando $p < 0,05$. Curvas do tipo Receiver Operating Characteristics (ROC) de dados fenotípicos foram construídas utilizando o software estatístico MedCalc (versão 3.0).

4.4.2 Análise de variável categórica dos resultados do estudo clínico

Para melhor compreensão dos dados gerados, novas ferramentas baseadas na análise qualitativa dos dados, foram empregadas de forma a facilitar a visualização panorâmica e o entendimento dos resultados gerados. Para tal, os dados de variável contínua, que incluem níveis de expressão de biomarcadores e frequências de células, foram transformados em variável categórica, a qual classificou os indivíduos como alto ou baixo produtores para cada biomarcador.

Para a classificação dos indivíduos como alto ou baixo produtores de cada um dos biomarcadores, primeiramente foi estabelecido o ponto de corte, representado pela mediana global do conjunto de dados, ou seja, considerando as três condições de cultura (culturas controle – Ctrl; culturas na presença de *L. infantum* – Li; culturas na presença de *L. infantum* e do anticorpo de bloqueio anti-MR1 – Li+ α MR1), nos três grupos avaliados (NI, AS, LV), para cada um dos biomarcadores. De acordo com isso, indivíduos acima do ponto de corte foram classificados como altos produtores. Com isso, foi possível calcular a frequência de indivíduos alto produtores para cada biomarcador nas três condições de cultura (Ctrl, Li e Li+ α MR1) em cada grupo de estudo (NI, AS e LV). Os *heatmaps* foram construídos, então, a partir da frequência de indivíduos altos, de acordo com a escala de cores que varia do azul (menor frequência), passando por cinza claro (50%) e atingindo cor vermelha (alta frequência)

4.4.3 Análise histopatológica

Os dados foram coletados como proporção e médias. As comparações de dados obtidos como proporção foram calculadas por meio de teste não pareado. Para os dados de média, a comparação foi realizada utilizando-se o teste T de Student. Todas as análises foram realizadas por meio do software Minitab, versão 17 (Minitab Software, State College, PA).

5. RESULTADOS

5.1 Frequência e perfil fenotípico no contexto *ex vivo* de células MAIT e nMAIT do sangue periférico em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave

A avaliação *ex vivo* permitiu a caracterização e comparação dos perfis de células MAIT e nMAIT circulantes em crianças saudáveis e em crianças com LV assintomática e clássica não grave.

As frequências de células MAIT e nMAIT foram avaliadas dentro da população de linfócitos, conforme descrito na figura 6 da seção materiais e métodos. A figura 15 apresenta os dados de frequência de células nMAIT e células MAIT, bem como de células MAIT CD8⁻ e CD8⁺, em crianças saudáveis, não infectadas (NI), com leishmaniose visceral assintomática (AS) e clássica (LV). Os resultados indicam redução significativa de células MAIT e MAIT CD8⁺ circulantes nos pacientes com LV, em comparação ao grupo controle endêmico. Paralelamente, aumento de nMAIT foi observado nos pacientes com LV clássica (Figura 15 A e B). Consequentemente, a inversão dos fenótipos de células nMAIT e MAIT foi observada entre os grupos NI e LV (Figura 15C). Como biomarcador para a distinção entre indivíduos saudáveis (AS e NI) e indivíduos com LV clássica (LV), as análises de curva ROC demonstraram maior co-positividade e acurácia da frequência de células MAIT, em comparação à frequência de células nMAIT (Figura 15D).

Uma vez que a idade é um importante fator relacionado à frequência de células MAIT circulantes, sua correlação com a idade das crianças foi investigada. Com isso, foi possível observar que em crianças com LV clássica há redução no percentual de células MAIT circulantes; no entanto, as correlações entre idade e frequência de células MAIT e nMAIT não foram significativas, sugerindo que este fenômeno está associado ao estado clínico e não à idade das crianças (Figura 15E).

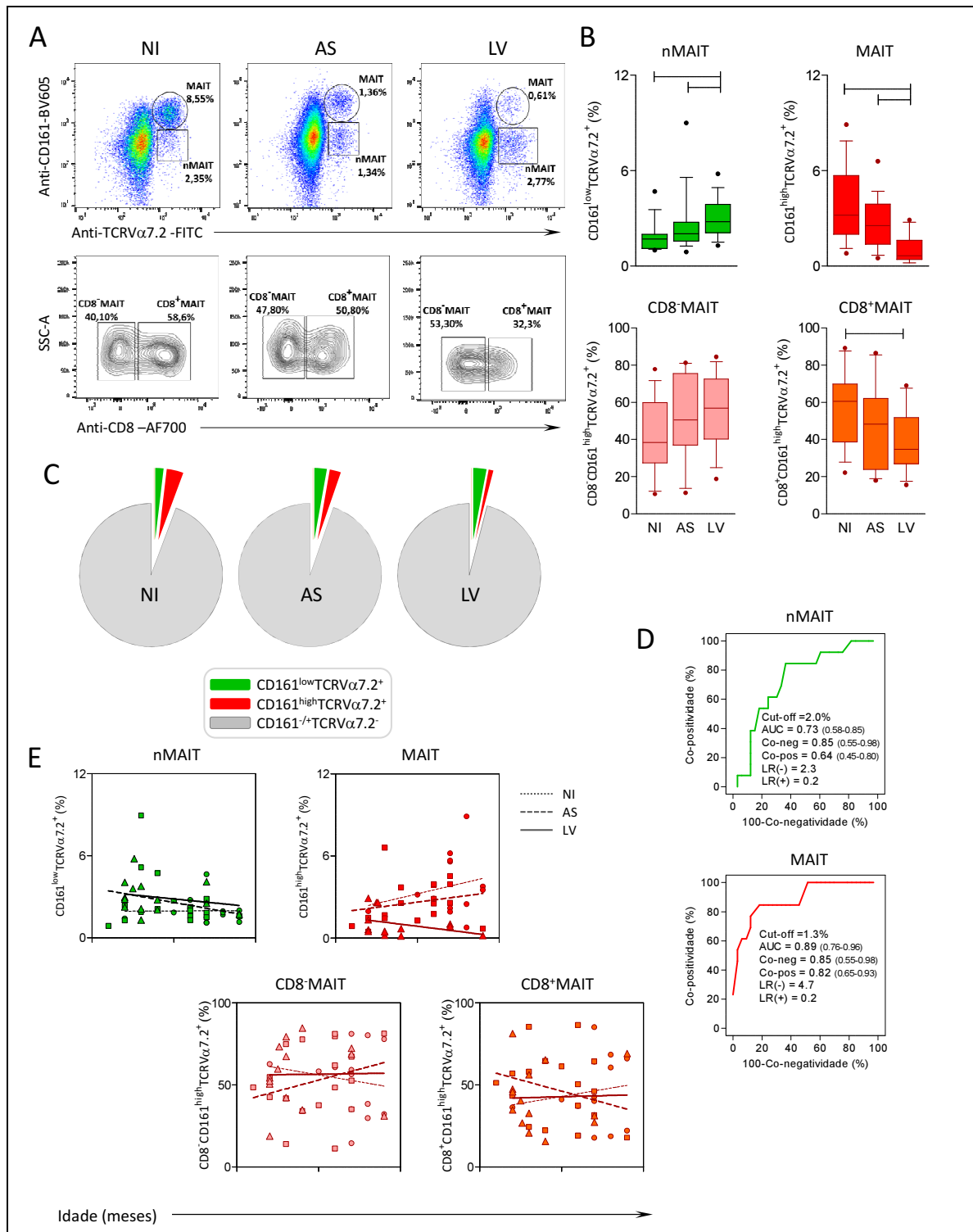


Figura 15: Frequência de células MAIT circulantes em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica. (A) Gráficos de pseudocolor representativos da população de células MAIT e das subpopulações MAIT CD8⁻ e MAIT CD8⁺ em crianças do grupo controle (NI), com LV assintomática (AS) e com LV clássica (LV). (B) As frequências de células nMAIT e MAIT foram avaliadas dentro da população total de células CD3⁺, já as subpopulações MAIT CD8⁻ e MAIT CD8⁺ foram avaliadas dentro da população de células MAIT. Os resultados encontram-se expressos em gráfico do tipo boxplot, que representam a mediana, valores mínimo e máximo e os percentis 25% e 75% nos grupos NI, AS e LV. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e representadas por linhas conectoras. (C) Nos gráficos de setores é possível observar que houve inversão do perfil de frequência de células

nMAIT e MAIT entre os grupos NI e LV. (D) Curvas ROC da frequência de células MAIT e nMAIT demonstrando o potencial destas variáveis como biomarcador da LV. (E) Correlações entre a idade dos indivíduos e as frequências de células nMAIT, MAIT, MAIT CD8⁻ e MAIT CD8⁺. AUC= área sob a curva; Co-neg= co-negatividade; Co-pos= co-positividade; LR (-) = verossimilhança negativa; LR (+) = verossimilhança positiva.

A caracterização *ex vivo* do perfil de ativação das populações celulares nMAIT, MAIT, MAIT CD8⁻ e MAIT CD8⁺ circulantes foi realizada avaliando-se a expressão intracelular do TCRV α 7.2 e das moléculas CD69 e CD161 na superfície das células, por meio da média geométrica da intensidade de fluorescência nos grupos NI, AS e LV (Figura 16A). Os resultados indicam aumento de TCRV α 7.2 intracelular nas células MAIT no grupo LV em comparação aos grupos NI e AS (Figura 16B), o qual foi acompanhado por diminuição da expressão de CD69 e CD161 na superfície destas células (Figuras 16C e D, respectivamente). Análises das subpopulações de células MAIT, CD8⁻ e CD8⁺, indicam comportamento similar, com exceção da expressão de CD161 em células MAIT CD8⁻, que demonstrou aumento da expressão de CD161 no grupo LV, ao contrário das células MAIT CD8⁺ e da população total de células MAIT (Figura 16D).

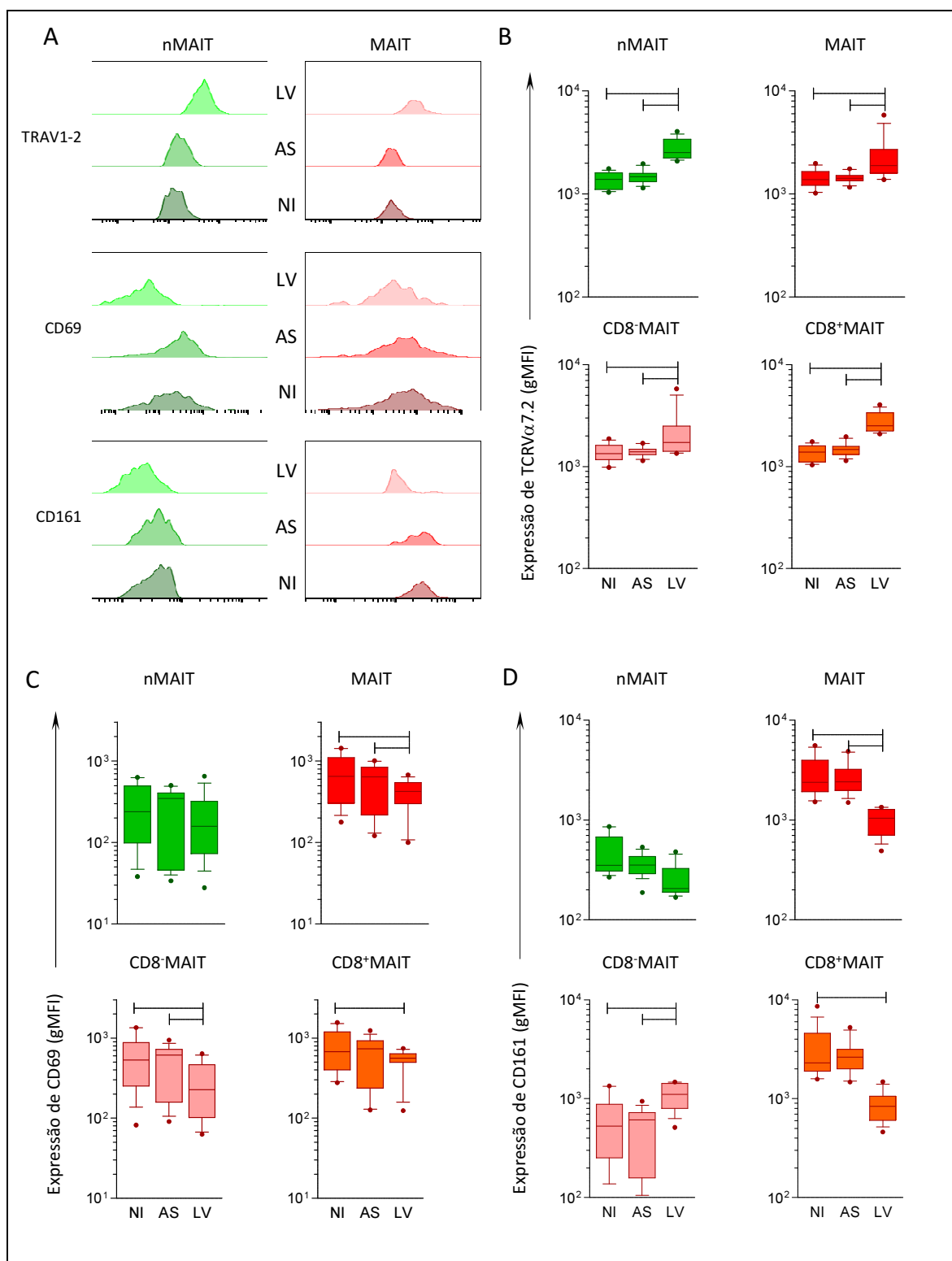


Figura 16: Perfil de ativação de células nMAIT, MAIT, MAIT CD8⁻ e MAIT CD8⁺ em crianças com LV assintomática e clássica. (A) Histogramas de fluorescência representativos da expressão de TCRVα7.2, CD69 e CD161, avaliados por meio da média geométrica da intensidade média de fluorescência (gMFI) nos grupos NI, AS e LV. (B, C, D) Perfis de expressão de TCRVα7.2, CD69 e CD161 em células nMAIT e MAIT representados em gráficos do tipo boxplot, que representam a mediana, valores mínimo e máximo e os percentis 25% e 75% nos grupos NI, AS e LV. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e representadas por linhas conectoras.

5.2 Ativação e perfil funcional de células MAIT do sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave, após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania infantum*, na ausência e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1

A fim de se avaliar o efeito do contato com *L. infantum* e a dependência de MR1 para a ativação das células MAIT, foram realizadas culturas rápidas *in vitro* na presença de formas promastigotas de *L. infantum* e do anticorpo de bloqueio anti-MR1. O perfil funcional das células MAIT foi descrito em duas abordagens, que contemplam: i) o perfil fenotípico de ativação por meio da avaliação da expressão de TCRV α 7.2, CD69 e CD161; ii) a produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-10).

Os resultados demonstraram diminuição significativa na expressão intracelular de TCRV α 7.2 e de CD161 na superfície das células MAIT nos grupos NI e AS, quando o anticorpo de bloqueio foi adicionado às culturas (Figura 17A). Além disso, aumento da expressão de CD69, independente de MR1, foi observado no grupo LV em comparação aos grupos NI e AS, sugerindo o envolvimento de outras vias de ativação de células MAIT no curso da infecção em indivíduos com LV clássica (Figura 17A).

No caso da expressão de citocinas intracelulares, a presença dos parasitos nas culturas ocasionou aumento da expressão de TNF- α e IFN- γ por células MAIT nos três grupos estudados, efeito que sofreu impacto pela adição bloqueio de MR1 (Figura 17B). Por outro lado, a ativação da produção de IL-17A, dependente de MR1, foi observada apenas no grupo AS (Figura 17B). Além disso, a presença de *L. infantum* ocasionou aumento da expressão intracelular de IL-10 nos grupos NI, AS e LV, o qual não sofreu impacto com a adição do anticorpo de bloqueio às culturas (Figura 17B). Desse modo, o grupo AS apresentou perfil Th1/Th17 dependente de MR1, e modulado por IL-10; enquanto que em LV houve predomínio de citocinas pró-inflamatórias após cultura na presença de *L. infantum*.

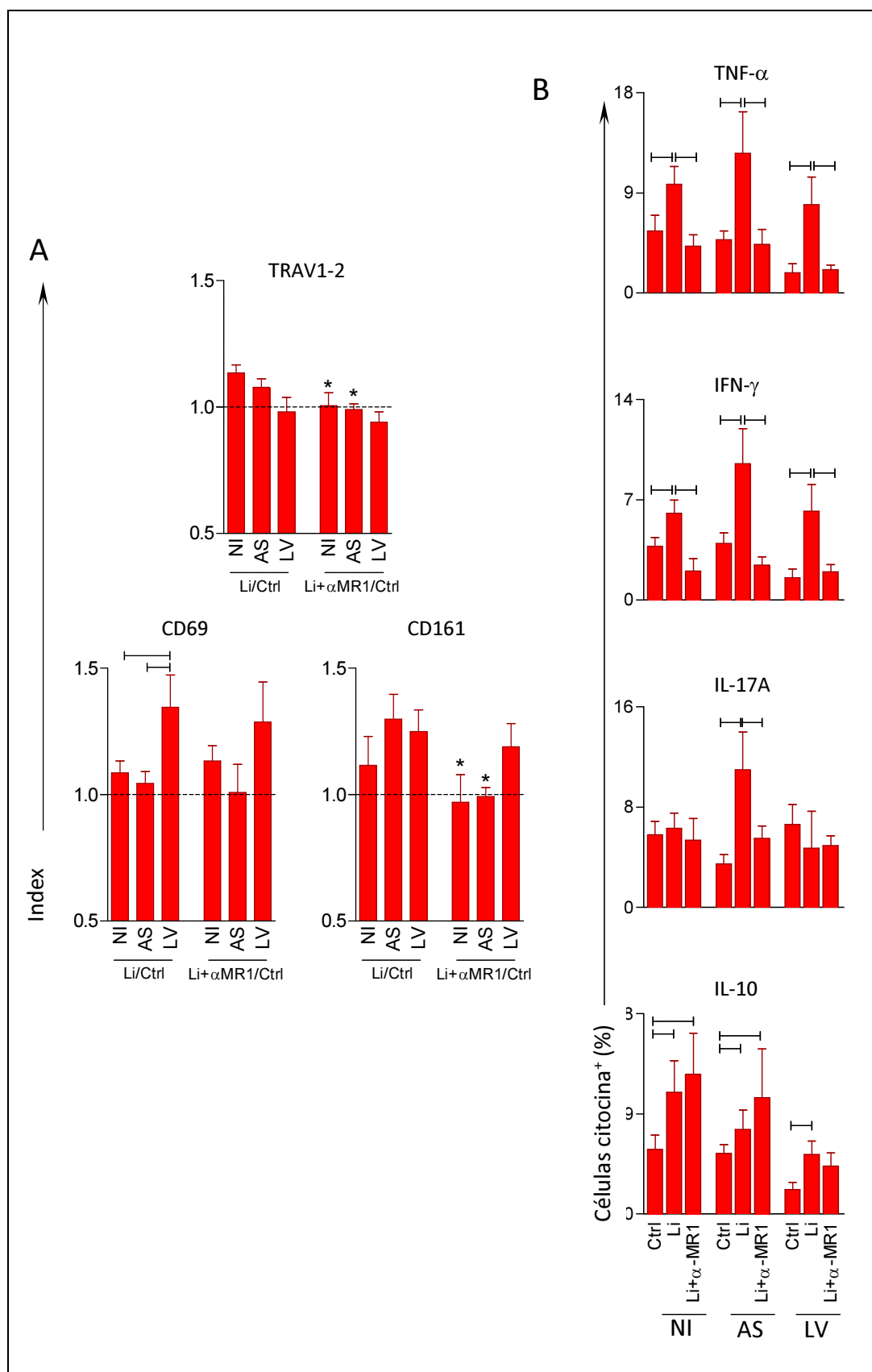


Figura 17: Perfil de ativação e expressão de citocinas intracelulares por células MAIT de indivíduos dos grupos NI, AS e LV, após culturas *in vitro* na presença de *L. infantum* e de anticorpo de bloqueio anti-MR1. (A) Os perfis de expressão de TCRV α 7.2 intracelular e de CD69 e CD161 na superfície das células foram avaliados por meio da média geométrica da intensidade média de fluorescência (gMFI) associada a cada um dos biomarcadores, nos grupos NI, AS e LV. Os

resultados foram expressos como index da expressão de cada biomarcador, calculados pela razão dos valores de gMFI obtidos nas culturas estimuladas com promastigotas de *L. infantum*, na ausência (Li) e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1 (Li+ α -MR1), pelos valores das culturas controle (Ctrl). Os resultados encontram-se plotados em gráficos de barras, que representam a média e o desvio padrão para cada biomarcador. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e destacadas com o símbolo * (diferença da cultura controle (---)) e por linhas conectoras entre as mesmas culturas em grupos diferentes. (B) As expressões de TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-10 intracelulares por célula MAIT foram avaliadas como frequência de células citocina⁺ dentro desta população. Os resultados foram expressos em gráficos de barras representativos da média e desvio padrão da frequência de células citocina⁺ obtidos nas culturas Ctrl, Li e Li+ α -MR1, nos grupos NI, AS e LV. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e representadas por linhas conectoras.

5.3 Produção de citocinas por células T CD4⁺ e células T CD8⁺ convencionais do sangue periférico de crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave, após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania infantum*, na ausência e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1

A avaliação da expressão intracelular de citocinas por células T convencionais foi realizada com o intuito de verificar se o bloqueio da ativação de células MAIT, via MR1, iria impactar na resposta de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ao estímulo com *L. infantum* (Figura 18). Os resultados mostraram que o bloqueio da ativação de células MAIT induziu aumento da produção de TNF- α por linfócitos T CD8⁺ e de IFN- γ por ambos, CD4⁺ e CD8⁺, exclusivamente no grupo AS (Figura 18A). Nos grupos NI e LV foi observada uma fraca produção destas citocinas pelos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ em resposta ao estímulo com *L. infantum* (Figura 18A). Nas análises de *heatmap* é possível observar que o aumento da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ ocorre paralelamente ao bloqueio da produção de TNF- α , IFN- γ e IL-17A por células MAIT, na presença do bloqueio de MR1 (Figura 18B).

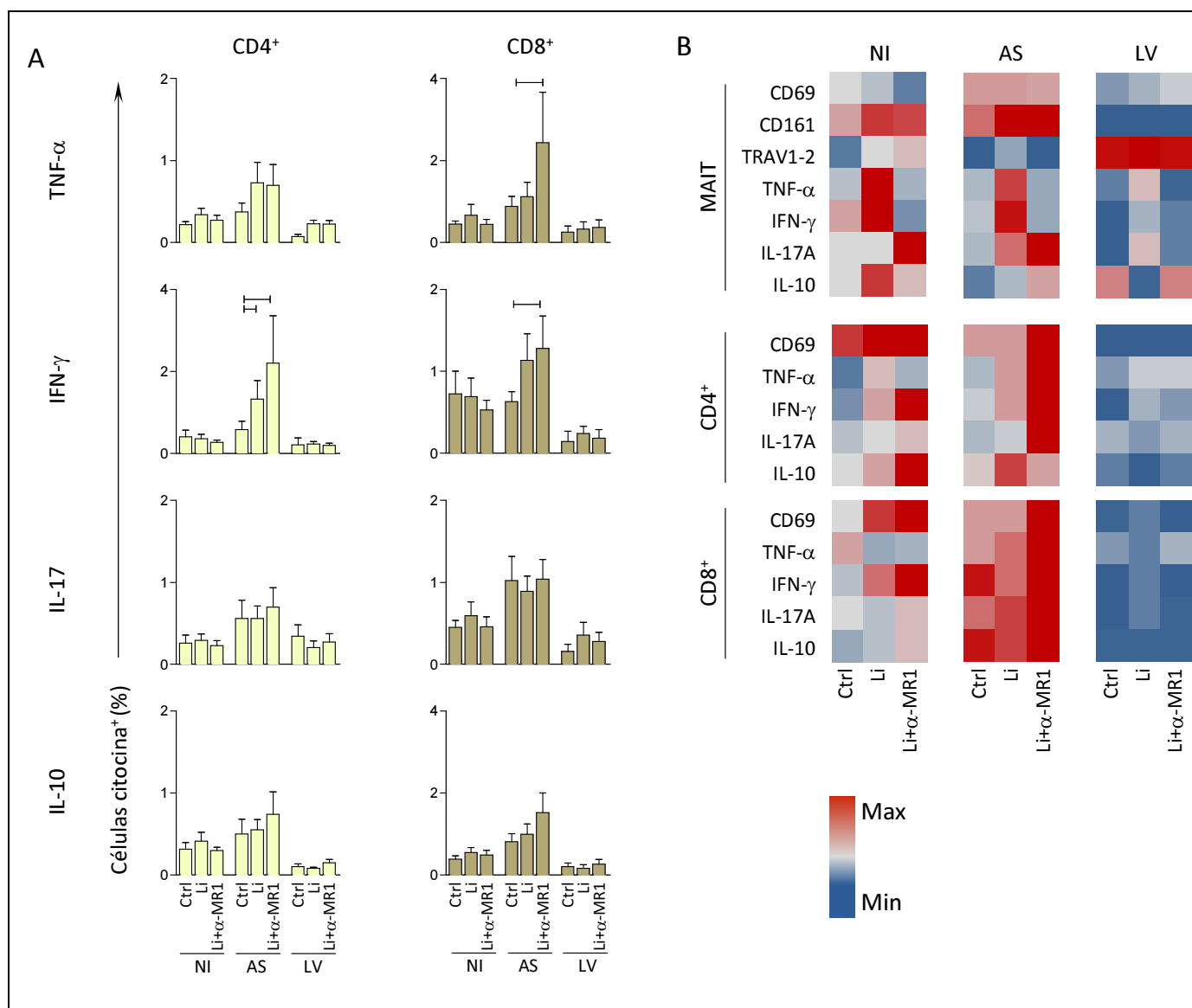


Figura 18: Produção de citocinas por células T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais e células MAIT de indivíduos dos grupos NI, AS e LV, após culturas *in vitro* na presença de *L. infantum* e de anticorpo de bloqueio anti-MR1. (A) Perfil de expressão de TNF- α , IFN- γ , IL-17A e IL-10 intracelulares por célula T CD4⁺ e CD8⁺. Os resultados foram expressos em gráficos de barras representativos da média e do desvio padrão da frequência de células citocina⁺ obtidos nas culturas controle (Ctrl) e estimuladas com promastigotas de *L. infantum*, na ausência (Li) e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1 (Li+ α -MR1), nos grupos NI, AS e LV. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e representadas por linhas conectoras. (B) Perfil panorâmico da ativação de células MAIT e células T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais avaliados em diagrama de *heatmap* da frequência de indivíduos alto produtores para cada biomarcador, nos grupos NI, AS e LV, nas culturas Ctrl, Li e Li+ α -MR1, classificados de acordo com a mediana global calculada para cada biomarcador.

5.4 Influência do bloqueio de MR1 nas características fenotípicas, capacidade fagocítica e produção de NO por monócitos e neutrófilos do sangue periférico após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *Leishmania infantum*, em crianças com leishmaniose visceral assintomática e clássica não grave

Com o intuito de se investigar o impacto do bloqueio da ativação de células MAIT na atividade dos fagócitos, os perfis fenotípico e funcional de monócitos e neutrófilos do sangue periférico de crianças saudáveis e com LV assintomática e clássica não grave foram avaliados quanto à expressão de CD14 em monócitos e a expressão de HLA-DR, a produção de NO e a internalização de *Leishmania* em monócitos e neutrófilos (Figura 19). Os resultados mostraram que a presença de *L. infantum* é capaz de reduzir a expressão de CD14 na superfície dos monócitos e aumentar a expressão de HLA-DR na superfície de neutrófilos, ambos os fenômenos ocorreram independentemente de MR1, nos três grupos de indivíduos estudados (Figura 19 A e B). Por outro lado, a produção de óxido nítrico induzida pela presença do parasito foi parcialmente suprimida pela adição do anticorpo de bloqueio anti-MR1, em monócitos no grupo AS e em monócitos e neutrófilos no grupo LV (Figura 19 A e B). A internalização de *L. infantum* não foi alterada pela presença do anti-MR1.

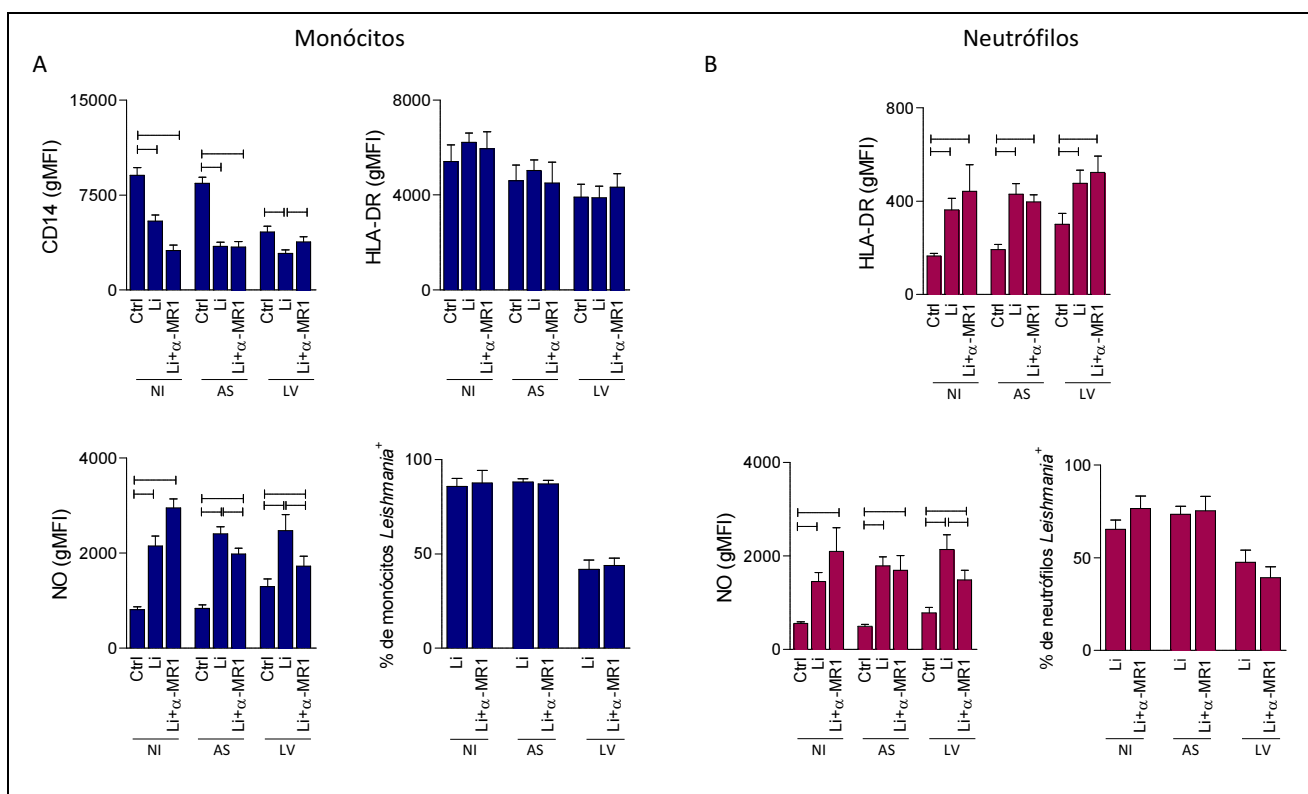


Figura 19: Frequência, perfil fenotípico de ativação e perfil funcional de monócitos e neutrófilos de indivíduos dos grupos NI, AS e LV, após cultura *in vitro* com formas promastigotas de *L. infantum*, na ausência e presença de bloqueio anti-MR1. Os perfis de

ativação e produção de NO foram avaliados como média geométrica da intensidade de fluorescência correspondente a cada marcador, (A) em monócitos (expressão de CD14 e HLA-DR) e (B) em neutrófilos (expressão de HLA-DR) nas culturas controle (Ctrl) e estimuladas com promastigotas de *L. infantum*, na ausência (Li) e presença de anticorpo de bloqueio anti-MR1 (Li+ α -MR1). A capacidade de internalização de *L. infantum* foi avaliada por meio da frequência de células *L. infantum*⁺ nas culturas Li e Li+ α -MR1. Os resultados encontram-se plotados em gráficos de barras, representativos da média e do desvio padrão em cada condição de cultura avaliada, nos grupos NI, AS e LV. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$ e representadas por linhas conectoras.

Os dados de produção de NO e internalização de *Leishmania* por monócitos foram correlacionados com os dados de produção de citocinas por células MAIT (Tabela 8). Com isso foi possível observar correlações negativas significativas entre a produção de NO e a expressão de TNF- α por células MAIT nos grupos NI e AS e a expressão de IL-10 por células MAIT nos grupos NI e LV (Tabela 8). Por outro lado, a produção de NO por monócitos se correlacionou positivamente à produção de IFN- γ no grupo AS, demonstrando que a produção desta citocina por células MAIT é importante para a ativação da produção de NO neste grupo (Tabela 8).

A taxa de internalização de *L. infantum* foi inversamente proporcional à produção de TNF- α por células MAIT em todos os grupos (Tabela 8). Também foi possível observar que, nos indivíduos com LV assintomática, aqueles que apresentaram maior produção de IL-17A por células MAIT internalizaram menos *L. infantum* (Tabela 8). Interessantemente, nos grupos NI e AS maiores taxas de internalização foram associadas à menor produção de IL-10 por células MAIT, enquanto que no grupo LV foi observada correlação positiva entre estas variáveis (Tabela 8).

Tabela 8: Análises de correlação da produção de NO e internalização de *L. infantum* por monócitos e neutrófilos e a produção de citocinas por células MAIT em indivíduos dos grupos NI, AS e LV.

Expressão de citocinas por células MAIT (%)		NI		AS		LV	
		R	p	R	p	R	p
Expressão de NO em monócitos (gMFI)	TNF- α	-0.6084	0.0358	-0.5769	0.0390	-0.2308	0.4273
	IFN- γ	0.1248	0.6577	0.5087	0.0311	0.1692	0.5630
	IL-17A	0.0643	0.8199	-0.2611	0.2953	0.1166	0.6914
	IL-10	-0.6154	0.0252	-0.2817	0.2574	-0.6673	0.0350
Internalização de <i>Leishmania</i> por monócitos (gMFI)	TNF- α	-0.5769	0.0390	-0.5775	0.0306	-0.6573	0.0202
	IFN- γ	-0.1487	0.6279	-0.2198	0.3807	0.1888	0.5567
	IL-17A	0.0110	0.9716	-0.5000	0.0410	-0.1888	0.5567
	IL-10	-0.7418	0.0037	-0.4828	0.0424	0.6364	0.0479

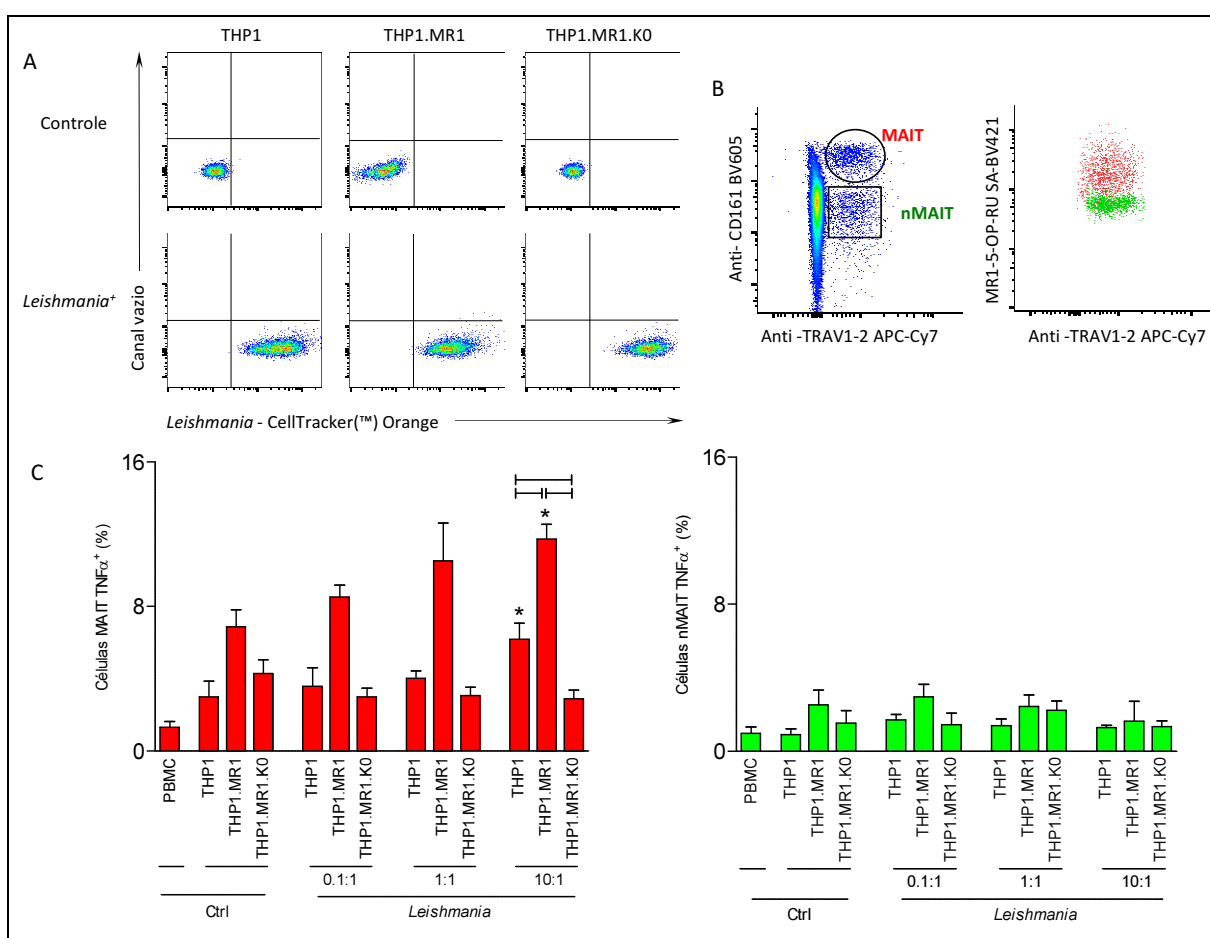
gMFI= média geométrica da intensidade de fluorescência; R= coeficiente de correlação; p = valor de p obtido pelo teste de Sperman.

5.5 Ativação de células MAIT do sangue periférico de indivíduos saudáveis, após contato com células THP1 infectadas com *Leishmania mexicana*

A fim de se comprovar que a ativação de células MAIT por *Leishmania* acontece por via dependente de MR1, foram realizados ensaios de co-cultivo empregando-se as linhagens celulares THP1, THP1.MR1 (células THP1 com superexpressão de MR1) e THP1.MR1.K0 (células THP1 nocautes para MR1) infectadas com *Leishmania mexicana* (Figura 20A). Neste ensaio, as células MAIT foram selecionadas de acordo com sua positividade para 5-OP-RU e expressão do TCRV α 7.2, que também expressaram alto nível de CD161 em sua

superfície (Figura 20B). A resposta de células TCRV α 7.2⁺ e negativas para 5-OP-RU, que apresentam fenótipo compatível à nMAIT, também foi estudada (Figura 20B). A ativação das células foi avaliada de acordo com a produção de TNF- α , expressa como frequência de células TNF- α ⁺ dentro de cada população.

Os resultados obtidos confirmaram a dependência de MR1 para ativação das células MAIT por APCs infectadas com os parasitos, resultado que foi dependente da taxa de infecção utilizada (Figura 20C). Adicionalmente, a produção de quantidades expressivas de TNF- α , bem como a dependência de MR1 foram observadas apenas em células MAIT (5-OP-RU⁺) (Figura 20C).



5.6 Parasitismo e concentração de células MAIT e de linfócitos T convencionais no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 MR1^{-/-} e C57BL/6 selvagens após infecção experimental com amastigotas de *L. donovani*

Com o intuito de se verificar o papel de células MAIT na LV *in vivo*, camundongos C57BL/6 selvagens *naïve* ou infectados com formas amastigotas de *L. donovani* e camundongos C57BL/6 MR1 nocautes (MR1^{-/-}) infectados com formas amastigotas de *L. donovani* foram avaliados quanto ao parasitismo e à concentração de células MAIT e de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais no fígado e no baço. Como podemos observar na Figura 21A, os camundongos MR1^{-/-} tiveram maior parasitismo no fígado 3 semanas após a infecção, em comparação aos camundongos selvagens. No baço, o parasitismo nos camundongos MR1^{-/-} passou a ser significativamente superior a partir da quarta semana após a infecção e apresentou tendência de crescimento entre a terceira e a sexta semana (Figura 21A).

Enquanto os camundongos MR1^{-/-} não expressam células MAIT, nos camundongos selvagens as concentrações de células MAIT total e de MAIT CD8⁻ apresentaram perfil inverso ao observado para o parasitismo no fígado. Em comparação aos camundongos *naïve*, a infecção ocasionou aumento do número de células MAIT totais por massa (mg) de tecido no fígado após 3 e 6 semanas de infecção (Figura 21B). No baço, a infecção ocasionou aumento das concentrações de células MAIT totais e MAIT CD8⁻ apenas na terceira semana de infecção. Após este período, houve perda de células MAIT e de suas subpopulações, tendo as células MAIT CD8⁺ atingido nível inferior ao observado nos animais *naïve* na quarta semana após a infecção (Figura 21B).

Paralelamente, a infecção ocasionou aumento de linfócitos T CD4⁺ convencionais no fígado de camundongos MR1^{-/-} 4 e 6 semanas após a infecção. No baço de camundongos MR1^{-/-}, o aumento de células T CD4⁺ foi observado na sexta semana da infecção (Figura 21B). Além disso, houve aumento de linfócitos T CD8⁺ convencionais no fígado de animais MR1^{-/-}, em comparação aos animais selvagens infectados, 4 e 6 semanas após a infecção (Figura 21B). O mesmo fenômeno foi observado no baço 6 semanas após a infecção (Figura 21B).

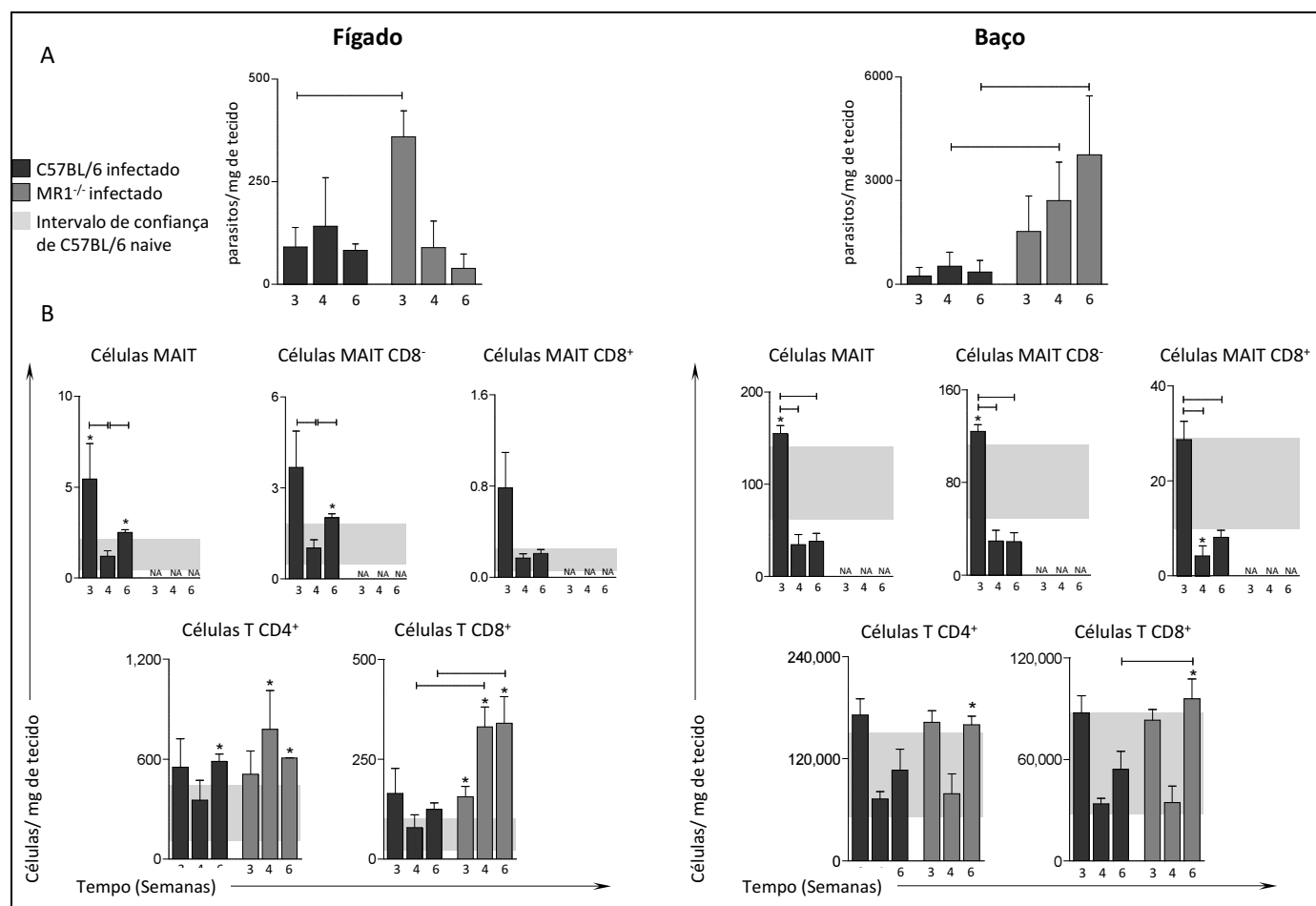


Figura 21: Parasitismo e frequência de células MAIT e T convencionais no fígado e no baço de camundongos C57BL/6 selvagens e MR1^{-/-} 3, 4 e 6 semanas após infecção com *L. donovani*. (A) Os parasitismos no fígado e no baço dos camundongos C57BL/6 selvagens e MR1^{-/-} foram quantificados por PCR em tempo real e os resultados calculados com base na curva padrão encontram-se expressos em gráficos de barras que representam a média e o desvio padrão do número de parasitos por mg de tecido. (B) Quantificação de células MAIT, das subpopulações MAIT CD8⁻ e CD8⁺ e das populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ convencionais no baço e no fígado de camundongos C57BL/6 selvagens e MR1^{-/-} infectados, nos momentos 3, 4 e 6 semanas após a infecção. Os resultados foram apresentados em gráficos de barra expressando a média e o desvio padrão do número de células por mg de tecido observadas em cada uma das populações, em ambos os órgãos. Diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram destacadas com *, quando os resultados diferiram dos observados nos camundongos *naïve*. As linhas conectoras foram utilizadas para destacar diferenças observadas entre os diferentes tempos de infecção dentro de um mesmo grupo; ou entre tempos iguais de infecção, entre camundongos C57BL/6 selvagens e MR1^{-/-} infectados. Na= não se aplica.

5.7 Análises histopatológicas do fígado e do baço de camundongos C57BL/6 selvagens e camundongos C57BL/6 MR1^{-/-}, após infecção experimental com amastigotas de *L. donovani*

As análises histopatológicas do fígado demonstraram inflamação nas áreas portal, periportal e lobular, em camundongos selvagens e MR1^{-/-}, especialmente na terceira semana

após a infecção. Fotomicrografias representativas do fígado de camundongos selvagens, MR1^{-/-} e de camundongos *naïve* estão apresentadas na figura 22. Após a infecção com *L. donovani*, foram observados sítios de inflamação nas regiões portal, periportal e lobular, em comparação aos animais *naïve*. O grupo de animais MR1^{-/-} apresentou a maior proporção de animais com inflamação portal significativa 4 e 6 semanas após a infecção, em comparação aos animais selvagens infectados (Figura 22A). Estes resultados podem indicar que células MAIT da região portal são responsáveis pela imunovigilância dos tecidos hepáticos após a infecção com *Leishmania donovani* nos camundongos.

No baço (Figura 22B), as análises histopatológicas indicaram hiperplasia da polpa branca em camundongos selvagens e MR1^{-/-}. Os gráficos de barras demonstram hiperplasia precoce e mais intensa na polpa branca em animais MR1^{-/-}, 3 e 4 semanas após a infecção. A avaliação das zonas de linfócitos T e B no baço sugerem aumento progressivo nas áreas de linfócitos T entre a terceira e a sexta semana após a infecção com *L. donovani*, especialmente nos camundongos selvagens. Por outro lado, houve diminuição significativa das áreas de linfócitos B nos baços dos camundongos selvagens, mas não nos animais MR1^{-/-}. Como consequência, houve aumento significativo da razão entre as zonas T/B nos camundongos selvagens 6 semanas após a infecção, o que não foi observado nos camundongos MR1^{-/-}.

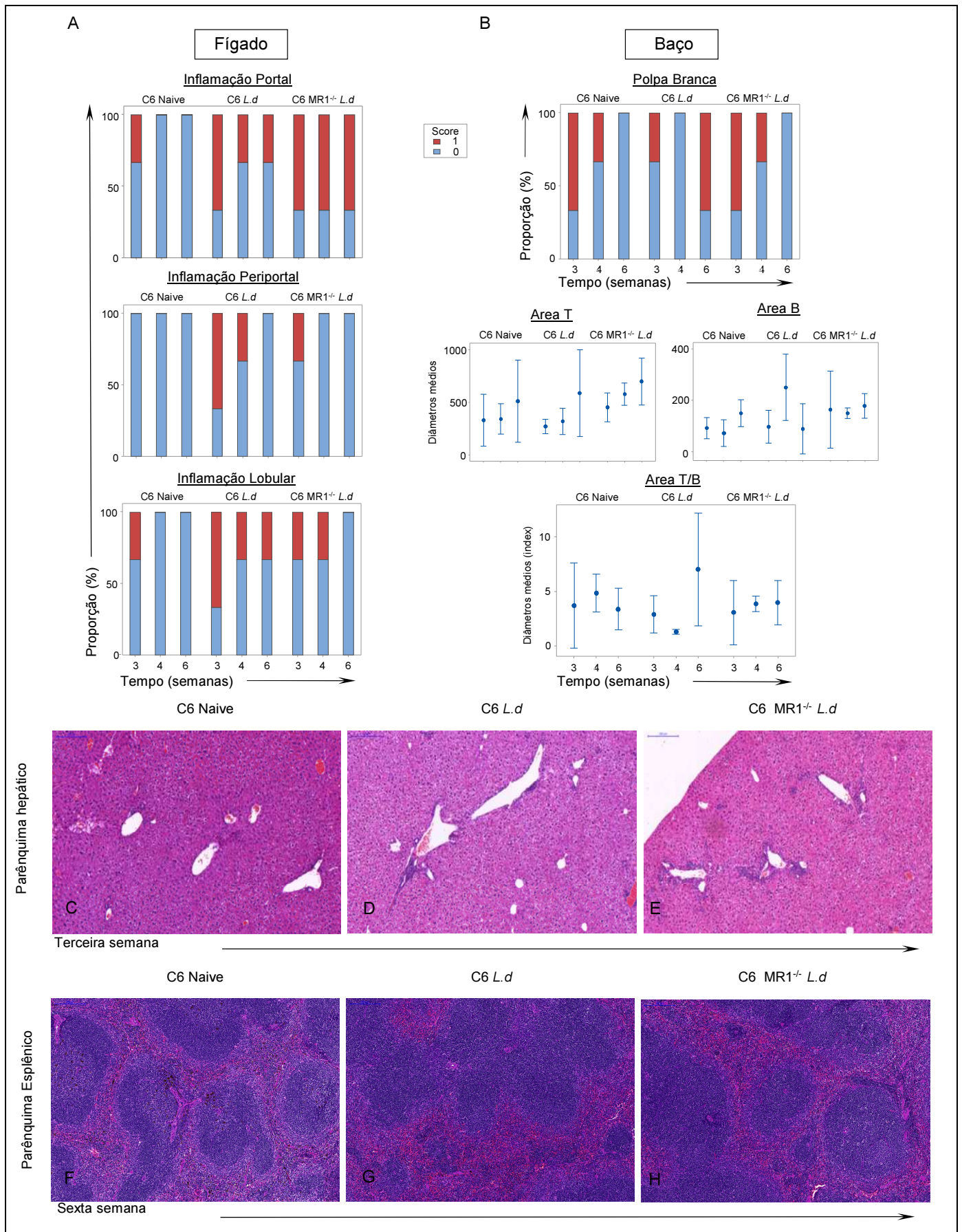


Figura 22: Análises histopatológicas do fígado e do baço de camundongos C57BL/6 *naive* e camundongos C57BL/6 e MR1^{-/-} infectados com *L. donovani*. (A) Gráficos de *stacked bars* da

inflamação portal, periportal e lobular no fígado de camundongos C57BL/6 *naïve* e C57BL/6 e MR1^{-/-} infectados, 3, 4 e 6 semanas após a infecção. (B) Análise histopatológica do baço. Os gráficos de *stacked bars* representam a hiperplasia na polpa branca do baço em camundongos C57BL/6 *naïve* e C57BL/6 e MR1^{-/-} infectados, 3, 4 e 6 semanas após a infecção. Os gráficos de dispersão foram construídos a partir dos valores médios de diâmetro das áreas T e B esplênicas e da razão entre estas duas variáveis em todos os grupos, nos três tempos avaliados. Valores representados como proporção se baseiam em percentuais calculados separadamente por tempo, dentro de cada grupo. Diferenças estatisticamente significativas foram consideradas quando $p < 0,05$. (C) Fotomicrografias representativas do parênquima hepático de camundongos C57BL/6 *naïve* e C57BL/6 e MR1^{-/-} infectados, 3 semanas após a infecção e do parênquima esplênico, 6 semanas após a infecção (as barras de escala correspondem à 200 μ m).

6. DISCUSSÃO

A leishmaniose visceral está associada a uma complexa rede de interações imunológicas caracterizada por elevada produção de mediadores inflamatórios responsáveis pela resposta de fase aguda, e à presença de citocinas moduladoras de funções leishmanicidas de macrófagos, no microambiente dos órgãos acometidos pelo parasito. Muitos têm sido os esforços dispendidos na tentativa de se compreender a dinâmica de interações entre o parasito e os componentes do sistema imune, especialmente aqueles envolvidos na resposta imune inata.

Nesse sentido há um interesse crescente em se estudar o papel de células T não convencionais, conhecidas como “*innate-like T cells*” ($T\gamma\delta$, NKT e MAIT), nas leishmanioses. Este grupo de células se comporta de um modo fundamentalmente diferente das células T convencionais, uma vez que elas circulam com fenótipo de células de memória efetora, prontas para expandir rapidamente em resposta à estimulação, atuando como sentinelas periféricas do sistema imune (ROSSJOHN *et al.*, 2012; LE BOURHIS *et al.*, 2013; VANTOUROUT *et al.*, 2013).

No caso da célula $T\gamma\delta$, seu papel na LV clássica ainda é controverso. Embora tenha sido primeiramente relacionada à patogênese da doença (RAZIUDDIN *et al.*, 1992), Lager e colaboradores (2003) sugeriram que seu papel seja regulador. Além disso, em modelo murino foi demonstrada a importância destas células na contenção da multiplicação dos parasitos no fígado, nos estágios iniciais da infecção experimental (SHEEL *et al.*, 2015).

Já as células NKTs foram relacionadas à maturação dos granulomas e se mostraram eficazes na eliminação de células dendríticas infectadas por *Leishmania* (AMPREY *et al.*, 2004; CAMPOS-MARTIN *et al.*, 2006). Em pacientes com LV clássica, as células NKT $CD4^+$ atuam como fonte de IL-10 e são mais propensas a migrarem para o sítio da infecção, onde podem atuar na patogênese da doença (KUMARI *et al.*, 2015). Por outro lado, as células NKT $CD8^+$, que representam 90% das células NKTs no sangue periférico, expressam maior quantidade de IFN- γ (KUMARI *et al.*, 2015). Em geral, além do importante papel na resposta à LV, as células NKT aparecem em frequência reduzida no sangue periférico dos pacientes, indicando migração para órgãos acometidos pela infecção como o fígado (KUMARI *et al.*, 2015).

Semelhantemente, no presente trabalho observou-se frequência reduzida de células MAIT no sangue periférico de indivíduos com LV assintomática e redução ainda

mais expressiva em pacientes com LV clássica, que pode ser atribuída à redução da frequência de células MAIT CD8⁺ nestes indivíduos. Considerando que há variações na frequência destas células de acordo com a idade (NOVAK *et al.*, 2014), foi de nosso interesse avaliar se a redução da frequência de células MAIT no sangue periférico estava relacionada à idade da população estudada. Assim, análises de correlação foram realizadas entre as variáveis frequência de células MAIT e idade dos indivíduos. Os resultados obtidos demonstraram que o baixo número de células MAIT circulantes não reflete a variação das medianas de idade observadas entre os grupos avaliados, reforçando a hipótese de envolvimento destas células na resposta à LV.

No âmbito das doenças causadas por parasitos protozoários, Mpina e colaboradores (2017) encontraram frequências reduzidas de células MAIT CD8⁺ e MAIT CD8⁻ em militares artificialmente infectados com esporozoítos de *Plasmodium falciparum*, simulando um processo de vacinação (MPINA *et al.*, 2017). O mesmo trabalho demonstrou também que a expressão de CD69 por células MAIT variou ao longo da infecção nos indivíduos testados, embora não tenha sido possível o estabelecimento de um padrão, como aumento ou redução de sua expressão, uma vez que as células MAIT se comportaram de modo distinto em cada indivíduo (MPINA *et al.*, 2017). Diversos estudos têm relatado a diminuição da frequência de células MAIT circulantes no curso da infecção com diferentes micro-organismos e atribuído estes resultados a inúmeros fatores, como migração, exaustão e apoptose. De acordo com esses relatos, frequências reduzidas de células MAIT circulantes foram descritas em pacientes infectados com *Helicobacter pylori*; no entanto, alterações na frequência gástrica destas células não foram observadas (BOOTH *et al.*, 2015). Vários trabalhos publicados relataram redução da frequência e do número absoluto de células MAIT circulantes também em pacientes infectados com *Mycobacterium tuberculosis*, em comparação a indivíduos saudáveis (GOLD, *et al.*, 2014; JIANG *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2015). No estudo realizado por Le Bourhis e colaboradores (2010), a hipótese de migração foi reforçada pela identificação de alta frequência de células MAIT no pulmão. Por outro lado, Kwon e colaboradores (2015) relataram que a diminuição de células MAIT circulantes pode estar relacionada à elevada expressão de PD-1 e correlacionou a deficiência destas células à severidade da doença. Também em pacientes com hepatite B crônica observou-se diminuição da frequência de células MAIT circulantes e aumento da expressão de marcadores de exaustão, incluindo PD-1 e CTLA-4 (YONG *et al.*, 2018).

Além disso, observou-se que células MAIT de pacientes com tuberculose ativa produziam menores quantidades de granulinas e granzima B e expressavam mais CD69 (JIANG *et al.*, 2014; KWON *et al.*, 2015). Mesmo nos casos de ativação indireta das células MAIT por citocinas, como ocorre na infecção por HIV, observou-se redução da frequência de células MAIT, ao mesmo tempo em que as células MAIT circulantes expressavam maior nível de CD69 (LEEANSYAH *et al.*, 2013; FERNANDEZ *et al.*, 2015). Diferentemente dos dados descritos na tuberculose ativa e na infecção pelo HIV, no presente estudo, além da redução da frequência de células MAIT circulantes, observou-se menor expressão de CD69 nos pacientes com a doença ativa, em comparação com indivíduos assintomáticos ou não infectados. Essa redução da expressão de CD69 nas células MAIT circulantes pode ser resultante da migração das células ativadas para os sítios de infecção, uma vez que esta molécula também pode estar envolvida na migração de linfócitos (FREEMAN *et al.*, 2012). A redução da expressão de CD69 pelas células MAIT circulantes também já foi relatada em pacientes com hepatite B crônica (YONG *et al.*, 2017). Neste caso, a redução de CD69 correlacionou-se à perda da funcionalidade das células MAIT e os autores sugeriram que a perda deste marcador pode estar associada à exaustão destas células (YONG *et al.*, 2017, 2018).

No presente estudo foi observada, ainda, a redução da expressão de CD161 em células MAIT, particularmente nas células MAIT CD8⁺, enquanto que as células MAIT CD8⁻ expressaram maiores níveis desse biomarcador, sugerindo que as duas subpopulações de células MAIT podem desempenhar papéis distintos durante a patogênese na LV em crianças. O CD161 é um receptor de membrana típico de células NK e induz sinal inibitório nestas células (ROSEN *et al.*, 2005). Entretanto, em células T, este receptor parece ter função de coestimulação (GERMAIN *et al.*, 2011) e, em células B e células dendríticas, este marcador já foi relacionado à ativação (ALDEMIR *et al.*, 2005; GERMAIN *et al.*, 2011). Embora seu papel em células MAIT não tenha sido completamente esclarecido, há indícios de que o receptor esteja relacionado à modulação da produção de citocinas por estas células e não à sua atividade citotóxica (LE BOURHIS *et al.*, 2013). Com relação à expressão do TCRV α 7.2, em pacientes com LV clássica, os dados demonstraram aumento da sua expressão na superfície das células MAIT CD8⁺ e MAIT CD8⁻, além das células nMAIT, o que seria indicativo da ativação destas células durante a infecção. Nesse sentido, buscou-se avaliar como as células MAIT são capazes de responder à *L. infantum*.

Considerando que a expressão de CD69 associada à produção de IFN- γ e TNF- α são os biomarcadores mais frequentemente empregados para a caracterização da ativação das células MAIT *in vitro* (GOLD *et al.*, 2010; LE BOURHIS *et al.*, 2010; LEEANSYAH *et al.*, 2013; DIAS *et al.*, 2016; JIANG *et al.*, 2016), nesse estudo, o perfil fenotípico-funcional de células MAIT foi avaliado após cultura de curta duração na presença de *L. infantum*. Os dados demonstraram que as células MAIT são capazes de serem ativadas na presença de *L. infantum*, seja por via direta com participação da molécula apresentadora de antígenos MR1, ou indireta.

No que se refere à expressão de CD69, a presença do parasito induziu aumento da expressão deste marcador no grupo LV. Embora este fenômeno não tenha sido dependente de MR1, o aumento da expressão de CD69 indica que, apesar da infecção, as células MAIT de crianças com LV clássica podem ser ativadas pela presença da *Leishmania* e, potencialmente, exercer suas atividades citotóxicas e de produção de citocinas pró-inflamatórias nos microambientes de maior acometimento pelo parasito.

O perfil de expressão do TCRV α 7.2 e do marcador CD161 também foram avaliados após estímulo *in vitro*. A ativação das células MAIT tem sido relacionada à diminuição da expressão do TCRV α 7.2 *in vitro* (SALIO *et al.*, 2017). Nossos dados também demonstraram que, no grupo LV, *L. infantum* induziu redução da expressão do TCRV α 7.2 *in vitro*, indicado pelo index abaixo de 1. Os resultados demonstraram ainda, redução de expressão de TCRV α 7.2 e CD161 na presença do bloqueio no grupo AS, sugerindo que no âmbito da infecção assintomática com *L. infantum* a expressão destes marcadores está diretamente relacionada ao grau de ativação das células MAIT.

Através da realização de culturas *in vitro*, também foi possível demonstrar a capacidade das células MAIT em responder à *L. infantum* através da análise do perfil de produção de citocinas, tanto pró-inflamatórias, como reguladoras. Com relação às citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-17A, a presença do anticorpo anti-MR1 promoveu redução na frequência de células MAIT produtoras, levando-se à conclusão de que o aumento da produção destas citocinas depende de ativação direta, pela apresentação de antígenos de *L. infantum* via MR1 e reconhecimento via TCRV α 7.2. Estes dados são semelhantes aos resultados publicados por Booth e colaboradores (2015), que mostraram que macrófagos infectados com *H. pylori* induzem atividade citotóxica em células MAIT sanguíneas, de maneira restrita ao MR1 e mediada por IFN- γ , TNF- α , IL-17A. Interessantemente, o aumento da produção do IL-17A foi observado apenas no grupo

AS, em concordância com estudos já publicados que descreveram a produção desta citocina por células Th17 como um indicador de resistência à LV (PITTA *et al.*, 2009; NASCIMENTO *et al.*, 2015). Essa característica de resposta inflamatória associada à reposta Th17 tem sido descrita como protetora na LV, estando relacionado à LV assintomática (COSTA *et al.*, 1999; PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005; 2006; ANSARI, HAMESH, SALOTRA, 2006; KHOSHDEL *et al.*, 2009; PITTA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2013; NASCIMENTO *et al.*, 2015).

Já a ativação da produção de IL-10 parece ocorrer por via indireta, ativada pela presença de citocinas reguladoras no microambiente das culturas *in vitro*, uma vez que a presença do bloqueio não ocasionou alterações em sua expressão. Entretanto, novos estudos precisam ser realizados para se determinar a via de ativação da expressão desta citocina, por exemplo, a investigação de citocinas e quimiocinas presentes nos sobrenadantes das culturas, e a expressão de receptores compatíveis na superfície das células MAIT. Uma vez que as culturas foram realizadas com sangue total, muitas células poderiam atuar como fonte de IL-10, especialmente monócitos, e células B e T reguladoras (PERUHYPE-MAGALHÃES *et al.*, 2005 e 2006; SACKS, 2007; SCHAUT *et al.*, 2016; BHATTACHARYA *et al.*, 2016). Embora a via de ativação da produção de IL-10 por células MAIT ainda não tenha sido descrita, outros estudos também foram capazes de detectar a expressão desta citocina em células MAIT humanas e murinas localizadas em tecidos, mas não em células circulantes (KAWACHI *et al.*, 2006; CAROLAN *et al.*, 2015; RAHIMPOUR *et al.*, 2015).

Embora este seja o primeiro estudo abordando aspectos funcionais de células MAIT na leishmaniose, o perfil de produção de citocinas observado em resposta aos parasitos sugere um importante papel para as células MAIT no curso da LV. Considerando-se a elevada frequência em que estas células são encontradas no fígado (DUSSEAUX *et al.*, 2011; JO *et al.*, 2011), órgão muito acometido na LV, seria razoável indicar as células MAIT como uma das principais células envolvidas nos mecanismos iniciais de controle da infecção. Além disso, como as células MAIT são células de memória efetora, elas se tornam alvo atraente para imunoterapia e/ou vacinas, abrindo um caminho alternativo para estudos futuros nas leishmanioses humanas.

Nas culturas com a presença do anti-MR1, o bloqueio da resposta de células MAIT foi compensado pelo aumento da participação de células T CD4⁺ e células T CD8⁺ convencionais, principalmente no grupo AS, que concentrou o maior número de indivíduos alto-produtores de citocinas por células da imunidade adaptativa, conforme

apresentado nos diagramas de *heatmap*. Nestes indivíduos, os aumentos das produções de TNF- α por células T CD8⁺ e de IFN- γ por células T CD4⁺ e T CD8⁺ demonstraram a capacidade destes indivíduos em ativar rapidamente uma resposta imune adaptativa, com perfil associado à resistência ao parasito (REINER *et al.*, 1993; SMELT *et al.*, 1997; NASCIMENTO *et al.*, 2015; RAMOS *et al.*, 2016). A ativação rápida das células T convencionais é indicativo da existência de memória imunológica neste grupo, uma vez que os indivíduos assintomáticos tiveram contato prévio com o parasito, mas não desenvolveram sinais e sintomas clínicos da LV clássica.

Já nos pacientes com LV clássica, as células T convencionais não apresentaram produção significativa de nenhuma das citocinas avaliadas. Esses resultados podem estar relacionados à exaustão e apoptose destas células, induzidos por células T reguladoras e B reguladoras IgD⁺ (ESCH *et al.*, 2013; GAUTAM *et al.*, 2014; SCHAUT *et al.*, 2016; MEDINA-COLORADO *et al.*, 2017). , ou mesmo ocorrer por motivo de recrutamento das células ativadas para o sítio da infecção (MURRAY, 2001; MELO *et al.*, 2009). O fato de as células MAIT se manterem responsivas ao parasito reforça o potencial destas células como alvo para o desenvolvimento de esquemas para imunoterapia.

Além do impacto do bloqueio de MR1 nas células T convencionais, avaliamos o seu efeito também sobre o papel de monócitos e neutrófilos presentes nas culturas. De modo geral, a expressão de HLA-DR em neutrófilos foi induzida pela presença das formas promastigotas de *L. infantum*, não havendo alteração na presença do anti-MR1. A presença do parasito induziu, ainda, diminuição da expressão de CD14 na superfície dos monócitos, efeito que também ocorreu independentemente de MR1, podendo estar relacionado à internalização dos parasitos por este fagócito e/ou aumento de sCD14 circulante, mediada pelo parasito. Tem sido descrito que na LV clássica, há aumento dos níveis de sCD14 e esse aumento estaria associado à presença de elevados níveis de IL-10, IL-6 e IL-27 circulantes e levariam à desativação dos macrófagos e progressão da infecção (DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Por outro lado, a ativação da produção de óxido nítrico por monócitos, nos grupos AS e LV, e por neutrófilos, no grupo LV, foi parcialmente diminuída quando as culturas foram realizadas na presença de bloqueio. Sabendo-se que as citocinas TNF- α e IFN- γ estão relacionadas à ativação da produção de NO por monócitos (SACKS, NOBEN-TRAUTH, 2002; NASCIMENTO *et al.*, 2015), este desfecho pode estar

relacionado à redução da produção destas citocinas por células MAIT. De acordo com isso, observou-se que na infecção assintomática há associação direta entre produção de NO por monócitos e produção de IFN- γ por MAIT, mostrando a importância de células MAIT para ativação dos monócitos e sua contribuição para a indução da produção de NO. As análises de correlação também demonstraram que a indução da produção de NO por monócitos independe de TNF- α produzido por MAIT. Esse dado reforça a ideia de que a produção de TNF- α pelos próprios monócitos, demonstrados em estudos anteriores, em sinergia ao IFN- γ de MAIT e outros linfócitos é que seria responsável pela ativação das funções leishmanicidas dos monócitos.

Apesar da variação nos níveis de NO produzido pelos fagócitos, a taxa de internalização de promastigotas de *L. infantum* por monócitos e neutrófilos não sofreu impacto pelo bloqueio de MR1. No grupo AS, as maiores taxas de internalização correlacionaram à menor produção de IL-17A e IL-10 por MAIT. De maneira interessante, o grupo LV não responde eficientemente. Os dados mostraram haver correlação direta entre a produção de IL-10 por células MAIT e internalização de *L. infantum*, associado a menor produção de NO por monócitos.

Para a confirmação de que as células MAIT são ativadas por *Leishmania* diretamente pela via de apresentação de antígenos dependente de MR1, foram realizados experimentos de co-cultivo empregando-se linhagens celulares de monócitos expressando diferentes níveis de MR1. Sobre o modelo empregado, a eficiência das células THP-1 como células apresentadoras de antígenos para a ativação de células MAIT foi reportada em diversos trabalhos já publicados (USSHER *et al.*, 2014; BOOTH *et al.*, 2015; LEPORE *et al.*, 2017; KURIOKA *et al.*, 2017), sendo a avaliação da produção de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-17 um eficiente marcador de ativação a ser utilizado neste modelo (BOOTH *et al.*, 2015).

No presente trabalho, a ativação das células MAIT, que foi avaliada pelo nível de expressão da citocina TNF- α , confirmou a importância da via do MR1 para apresentação de antígenos e ativação das células MAIT. Este fenômeno foi restrito à população positiva para 5-OP-RU, a qual coincide com a população de alta expressão de CD161, corroborando sua identidade associada a MAIT, que foi empregada nos experimentos com amostras clínicas. Além disso, por meio deste ensaio foi possível demonstrar que a resposta observada é dependente da taxa de infecção com *Leishmania*

e não espécie-específico, considerando que outras espécies de *Leishmania* também apresentaram resposta semelhante (dados não apresentados).

A fim de investigar o papel das células MAIT *in vivo* e avaliar se a redução das células MAIT circulantes ocorre devido à migração destas células para os sítios de infecção, foram realizadas infecções em camundongos C57BL/6 MR1 nocaute (MR1^{-/-}) e selvagens. Embora a infecção experimental de camundongos com *Leishmania* não represente o modelo ideal para o estudo da LV, a dificuldade e o risco inerente à obtenção de amostras de fígado e baço humanos justificam o uso deste modelo. Além disso, a prática da biópsia destes órgãos não é parte da rotina para o diagnóstico da doença e a utilização do modelo murino nos permite a comparação dos resultados com amostras controle provenientes de animais não infectados. É importante, ainda, mencionar que, nos estudos em modelo murino, os animais foram infectados com uma espécie de *Leishmania* diferente da espécie causadora da LV na área endêmica onde residem os indivíduos participantes do estudo desenvolvido pelo nosso grupo. O motivo para a escolha da *L. donovani* se deve ao fato de os experimentos terem sido realizados na Universidade de Melbourne, na Austrália, onde a legislação não permite a manutenção de formas vivas de *L. infatum*, atualmente.

Inicialmente, avaliou-se o impacto da ausência de células MAIT sobre o parasitismo no fígado e no baço dos camundongos. Para este fim foi utilizado o modelo murino MR1^{-/-}, que não apresenta níveis detectáveis de célula MAIT mesmo após infecções experimentais, já que seu desenvolvimento e educação tímica são prejudicados pela ausência do MR1 (TREINER *et al.*, 2003; MARTIM *et al.*, 2009; MEIEROVICS *et al.*, 2003; RAHIMPOUR *et al.*, 2015). Nestes camundongos, observou-se maior parasitismo hepático 3 semanas após a infecção, em comparação ao parasitismo observado em camundongos selvagens infectados. Nas análises histopatológicas, neste mesmo período foram observados níveis de inflamação mais intensos no fígado dos animais infectados em comparação aos camundongos *naive*. Apesar disso, a partir da quarta semana de infecção, os camundongos MR1^{-/-} foram tão capazes de controlar a infecção neste órgão quanto os camundongos selvagens; e o controle da infecção se manteve até seis semanas após infecção. De acordo com a literatura, é esperado que a maturação dos granulomas neste modelo ocorra entre 2 e 4 semanas após a infecção, a partir de quando o parasitismo no fígado deve regredir até a oitava semana (MURRAY *et al.*, 2001), e essa diferença observada no primeiro tempo

avaliado, de 3 semanas, sugere a possibilidade de atraso na maturação dos granulomas nos camundongos nocautes em relação aos selvagens.

Por outro lado, no baço, que é conhecidamente o sítio de infecção crônica da LV em modelo murino (KAYE *et al.*, 2004; ROLÃO *et al.*, 2007), os camundongos MR1^{-/-} apresentaram maior nível de parasitismo em comparação aos camundongos selvagens a partir de 4 semanas de infecção. Enquanto que, na sexta semana, a infecção no baço parece ter sido controlada pelos animais selvagens, no modelo murino MR1^{-/-} observamos aumento do parasitismo e estudos complementares são necessários para se determinar a capacidade destes animais para controlar a infecção após este período. Nas análises histopatológicas, os picos de parasitismo coincidiram com as observações de maiores níveis de inflamação tecidual em ambos os modelos murinos, correspondendo a 4 e 6 semanas em camundongos selvagens e em MR1^{-/-}, respectivamente. Também na sexta semana após a infecção, camundongos MR1^{-/-} apresentaram baço cerca de duas vezes maior (medida expressa em massa), em comparação aos camundongos selvagens (dados não apresentados). Estes dados se assemelham aos publicados por Amprey e colaboradores (2004), que encontraram aumentos de 3,5 e 2,5 vezes no parasitismo de fígado e baço, respectivamente, em camundongos CD1d^{-/-} após 4 semanas de infecção. Após este período a infecção regrediu em ambos os órgãos e, com isso, os autores sugeriram que as células NKTs contribuem mais no desenvolvimento de uma resposta protetora na LV do que na eliminação direta dos parasitos (AMPREY *et al.*, 2004).

De acordo com esses dados, diversos trabalhos publicados empregando-se o modelo murino MR1^{-/-}, no estudo de infecções bacterianas, indicaram que as células MAIT desempenham papel importante nas fases iniciais da infecção e no controle do acometimento de outros órgãos (GEORGEL *et al.*, 2001; CHUA *et al.*, 2012; MEIEROVICS *et al.*, 2013). O trabalho de Georgel e colaboradores (2011) atribuiu o aumento da susceptibilidade de camundongos MR1^{-/-} à infecção por *Klebsiella pneumoniae* ao nível reduzido de citocinas inflamatórias encontradas no soro destes animais, em comparação à camundongos selvagens. Na infecção por *Francisella tularensis*, o aumento da susceptibilidade nos camundongos MR1^{-/-} também foi atribuído à diminuição da expressão de citocinas inflamatórias no sítio da infecção e os autores demonstraram que células MAIT de camundongos selvagens são capazes de produzir TNF- α , IFN- γ e IL-17A no sítio da infecção (MEIEROVICS *et al.*, 2013). Nos resultados obtidos no presente trabalho, o nível de parasitismo no fígado foi inversamente proporcional ao número de células MAIT neste órgão nos três tempos

avaliados, nos camundongos selvagens. Sabendo-se do importante papel das citocinas inflamatórias no estabelecimento de uma resposta imune efetiva, é possível que na LV também as células MAIT participem como importante fonte destas citocinas nos sítios de infecção. Esta hipótese reforça os resultados obtidos neste trabalho quanto à produção de TNF- α , IFN- γ e IL-17A por células MAIT, via MR1, em resposta à presença de *Leishmania*. Entretanto, aumentos expressivos de células MAIT nos sítios da infecção não foram observados em nenhum dos tempos avaliados. Com isso, se faz necessária a realização de novos experimentos a fim de se elucidar os motivos que levam à redução das frequências de células MAIT circulantes nos pacientes com LV clássica, como a caracterização da expressão de marcadores de exaustão celular e de apoptose em pacientes com LV, que deverão ser realizadas nas próximas etapas deste projeto. Com relação ao modelo murino, o estudo da frequência das células MAIT no fígado e no baço em tempos mais precoces pós-infecção podem contribuir para o entendimento deste fenômeno, visto que para as células T da imunidade inata é esperada uma migração mais imediata para o sítio da infecção.

Nos camundongos MR1^{-/-}, a ausência de células MAIT parece ter sido compensada principalmente pelo recrutamento de linfócitos T CD8⁺, que foi maior em comparação aos camundongos selvagens a partir de 4 e 6 semanas após a infecção no fígado e após 6 semanas, no baço. Existem evidências sobre o papel de linfócitos T CD8⁺ na LV como fonte de IFN- γ , essencial para a ativação de macrófagos infectados (TSAGOZIS, KARAGOUNI, DOTSIKA, 2003; 2005; POLLEY *et al.*, 2006). Enquanto a importância da atividade citotóxica dos LT CD8⁺ *in vivo* permanece em discussão na LV (SMITH, RODRIGUES, RUSSEL, 1991; TSAGOZIS, KARAGOUNI, DOTSIKA, 2003), na leishmaniose cutânea esta atividade tem sido relacionada à patologia da doença (BELKAID *et al.*, 2002; FARIA *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2013). Além disso, já foram relatados sinais de exaustão em LT CD8⁺ esplênicos cerca de três semanas após a infecção com *L. donovani*, com aumento da expressão de PD-1 por estas células e diminuição da sua atividade funcional quanto à produção de IFN- γ , TNF, IL-2 e granzima B quatro semanas após a infecção, culminando em aumento do parasitismo esplênico (JOSHI *et al.*, 2009). Diante disso, novos estudos se fazem necessários para a elucidação da capacidade dos camundongos deficientes em célula MAIT para desenvolver resposta imune protetora no baço durante estágios mais tardios no curso da LV.

Em suma, os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram de modo geral a habilidade das células MAIT em responder à *Leishmania* diretamente via MR1, e o importante papel que estas células e a molécula apresentadora de antígenos MR1 podem desempenhar na LV, inclusive em modelo de resistência à infecção como o C57BL/6. Mais especificamente, os dados apresentados revelaram a capacidade destas células em gerar resposta com características protetoras na LV, mesmo sob circunstâncias desfavoráveis como no caso dos pacientes com LV clássica, cujos linfócitos T convencionais indicaram baixa responsividade, devido à ausência de células T efectoras de memória, o que é esperado em caso de infecção aguda. Considerando-se tais resultados e conhecendo-se a capacidade de células MAIT em secretar tanto citocinas inflamatórias, como reguladoras, de importância na resposta à LV, torna-se necessário e promissor o estudo destas células como alternativas para o desenvolvimento de esquemas de tratamento em protocolos de imunoterapia.

É importante ressaltar ainda que, embora o presente estudo tenha fornecido informações importantes no âmbito do papel de células MAIT na resposta a parasitos protozoários, a realização de novos estudos para melhor caracterização desta resposta e elucidação de mecanismos se fazem necessários. Com isso, as perspectivas de continuidade deste trabalho incluem o estudo do perfil de células MAIT circulantes no que confere à expressão de marcadores de memória imunológica, regulação e exaustão em resposta à *Leishmania*. Pretende-se ainda avaliar o comportamento de células MAIT frente ao estímulo com diferentes antígenos do parasito e a importância das citocinas na ativação destas respostas.

7. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi demonstrado o potencial das células MAIT, ativadas pela via direta de apresentação de antígenos dependente de MR1 ou indireta via microambiente de citocinas, em desempenhar importante papel na ativação e regulação de mecanismos imunológicos associados à leishmaniose visceral humana, dentre eles, ativação de mecanismos leishmanicidas de monócitos e neutrófilos. Além disso, com base no estudo em modelo murino é possível afirmar que células MAIT apresentam papel protetor no curso da LV *in vivo*, com importante participação no controle do parasitismo hepático e esplênico nos estágios iniciais da infecção.

8. REFERÊNCIAS

- AGA, E. et al. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 169, n. 2, p. 898–905, 2002.
- ALDEMIR, H. et al. Cutting edge: lectin-like transcript 1 is a ligand for the CD161 receptor. **Journal of Immunology**, v. 175, n.12, p. 7791–7795, 2005.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 87, n. 6, p.1028-37, 2012.
- AMPREY, J. L. et al. A subset of liver NK T cells is activated during *Leishmania donovani* infection by CD1d-bound lipophosphoglycan. **The Journal of experimental medicine**, v. 200, n. 7, p. 895–904, 2004.
- ANSARI, N. A.; RAMESH, V.; SALOTRA, P. Interferon (IFN)-gamma , tumor necrosis factor-alpha , interleukin-6, and IFN-gamma receptor 1 are the major immunological determinants associated with post-kala azar dermal leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 194, n. 7, p. 958–965, 2006.
- ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 339–345, 2006.
- ANSTEAD, G. M. et al. Malnutrition alters the innate immune response and increases early visceralization following *Leishmania donovani* infection. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 8, p. 4709–4718, 2001.
- ANTINORI, S. et al. Leishmaniasis among organ transplant recipients. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 8, n.3, p. 191-9 , 2008
- ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–18, 2012.
- ANTONELLI, L. R. V et al. Disparate immunoregulatory potentials for double-negative (CD4- CD8-) alpha beta and gamma delta T cells from human patients with cutaneous leishmaniasis. **Infection and immunity**, v. 74, n. 11, p. 6317–23, 2006.
- ATAYDE, V. D. et al. Leishmania exosomes and other virulence factors: impact on innate immune response and macrophage functions. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 7-18, 2016.
- ATO, M. et al. Defective CCR7 expression on dendritic cells contributes to the development of visceral leishmaniasis. **Nature Immunology**, v. 3, n. 12, p. 1185–1191, 2002.
- BABIKER, D. T.; BAKHIET, S. M.; MUKHTAR, M. M. *Leishmania donovani* influenced cytokines and Toll-like receptors expression among Sudanese visceral leishmaniasis patients. **Parasite Immunology**, v. 37, n. 8, p. 417-25, 2015.
- BACELLAR, O. et al. Interleukin 17 production among patients with American cutaneous leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 200, n. 1, p. 75–8, 2009.
- BADARÓ, R. et al. A prospective study of visceral leishmaniasis in an endemic area of

- Brazil. **The Journal of infectious diseases**, v. 154, n. 4, p. 639–49, 1986.
- BANKOTI, R. et al. Marginal zone B cells regulate antigen-specific T cell responses during infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 8, p. 3961–3971, 2012.
- BEATTIE, L. et al. Interferon regulatory factor 7 contributes to the control of *Leishmania donovani* in the mouse liver. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 3, p. 1057–1066, 2011.
- BELKAID, Y. et al. CD8⁺ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*. **Journal of immunology**, v. 168, n. 8, p. 3992–4000, 2002.
- BELKAID, Y.; PICCIRILLO, C. A; MENDEZ, S. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature**, v. 420, n. September, p. 633–637, 2002.
- BENDELAC, A.; SAVAGE, P. B.; TEYTON, L. The biology of NKT cells. **Annual Review of Immunology**, v. 25, p. 297–336, 2007.
- BEN YOUSSEF, G. et al. Ontogeny of human mucosal-associated invariant T cells and related T cell subsets. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 215, n. 2, p. 459–479, 2018.
- BHATTACHARYYA, S. et al. Immunomodulatory role of interleukin-10 in visceral leishmaniasis: Defective activation of protein kinase C-mediated signal transduction events. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 3, p. 1499–1507, 2001.
- BHATTACHARYA, P. et al. Induction of IL-10 and TGFβ from CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T cells correlates with parasite load in indian kala-azar patients infected with *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004422, 2016.
- BIMAL, S. et al. *Leishmania donovani*: Role of CD2 on CD4⁺ T-cell function in visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v. 118, n. 2, p. 238–246, 2008.
- BOGDAN, C. Natural killer cells in experimental and human leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, p. 69, 2012.
- BOOTH, J. S. et al. Mucosal-associated invariant T cells in the human gastric mucosa and blood: Role in *Helicobacter pylori* infection. **Frontiers in Immunology**, v. 6, n. SEP, p. 1–14, 2015.
- BOUDINOT P, et al. Restricting nonclassical MHC genes coevolve with TRAV genes used by innate-like T cells in mammals. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 21, p. E2983-9, 2016.
- BROWN, D. R.; REINER, S. L. Polarized helper-T-cell responses against *Leishmania major* in the absence of B cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 266–270, 1999.
- CALDAS, A. et al. Balance of IL-10 and interferon-gamma plasma levels in human visceral leishmaniasis: implications in the pathogenesis. **BMC infectious diseases**, v. 5, p. 113, 2005.
- CAMPOS-MARTÍN, Y. et al. Immature human dendritic cells infected with *Leishmania*

infantum are resistant to NK-mediated cytotoxicity but are efficiently recognized by NKT cells. **Journal of immunology**, v. 176, n. 10, p. 6172–6179, 2006.

CAROLAN E. et al. Altered distribution and increased IL-17 production by mucosal-associated invariant T cells in adult and childhood obesity. **Journal of Immunology**, v. 194, n. 12, p. 5775-80, 2015.

CARVALHO, E. M. et al. Immunologic markers of clinical evolution in children recently infected with *Leishmania donovani chagasi*. **Journal of Infectious Diseases**, v. 165, n. 3, p. 535–540, 1992.

CHAGAS, A. C. et al. Lundep, a sand fly salivary endonuclease increases *Leishmania* parasite survival in neutrophils and inhibits XIIa contact activation in human plasma. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 2, 2014.

CHEN, Z. et al. Mucosal-associated invariant T-cell activation and accumulation after *in vivo* infection depends on microbial riboflavin synthesis and co-stimulatory signals. **Mucosal Immunology**, v. 10, n. 1, p. 58-68, 2017.

CHUA, W. J. et al. Polyclonal mucosa-associated invariant T cells have unique innate functions in bacterial infection. **Infection and Immunity**, v. 80, n. 9, p. 3256-67, 2012.

CLARÊNCIO, J. et al. Could the lower frequency of CD8⁺CD18⁺CD45RO⁺ lymphocytes be biomarkers of human VL? **International Immunology**, v. 21, n. 2, p. 137–144, 2009.

COQUET, J. M. et al. Diverse cytokine production by NKT cell subsets and identification of an IL-17-producing CD4-NK1.1- NKT cell population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 32, p. 11287–92, 2008.

CORBETT, A. J. et al. T-cell activation by transitory neo-antigens derived from distinct microbial pathways. **Nature**, v. 509, n. 7500, p. 361–5, 2014.

COSGROVE, C. et al. Early and nonreversible decrease of CD161⁺⁺ /MAIT cells in HIV infection. **Blood**, v. 121, n. 6, p. 951–61, 2013.

COSTA, S. R. et al. T Cell Response of Asymptomatic *Leishmania chagasi* Infected subjects to recombinant *Leishmania* Antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 3, p. 367–370, 1999.

COSTA, A. S. et al. Cytokines and visceral leishmaniasis: a comparison of plasma cytokine profiles between the clinical forms of visceral leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 6, p 735-9, 2012.

COSTA, D. L. et al. Serum cytokines associated with severity and complications of kala-azar. **Pathogens and global health**, v. 107, n. 2, p. 78–87, 2013.

CROXFORD, J. L. et al. Invariant V(α)19i T cells regulate autoimmune inflammation. **Nature Immunology**, v. 7, n. 9, p. 987-94, 2006.

CUI, Y. et al. Mucosal-associated invariant T cell-rich congenic mouse strain allows functional evaluation. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 11, p. 4171–4185, 2015.

- DAS, S. et al. TLR9 and MyD88 are crucial for the maturation and activation of dendritic cells by paromomycin-miltefosine combination therapy in visceral leishmaniasis. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 5, p. 1260-74, 2014.
- DE MOURA, T. R. et al. Immunity to *Lutzomyia intermedia* saliva modulates the inflammatory environment induced by *Leishmania braziliensis*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 6, 2010.
- DIAS, J. et al. Human MAIT-cell responses to *Escherichia coli*: activation, cytokine production, proliferation, and cytotoxicity. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. November, p. 1–8, 2016.
- DOMÍNGUEZ, M. et al. Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in Normal Human Serum. **The Journal of experimental medicine**, v. 24510900, n. 4, p. 451–459, 2002.
- DOMÍNGUEZ, M. et al. Early mechanisms of *Leishmania* infection in human blood. **Microbes and Infection**, v. 5, n.6, p. 507-13, 2003
- DOS SANTOS, P. L. et al. The severity of visceral leishmaniasis correlates with elevated levels of serum IL-6, IL-27 and sCD14. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 1, 2016.
- DUARTE, M. I. S. et al. TGF-beta and mesenchymal hepatic involvement after visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1129–1136, 2009.
- DUSSEAU, M. et al. Human MAIT cells are xenobiotic resistant, tissue-targeted, CD161^{hi} IL-17 secreting T cells. **Blood**, v. 117, n. 4, p. 1250–1260, 2011.
- EBERHARD, J. M. et al. CD161⁺ MAIT cells are severely reduced in peripheral blood and lymph nodes of HIV-infected individuals independently of disease progression. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.
- ECKLE, S. B. et al. A molecular basis underpinning the T cell receptor heterogeneity of mucosal-associated invariant T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 211, n. 8, p. 1585-600, 2014.
- ENGWERDA, C. R. et al. Neutralization of IL-12 demonstrates the existence of discrete organ-specific phases in the control of *Leishmania donovani*. **European Journal of Immunology**, v. 28, n. 2, p. 669–680, 1998.
- ENGWERDA, C. R. et al. Distinct roles for lymphotoxin-alpha and tumor necrosis factor in the control of *Leishmania donovani* infection. **The American journal of pathology**, v. 165, n. 6, p. 2123–33, 2004.
- ESCH, K. J. et al. Programmed death 1-mediated T cell exhaustion during visceral leishmaniasis impairs phagocyte function. **Journal of Immunology**, v. 191, n 11, p. 5542-50, 2013.
- FALEIRO, R. J. et al. Immune regulation during chronic visceral leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.
- FARIA, D. R. et al. Recruitment of CD8(+) T cells expressing granzyme A is associated

with lesion progression in human cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 432–9, 2009.

FEIJÓ, D. et al. Dendritic cells and *Leishmania* infection: adding layers of complexity to a complex disease. **Journal of Immunology Research**, 3967436, 2016.

FERNANDEZ, C. S. et al. MAIT cells are depleted early but retain functional cytokine expression in HIV infection. **Immunology and cell biology**, v. 93, n. 2, p. 177–88, 2015.

FLANDIN, J. F.; CHANO, F.; DESCOTEAUX, A. RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon- γ -primed macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 36, n. 2, p. 411–420, 2006.

FRADE, A. F. et al. TGFB1 and IL8 gene polymorphisms and susceptibility to visceral leishmaniasis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 11, n. 5, p. 912–916, 2011.

FREEMAN, B.E. et al. Regulation of innate CD8 β T-cell activation mediated by cytokines. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 109, n.25, p. 9971–9976, 2012.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **Journal of immunology**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2001.

GAPIN, L. et al. Where do MAIT cells fit in the family of unconventional T cells? **PLoS Biology**, v. 7, n. 3, p. e70, 2009.

GARDINASSI, L. G. et al. Molecular signatures of neutrophil extracellular traps in human visceral leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v.10, n. 1, p. 285, 2017.

GAUTAM, S. et al. IL-10 neutralization promotes parasite clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 204, n. 7, p. 1134–1137, 2011.

GAUTAM, S. et al. CD8 T cell exhaustion in human visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 209, n. 2, p. 290–9, 2014.

GERMAIN, C. et al. Induction of lectin-like transcript 1 (LLT1) protein cell surface expression by pathogens and interferon-gamma contributes to modulate immune responses. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, p. 37964–37975, (2011) .

GEORGEL, P. et al. The non-conventional MHC class I MR1 molecule controls infection by *Klebsiella pneumoniae* in mice. **Molecular Immunology**, v. 48, n. 5, p. 769-75, 2011.

GHAZARIAN, L.; CAILLAT-ZUCMAN, S.; HOUDOUIN, V. Mucosal-Associated Invariant T Cell interactions with commensal and pathogenic bacteria: potential role in antimicrobial immunity in the child. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1837, 2017.

GHERARDIN, N. A. et al. Diversity of T Cells restricted by the MHC class I-related molecule MR1 facilitates differential antigen recognition. **Immunity**, v. 44, n. 1, p. 32–45, 2016.

GHOSH, K. et al. Successful therapy of visceral leishmaniasis with curdlan involves T-

- helper 17 cytokines. **Journal of Infectious Diseases**, v. 207, n. 6, p. 1016–1025, 2013.
- GODFREY, D. I. et al. NKT cells: Facts, functions and fallacies. **Immunology Today**, v. 21, n. 11, p. 573-83, 2000.
- GODFREY, D. I.; ROSSJOHN, J.; MCCLUSKEY, J. Fighting infection with your MAITs. **Nature Immunology**, v. 11, n. 8, p. 693-5, 2010.
- GOLD, M. C. et al. Human mucosal associated invariant T cells detect bacterially infected cells. **PLoS Biology**, v. 8, n. 6, p. 1–14, 2010.
- GOLD, M. C. et al. Human thymic MR1-restricted MAIT cells are innate pathogen-reactive effectors that adapt following thymic egress. **Mucosal immunology**, v. 6, n. 1, p. 35–44, 2013.
- GOLD, M. C. et al. MR1-restricted MAIT cells display ligand discrimination and pathogen selectivity through distinct T cell receptor usage. **The Journal of experimental medicine**, v. 211, n. 8, p. 1601–10, 2014.
- GOLD M. C.; NAPIER, R. J.; LEWINSOHN, D. M. MR1-restricted mucosal associated invariant T (MAIT) cells in the immune response to *Mycobacterium tuberculosis*. **Immunological Reviews**, v. 264, n. 1, p. 154-66, 2015.
- GOLDFINCH, N. et al. Conservation of mucosal associated invariant T (MAIT) cells and the MR1 restriction element in ruminants, and abundance of MAIT cells in spleen. **Veterinary Research**, v. 41, n. 5, p. 62, 2010.
- GREATHEAD, L. et al. CD8⁺/CD161⁺⁺ mucosal-associated invariant T-cell levels in the colon are restored on long-term antiretroviral therapy and correlate with CD8⁺ T-cell immune activation. **AIDS**, p. 1–3, 2014.
- GRIMALDI, D. et al. Specific MAIT cell behaviour among innate-like T lymphocytes in critically ill patients with severe infections. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 2, p. 192–201, 2014.
- GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.
- GUY, R. A.; BELOSEVIC, M. Comparison of receptors required for entry of *Leishmania major* amastigotes into macrophages. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 4, p. 1553-8, 1993.
- HAILU, A. et al. T cell subset and cytokine profiles in human visceral leishmaniasis during active and asymptomatic or sub-clinical infection with *Leishmania donovani*. **Clinical Immunology**, v. 117, n. 2, p. 182–191, 2005.
- HAVENGA, M. J. et al. Simultaneous detection of NOS-3 protein expression and nitric oxide production using a flow cytometer. **Analytical Biochemistry**, v.290, n.2, p. 283-91, 2001.
- HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 1999.

HOLADAY, B. J. et al. Potential role for interleukin-10 in the immunosuppression associated with kala azar. **Journal of Clinical Investigation**, v. 92, n. 6, p. 2626–2632, 1993.

HOLADAY, B. J. Role of CD8⁺ T cells in endogenous interleukin-10 secretion associated with visceral leishmaniasis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 2, p. 217–220, 2000.

HUANG, S. et al. Evidence for MR1 antigen presentation to mucosal-associated invariant T cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 22, p. 21183–21193, 2005.

HUANG, S. et al. MR1 uses an endocytic pathway to activate mucosal-associated invariant T cells. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 5, p. 1201–1211, 2008.

HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 11, p. 577-88, 2006.

JACOBS, T. et al. Complement C3 is required for the progression of cutaneous lesions and neutrophil attraction in *Leishmania major* infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 194, n. 3, p. 143–149, 2005.

JANSSENS, S.; BEYAERT, R. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. **Clinical Microbiology Reviews**. [S.l: s.n.], 2003

JIANG, J. et al. Mucosal-associated invariant T-cell function is modulated by programmed death-1 signaling in patients with active tuberculosis. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 190, n. 3, p. 329–339, 2014.

JIANG, J. et al. Mucosal-associated invariant T cells from patients with tuberculosis exhibit impaired immune response. **The Journal of Infection**, v. 72, n. 3, p. 338-52, 2016.

JO, J. et al. Toll-Like Receptor 8 Agonist and Bacteria Trigger Potent Activation of Innate Immune Cells in Human Liver. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, p. 1–13, 2014.

JOSHI, T. et al. B7-H1 blockade increases survival of dysfunctional CD8(+) T cells and confers protection against *Leishmania donovani* infections. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 5, e1000431, 2009.

KANE, M.; MOSSER, D. The Role of IL-10 in Promoting Disease Progression in Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 166, p. 1141–1147, 2001.

KARMAKAR, S.; PAUL, J.; DE, T. *Leishmania donovani* glycosphingolipid facilitates antigen presentation by inducing relocation of CD1d into lipid rafts in infected macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 41, n. 5, p. 1376–1387, 2011.

KARMAKAR, S. et al. TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 8, n. 4, p. e1002646, 2012.

KAWACHI, I. et al. MR1-Restricted V alpha 19i Mucosal-Associated Invariant T Cells Rapid and Diverse Cytokine Response 1. **The Journal of Immunology**, v. 176, n. 3, p. 0–9, 2006.

- KAWAI, T.; AKIRA, S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. **Nature Immunology**, v. 11, n. 5, p. 373–384, 2010.
- KAYE, P. M. et al. The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. **Immunological Reviews**, v. 201, p. 239–53, 2004
- KAYE, P. M.; AEBISCHER, T. Visceral leishmaniasis: Immunology and prospects for a vaccine. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1462–70, 2011.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.
- KELLER, A. N. et al. Drugs and drug-like molecules can modulate the function of mucosal-associated invariant T cells. **Nature Immunology**, v. 18, n. 4, p. 402–411, 2017.
- KHANNA, A et al. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses *in vitro* and *in vivo*. **Journal of immunology**, v. 164, n. 3, p. 1346–1354, 2000.
- KHOSHDEL, A et al. Increased levels of IL-10, IL-12, and IFN- γ in patients with visceral leishmaniasis. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 13, n. 1, p. 44–46, 2009.
- KJER-NIELSEN, L. et al. MR1 presents microbial vitamin B metabolites to MAIT cells. **Nature**, v. 491, n. 7426, p. 717–23, 2012.
- KOAY, H.-F. et al. A three-stage intrathymic development pathway for the mucosal-associated invariant T cell lineage. **Nature immunology**, v. 17, n. 11, p. 1300–1311, 2016.
- KROPF, P. et al. Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for Toll-like receptor 4 in the control of parasite replication. **Journal of leukocyte biology**, v. 76, n. 1, p. 48–57, 2004.
- KUMAR, R.; NYLÉN, S. Immunobiology of visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**. v. 3: 251, 2012.
- KUMAR, R. et al. Enhanced expression of Toll-like receptors 2 and 4, but not 9, in spleen tissue from patients with visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 36, n. 12, p. 721–5, 2014.
- KUMARI, S. et al. *Leishmania donovani* skews the CD56(+) Natural Killer T cell response during human visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 73, n. 1, p. 53–60, 2015.
- KURIOKA, A. et al. Shared and Distinct Phenotypes and Functions of Human CD161⁺ V α 7.2⁺ T Cell Subsets. **Frontiers in Immunology**, v. 8, p. 1031, 2017.
- KURKJIAN, K. M. et al. Multiplex analysis of circulating cytokines in the sera of patients with different clinical forms of visceral leishmaniasis. **Cytometry Part A**, v. 69, n. 5, p. 353–358, 2006.
- KWON, Y. et al. Mucosal-associated invariant T cells are numerically and functionally deficient in patients with mycobacterial infection and reflect disease activity. **Tuberculosis**, v. 95, p. 4–11, 2015.

LAGLER, H. et al. Cellular profile of cytokine production in a patient with visceral leishmaniasis: $\gamma\delta^+$ T cells express both type 1 cytokines and interleukin-10. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 57, n. 3, p. 291–295, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes - Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **Trends in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LASKAY, T.; VAN ZANDBERGEN, G.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v. 213, n.3-4, p. 183-91, 2008.

LAUFS, H. et al. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.

LE BOURHIS, L. et al. Antimicrobial activity of mucosal-associated invariant T cells. **Nature immunology**, v. 11, n. 8, p. 701–708, 2010.

LE BOURHIS, L. et al. MAIT Cells detect and efficiently lyse bacterially-infected epithelial cells. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 10, 2013.

LE BOURHIS, L. et al. Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. **Trends in Immunology**, v. 32, n. 5, p. 212-8, 2011.

LEAL, L. M. C. C. et al. Interleukin-4 transgenic mice of resistant background are susceptible to *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 23, n. 2, p. 566–569, 1993.

LEE, O. J. et al. Circulating mucosal-associated invariant T cell levels and their cytokine levels in healthy adults. **Experimental Gerontology**, v. 49, n. 1, p. 47–54, 2014.

LEEANSYAH, E. et al. Activation, exhaustion, and persistent decline of the antimicrobial MR1-restricted MAIT-cell population in chronic HIV-1 infection. **Blood**, v. 121, n. 7, p. 1124–1135, 2013.

LEPORE, M. et al. Parallel T-cell cloning and deep sequencing of human MAIT cells reveal stable oligoclonal TCR β repertoire. **Nature communications**, v. 5, n. May, p. 3866, 2014.

LEPORE, M. et al. Functionally diverse human T cells recognize non-microbial antigens presented by MR1. **eLife**, v. 6, p. e24476, 2017.

LIMA, L. V. D. R. et al. Preclinical diagnosis of American visceral leishmaniasis during early onset of human *Leishmania (L.) infantum* chagasi-infection. **Pathogens and global health**, v. 108, n. 8, p. 381–4, 2014.

LOH, L. et al. Human mucosal-associated invariant T cells contribute to antiviral influenza immunity via IL-18-dependent activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 113, n. 36, p. 10133–8, 2016.

MAGALHÃES, L. M. D. et al. High interleukin 17 expression is correlated with better cardiac function in human Chagas disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 207, n.

4, p. 661–665, 2013.

MAK, J. Y. et al. Stabilizing short-lived Schiff base derivatives of 5-aminouracils that activate mucosal-associated invariant T cells. **Nature Communications**, v. 8, p. 14599, 2017.

MAROOF, A. et al. Posttranscriptional regulation of IL-10 gene expression allows Natural Killer cells to express immunoregulatory function. **Immunity**, v. 29, n. 2, p. 295–305, 2008.

MARTIN, E. et al. Stepwise development of mait cells in mouse and human. **PLoS Biology**, v. 7, n. 3, p. 0525–0536, 2009.

MARY, C. et al. Control of *Leishmania infantum* infection is associated with CD8(+) and gamma interferon- and interleukin-5-producing CD4(+) antigen-specific T cells. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 11, p. 5559–66, 1999.

MCFARLANE, E. et al. Neutrophils contribute to development of a protective immune response during onset of infection with *Leishmania donovani*. **Infection and Immunity**, v. 76, n. 2, p. 532–541, 2008.

MCWILLIAM, H. E. G. et al. The intracellular pathway for the presentation of vitamin B-related antigens by the antigen-presenting molecule MR1. **Nature Immunology**, v. 17, n. October 2015, p. 1–9, 2016.

MCWILLIAM, H. E. G.; VILLADANGOS, J. A. How MR1 presents a pathogen metabolic signature to Mucosal-Associated Invariant T (MAIT) cells. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 9, p. 679–689, 2017.

MEDINA-COLORADO; A. A. et al. Splenic CD4⁺ T cells in progressive visceral leishmaniasis show a mixed effector-regulatory phenotype and impair macrophage effector function through inhibitory receptor expression. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0169496, 2017.

MEERMEIER, E. W. et al. Human TRAV1-2-negative MR1-restricted T cells detect *S. pyogenes* and alternatives to MAIT riboflavin-based antigens. **Nature Communications**, v. 7, p. 12506, 2016.

MEIEROVICS, A.; YANKELEVICH, W. J.; COWLEY, S. C. MAIT cells are critical for optimal mucosal immune responses during *in vivo* pulmonary bacterial infection. **Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America**, v. 110, n. 33, p. 3119–28, 2013.

MEIEROVICS, A. I.; COWLEY, S. C. MAIT cells promote inflammatory monocyte differentiation into dendritic cells during pulmonary intracellular infection. **Journal of Experimental Medicine**, p. 2793–2809, 2016.

MELO, F. A. et al. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 90, n. 5, p. 538–48, 2009.

DE MENEZES, J. P.; SARAIVA, E. M.; ROCHA-AZEVEDO, B.. The site of the bite: *Leishmania* interaction with macrophages, neutrophils and the extracellular matrix in the dermis. **Parasites & vectors**, p. 1–8, 2016.

- MENON, S. S. et al. Decentralized control of human visceral leishmaniasis in endemic urban areas of Brazil: a literature review. **Tropical medicine and health**, v. 44, p. 9, 2016.
- METELITSA, L. S. et al. Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells. **Journal of immunology**, v. 167, n. 6, p. 3114–3122, 2001.
- MOLL, H. Dendritic cells and host resistance to infection. **Cellular Microbiology**, v. 5, n. 8, p. 493-500, 2003.
- MOORE, K. W. et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683–765, 2001.
- MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. **Journal of immunology**, v. 135, n. 4, p. 2785–2789, 1985.
- MOSSER, D. M.; HANDMAN, E. Treatment of murine macrophages with interferon-gamma inhibits their ability to bind *Leishmania* promastigotes. **Journal of leukocyte biology**, v. 52, n. 4, p. 369–376, 1992.
- MOSSER, D. M.; ROSENTHAL, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. **Seminars in Cell Biology**, v. 4, n. 5, p. 315–322, 1993.
- MOSSER, D. M.; SPRINGER, T. A.; DIAMOND, M. S. *Leishmania* promastigotes require opsonic complement to bind to the human leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). **Journal of Cell Biology**, v. 116, n. 2, p. 511–520, 1992.
- MPINA, M. et al. Controlled human malaria infection leads to long-lasting changes in innate and innate-like lymphocyte populations. **Journal of Immunology**, v. 199, n. 1, p. 107-118, 2017.
- MS. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Visceral**. Brasília, DF. 2006.
- MULLER, K. et al. Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 190, n. 1–2, p. 73–76, 2001.
- MURPHY, M. L. et al. IL-10 mediates susceptibility to *Leishmania donovani* infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 10, p. 2848–2856, 2001.
- MURRAY, H. W. et al. Acquired resistance and granuloma formation in experimental visceral leishmaniasis. Differential T cell and lymphokine roles in initial *versus* established immunity. **Journal of immunology**, v. 148, n. 6, p. 1858–1863, 1992.
- MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 4, p. 741–6, 1999.
- MURRAY, H. W. et al. Visceral Leishmaniasis in mice devoid of tumor necrosis factor

- and response to treatment. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 11, p. 6289–6293, 2000.
- MURRAY H. W. Tissue granuloma structure-function in experimental visceral leishmaniasis. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 82, n. 5, p. 249–67, 2001.
- MURRAY, H. W. et al. Determinants of response to interleukin-10 receptor blockade immunotherapy in experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 188, n. 3, p. 458–464, 2003.
- MURRAY, H. W. et al. Gamma interferon-regulated chemokines in *Leishmania donovani* infection in the liver. **Infection and Immunity**, v. 85, n. 1, p. e00824-16, 2016.
- MUTTIAH, B. et al. Peripheral loss of CD8⁺ CD161⁺⁺ TCRV α 7.2⁺ MAIT cells in chronic HCV-infected patients. **European Journal of Clinical Investigation**, v. 161, n. 2, 2015.
- NANDAN, D. et al. Myeloid cell IL-10 production in response to *Leishmania* involves inactivation of glycogen synthase kinase-3 downstream of phosphatidylinositol-3 kinase. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 1, p. 367–378, 2012.
- NASCIMENTO, M. S. L. et al. Interleukin 17A acts synergistically with interferon γ to promote protection against *Leishmania infantum* infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 6, p. 1015–1026, 2015.
- NICOLAS, L. et al. *Leishmania major* reaches distant cutaneous sites where it persists transiently while persisting durably in the primary dermal site and its draining lymph node: a study with laboratory mice. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 12, p. 6561-6, 2000.
- NICOLAS, L. et al. Real-time PCR for detection and quantitation of *Leishmania* in mouse tissues. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 40, n. 5, p. 1666-9, 2002.
- NOVAK, J. et al. The decrease in number and change in phenotype of Mucosal-Associated Invariant T cells in the elderly and differences in men and women of reproductive age. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 80, n. 4, p. 271–275, 2014.
- NYLEN, S.; SACKS, D. Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. **Trends in Immunology**, v. 28, n. 9, p. 378–384, 2007.
- NYLEN, S. et al. Splenic accumulation of IL-10 mRNA in T cells distinct from CD4⁺CD25⁺ (Foxp3) regulatory T cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 805–817, 2007.
- OLIVEIRA, F.; DE CARVALHO, A. M.; DE OLIVEIRA, C. I. Sand-fly saliva-*Leishmania*-man: The trigger trio. **Frontiers in Immunology**, v.19, n. 4, p. 375, 2013
- OLIVEIRA, S. H. P. et al. Microbicidal activity of eosinophils is associated with activation of the arginine-NO pathway. **Parasite Immunology**, v. 20, n. 9, p. 405–412, 1998.
- OLIVEIRA, S. H. P. et al. Nitric oxide Mediates the microbicidal activity of eosinophils. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 92 SUPPL., p. 233–235, 1997.
- OWENS, B. M. J. et al. IL-10-producing Th1 cells and disease progression are regulated by distinct CD11c⁺ cell populations during visceral leishmaniasis. **PLoS Pathogens**, v. 8,

n. 7, p. 20, 2012.

PANDEY, R. K.; SUNDAR, S.; PRAJAPATI, V. K. Differential expression of miRNA regulates T cell differentiation and plasticity during visceral leishmaniasis infection. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 206, 2016.

PATEL, O. et al. Recognition of vitamin B metabolites by mucosal-associated invariant T cells. **Nature communications**, v. 4, n. May, p. 2142, 2013.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Immune response in human visceral leishmaniasis: analysis of the correlation between innate immunity cytokine profile and disease outcome. **Scandinavian journal of immunology**, v. 62, n. 5, p. 487–495, 2005.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V. et al. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α ⁺ monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 146, n. 1, p. 124–132, 2006.

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

POLLEY, R. et al. Adoptive immunotherapy against experimental visceral leishmaniasis with CD8⁺ T cells requires the presence of cognate antigen. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 1, p. 773–6, 2006.

POTESTIO, M. et al. CD4⁺ CCR5⁺ and CD4⁺ CCR3⁺ lymphocyte subset and monocyte apoptosis in patients with acute visceral leishmaniasis. **Immunology**, v. 113, n. 2, p. 260–268, 2004.

POWRIE, F. et al. Regulatory interactions between CD45RB^{high} and CD45RB^{low} CD4⁺ T cells are important for the balance between protective and pathogenic cell-mediated immunity. **The Journal of experimental medicine**, v. 179, n. 2, p. 589–600, 1994.

RAHIMPOUR, A. et al. Identification of phenotypically and functionally heterogeneous mouse mucosal-associated invariant T cells using MR1 tetramers. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 212, n. 7, p. 1095-108, 2015.

RAI, A. K. et al. Early activated Th-1 type and dominantly diverse natural killer T (CD3⁺CD161⁺V α 24⁻) cells in bone marrow among visceral leishmaniasis patients. **International Journal for Parasitology**, v. 41, n. 10, p. 1069–1077, 2011.

RAMOS, P. K. et al. Serum cytokine responses over the entire clinical-immunological spectrum of human *Leishmania (L.) infantum chagasi* infection. **BioMed Research International**, p. 6937980, 2016.

RAZIUDDIN, S. et al. Gamma delta T cells and the immune response in visceral leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 22, n. 5, p. 1143–1148, 1992.

RAZIUDDIN, S. et al. Immunoregulatory and proinflammatory cytokine production in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 170, n. 4, p. 1037–1040, 1994.

- READY, P. D. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **The Annual Review of Entomology**, v. 58, p. 227–250, 2013.
- REANTRAGOON, R. et al. Antigen-loaded MR1 tetramers define T cell receptor heterogeneity in mucosal-associated invariant T cells. **The Journal of experimental medicine**, v. 210, n. 11, p. 2305–20, 2013.
- REANTRAGOON, R. et al. Structural insight into MR1-mediated recognition of the mucosal associated invariant T cell receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 209, n. 4, p. 761–74, 2012.
- REINER, S. L.; LOCKSLEY, R. M. Cytokines in the differentiation of Th1/Th2 CD4+ subsets in leishmaniasis. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.53, n.4, p. 323–8, 1993.
- REIS E SOUSA, C. Activation of dendritic cells: Translating innate into adaptive immunity. **Current Opinion in Immunology**, v. 16, n.1, p.21-5, 2004.
- RESENDE, M. et al. *Leishmania*-infected MHC Class II high dendritic cells polarize CD4⁺ T cells toward a nonprotective T-bet⁺ IFN- γ ⁺ IL-10⁺ phenotype. **Journal of immunology**, v. 191, n. 1, p. 262–73, 2013.
- ROBERT-GANGNEUX, F. et al. Invariant NKT cells drive hepatic cytokinic microenvironment favoring efficient granuloma formation and early control of *Leishmania donovani* infection. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.
- ROGERS, M. et al. Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, 2009.
- ROLÃO, N. et al. *Leishmania infantum*: mixed T-helper-1/T-helper-2 immune response in experimentally infected BALB/c mice. **Experimental Parasitology**, v. 115, n. 3, p. 270-6, 2007.
- ROSEN, D.B. et al. Cutting edge: lectin-like transcript-1 is a ligand for the inhibitory human NKR-P1A receptor. **Journal of Immunology**, v. 175, n.12, p. 7796–7799, 2005.
- ROSSJOHN, J. et al. Recognition of CD1d-restricted antigens by natural killer T cells. **Nature Reviews. Immunology**, v. 12, n. 12, p. 845-57, 2012.
- RUSSO, D. M. et al. Antigen-reactive gamma delta T cells in human leishmaniasis. **Journal of immunology**, v. 151, n. 7, p. 3712–8, 1993.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–858, 2002.
- SALIO, M. et al. Activation of human Mucosal-Associated Invariant T cells induces CD40L-dependent maturation of monocyte-derived and primary dendritic cells. **Journal of Immunology**, v.199, n.8, p. 2631-2638, 2017.
- SANABRIA, M. X. H. et al. Role of natural killer cells in modulating dendritic cell responses to *Leishmania amazonensis* infection. **Infection and immunity**, v. 76, n. 11, p. 5100–9, 2008.

SANTOS, C. da S. et al. CD8(+) granzyme B(+)-mediated tissue injury vs. CD4(+)IFN γ (+)-mediated parasite killing in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 133, n. 6, p. 1533–40, 2013.

SATO, N. et al. CC chemokine receptor (CCR)2 is required for langerhans cell migration and localization of T helper cell type 1 (Th1)-inducing dendritic cells. Absence of CCR2 shifts the *Leishmania major*-resistant phenotype to a susceptible state dominated by Th2 cytokin. **The Journal of experimental medicine**, v. 192, n. 2, p. 205–218, 2000.

SATOSKAR, A R. et al. Mice lacking NK cells develop an efficient Th1 response and control cutaneous *Leishmania major* infection. **Journal of immunology**, v. 162, p. 6747–6754, 1999.

SATTLER, A. et al. IL-15 dependent induction of IL-18 secretion as a feedback mechanism controlling human MAIT-cell effector functions. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 8, p. 2286–2298, 2015.

SCHACHNIK, N. C. et al. Intracellular nitric oxide assessment in whole blood leukocytes by flow cytometry: optimization and applicability to monitor patients with chronic graft nephropathy. **Journal of Immunological Methods**, v. 343, n. 2, p. 103-11, 2009.

SCHARTON, T. M.; SCOTT, P. Natural killer cells are a source of interferon gamma that drives differentiation of CD4⁺ T cell subsets and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 178, n. 2, p. 567–577, 1993.

SCHAUT, R. G. et al. Regulatory IgD^{hi} B cells suppress T cell function via IL-10 and PD-L1 during progressive visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 196, n. 10, p. 4100-9, 2016.

SCHLEICHER U. et al. NK cell activation in visceral leishmaniasis requires TLR9, myeloid DCs, and IL-12, but is independent of plasmacytoid DCs. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 204, n. 4, p. 893–906, 2007.

SHARMA, S. et al. A subset of neutrophils expressing markers of antigen-presenting cells in human visceral leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 214, n. 10, p. 1531-1538, 2016.

SHARMA, S. et al. The phenotype of circulating neutrophils during visceral leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 3, p. 767-770, 2017.

SHEEL, M. et al. IL-17A-producing $\gamma\delta$ T cells suppress early control of parasite growth by monocytes in the liver. **Journal of Immunology**, v. 195, n. 12, p. 5707-17, 2015.

SHIMAMURA, M. et al. Localization of NK1.1(+) invariant V α 19 TCR(+) cells in the liver with potential to promptly respond to TCR stimulation. **Immunology Letters**, v. 121, n. 1, p. 38-44, 2008.

SHIMAMURA, M. et al. Altered production of immunoregulatory cytokines by invariant V α 19 TCR-bearing cells dependent on the duration and intensity of TCR engagement. **International Immunology**, v. 21, n. 2, p. 179–185, 2009.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.

31, n. 8, p. 423-31, 2009.

SIMON, R.; SAMUEL, C. E. Innate interferon response in macrophage and epithelial cells infected with wild-type compared to DNA adenine methylase and flagellin mutant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Journal of interferon & cytokine research: the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research**, v. 27, n. 4, p. 317–27, 2007.

SINGH, N.; SUNDAR, S. Inflammatory chemokines and their receptors in human visceral leishmaniasis: Gene expression profile in peripheral blood, splenic cellular sources and their impact on trafficking of inflammatory cells. **Molecular Immunology**, v. 85, p. 111-119, 2017.

SLAUENWHITE, D.; JOHNSTON, B. Regulation of NKT cell localization in homeostasis and infection. **Frontiers in Immunology**. V. 6: 255, 2015.

SMELT, S. C. et al. Destruction of follicular dendritic cells during chronic visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 158, n. 8, p. 3813-21, 1997.

SMELT, S. C. et al. B Cell-deficient mice are highly resistant to *Leishmania donovani* infection, but develop neutrophil-mediated tissue pathology. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 7, p. 3681–3688, 2000.

SMITH, L. E.; RODRIGUES, M.; RUSSELL, D. G. The interaction between CD8⁺ cytotoxic T cells and *Leishmania*-infected macrophages. **The Journal of experimental medicine**, v. 174, n. 3, p. 499–505, 1991.

SQUIRES, K. E. et al. Experimental visceral leishmaniasis: role of endogenous IFN-gamma in host defense and tissue granulomatous response. **Journal of immunology**, v. 143, n. 12, p. 4244–9, 1989.

STRIJDOM, H.; MULLER, C.; LOCHNER, A.. Direct intracellular nitric oxide detection in isolated adult cardiomyocytes: flow cytometric analysis using the fluorescent probe, diaminofluorescein. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.37, n. 4, p. 897-902, 2004.

SUNDERKÖTTER, C. et al. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **Journal of immunology**, v. 151, n. 9, p. 4891–901, 1993.

TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern recognition receptors and inflammation. **Cell**, v. 140, n. 6, p. 805–820, 2010.

TANG, X. Z. et al. IL-7 licenses activation of human liver intrasinusoidal mucosal-associated invariant T cells. **Journal of Immunology**, v. 190, n. 7, p. 3142-52, 2013.

TÁVORA, L. G. F.; NOGUEIRA, M. B.; GOMES, S. T. Visceral leishmaniasis/HIV co-infection in northeast Brazil: Evaluation of outcome. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 19, n. 6, p. 651–656, 2015.

TEIXEIRA, C. R. et al. Saliva from *Lutzomyia longipalpis* induces CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 expression and macrophage recruitment. **Journal of immunology**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 2005.

TEIXEIRA, M. J. et al. Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 1, p. 32-40, 2006.

THALHOFER, C. J. et al. Leukocytes infiltrate the skin and draining lymph nodes in response to the protozoan *leishmania infantum chagasi*. **Infection and Immunity**, v. 79, n. 1, p. 108–117, 2011.

TILLOY, F. et al. An invariant T cell receptor alpha chain defines a novel TAP-independent major histocompatibility complex class Ib-restricted alpha/beta T cell subpopulation in mammals. **The Journal of experimental medicine**, v. 189, n. 12, p. 1907–21, 1999.

TREINER, E. et al. Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. **Nature**, v. 422, n. 6928, p. 164–9, 2003.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. CD8⁺ T cells with parasite-specific cytotoxic activity and a Tc1 profile of cytokine and chemokine secretion develop in experimental visceral leishmaniasis. **Parasite immunology**, v. 25, n. 11–12, p. 569–579, 2003.

TSAGOZIS, P.; KARAGOUNI, E.; DOTSIKA, E. Function of CD8⁺ T lymphocytes in a self-curing mouse model of visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 139–146, 2005.

TSUJI, M. Glycolipids and phospholipids as natural CD1d-binding NKT cell ligands. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 16, p. 1889-98, 2006.

TUMANG, M. C. T. *et al.* Role and effect of Tnf-Alpha in experimental visceral leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 153, n. 2, p. 768–775, 1994.

USSHER, J. E. et al. Molecular analyses define Vα7.2-Jα33⁺ MAIT cell depletion in HIV infection: a case-control study. **Medicine**, v. 94, n. 29, p. e1134, 2015.

VAN DER POLL, T.; ZIJLSTRA, E. E.; MEVISSSEN, M. Interleukin 6 during active visceral leishmaniasis and after treatment. **Clinical Immunology and Immunopathology**, v. 77, n. 1, p. 111–114, 1995.

VANTOUROUT, P.; HAYDAY, A. Six-of-the-best: unique contributions of γδ T cells to immunology. **Nature Reviews. Immunology**, v. 13, n. 2, p. 88-100, 2013.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 8, p. 4177–4184, 2002.

VON STEBUT, E. Cutaneous Leishmania infection: Progress in pathogenesis research and experimental therapy. **Experimental Dermatology**, v. 16, n. 4, p. 340–346, 2007.

VOULDOUKIS, I. et al. Interleukin-10 and interleukin-4 inhibit intracellular killing of *Leishmania infantum* and *Leishmania major* by human macrophages by decreasing nitric oxide generation. **European Journal of Immunology**, v. 27, n. 4, p. 860–865, 1997.

WAKIL, A E. et al. Interferon gamma derived from CD4(+) T cells is sufficient to

mediate T helper cell type 1 development. **The Journal of experimental medicine**, v. 188, n. 9, p. 1651–1656, 1998.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acessado em 25 de outubro de 2018.

WONG, E. B. et al. Low levels of peripheral CD161⁺⁺CD8⁺ Mucosal Associated Invariant T (MAIT) cells are found in HIV and HIV/TB co-infection. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

WU, J. et al. IL-10 inhibits the synthesis of migration inhibitory factor and migration inhibitory factor-mediated macrophage activation. **Journal of immunology**, v. 151, n. 8, p. 4325–32, 1993.

XIN, L. et al. Type I IFN receptor regulates neutrophil functions and innate immunity to *Leishmania* parasites. **Journal of immunology**, v. 184, n. 12, p. 7047–56, 2010.

YONG, Y. K. et al. Decrease of CD69 levels on TCR V α 7.2⁺CD4⁺ innate-like lymphocytes is associated with impaired cytotoxic functions in chronic hepatitis B virus-infected patients. **Innate Immunity**, v. 23, n. 5, p. 459-467, 2017.

YONG, Y. K. et al. Hyper-expression of PD-1 is associated with the levels of exhausted and dysfunctional phenotypes of circulating CD161⁺⁺TCR iV α 7.2⁺ Mucosal-Associated Invariant T cells in chronic hepatitis B virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 472, 2018.

ZAJONC, D. M.; GIRARDI, E. Recognition of microbial glycolipids by Natural Killer T cells. **Frontiers in Immunology**, v. 6: 400, 2015.