



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daniel Augusto Gonçalves Tavares

Estudo da supressão *bystander* na infecção experimental por *Leishmania amazonensis* em animais geneticamente selecionados para tolerância oral: estabelecimento de protocolos para utilização em leishmaniose.

Rio de Janeiro

2009

Daniel Augusto Gonçalves Tavares

**Estudo da supressão *bystander* na infecção experimental por *Leishmania amazonensis*
em animais geneticamente selecionados para tolerância oral: estabelecimento de
protocolos para utilização em leishmaniose.**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos da Silva

Rio de Janeiro

2009

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

T231 Tavares, Daniel Augusto Gonçalves.
Estudo da supressão *bystander* na infecção experimental por *Leishmania amazonensis* em animais geneticamente selecionados para tolerância oral: estabelecimento de protocolos para utilização em leishmaniose. - 2009
80 f.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Carlos da Silva

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro,
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em
Biociências.

1. Leishmaniose – Teses. 2. Leishmaniose – Imunologia. 3. Seleção genética. 4. Tolerância imunológica – Genética. I. Silva, Antonio Carlos da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III Título.

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daniel Augusto Gonçalves Tavares

Estudo da supressão *bystander* na infecção experimental por *Leishmania amazonensis* em animais geneticamente selecionados para tolerância oral: estabelecimento de protocolos para utilização em leishmaniose.

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 26 de junho de 2009.

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Antonio Carlos da Silva (Orientador)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr^a. Maria de Fátima Sarro da Silva
Universidade Estadual da Zona Oeste - UEZO

Prof. Dr. Osvaldo Augusto Brazil Esteves Sant' Anna
Instituto Butantan

Prof. Dr. Maurício Afonso Verícimo
Universidade Federal Fluminense - UFF

Prof. Dr. Luís Cristóvão de Moraes Sobrinho Pôrto
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2009

RESUMO

TAVARES, Daniel. *Estudo da supressão bystander na infecção experimental por Leishmania amazonensis em animais geneticamente selecionados para tolerância oral: estabelecimento de protocolos para utilização em leishmaniose..* 2009. 80 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

A Tolerância Oral (OT) é um método de indução de supressão imunológica periférica e tem sido considerada como uma estratégia terapêutica para doenças inflamatórias auto-imunes. Recentes resultados (Tavares *et al* 2006) com linhagens de camundongos selecionadas para fenótipos extremos de susceptibilidade (camundongos TS) e resistência (camundongos TR) à tolerância oral, mostraram diferenças no desenvolvimento da lesão e carga parasitária após a infecção por *Leishmania amazonensis*. A supressão *bystander* pela tolerância oral foi inicialmente descrita como um mecanismo em que células T regulatórias desencadeadas por um antígeno-específico ingerido, são capazes de suprimir a resposta a um antígeno-não-específico, quando este é administrado concomitantemente ao antígeno-específico. As linhagens TR e TS foram utilizadas para o desenvolvimento de protocolos de supressão *bystander*, com o objetivo de inibir a resposta inflamatória induzida pela infecção por *L. amazonensis*. Os camundongos receberam 1, 2, 5 ou 25 mg de OVA intragástrica (IG) durante dois dias consecutivos, e uma semana depois foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. amazonensis* e desafiados com 50 µg OVA solúvel no mesmo sítio. Em outro protocolo, camundongos foram tratados com OVA IG e desafiados uma semana após com este mesmo antígeno seguido de antígeno de leishmania em CFA no mesmo sítio *bystander*. Na semana seguinte foram infectados na pata oposta. Camundongos TR tolerizados com 25 mg de OVA desenvolveram lesão inflamatória exacerbada, quando comparados com o grupo controle, enquanto os animais tolerizados com 1, 2 ou 5 mg de OVA desenvolveram uma lesão menor. O efeito *bystander* não modificou a carga parasitária. Independentemente do protocolo utilizado, os camundongos TS desenvolveram uma lesão menor. As citocinas IFN- γ e IL-10 foram aumentadas em animais infectados de ambas as linhagens em comparação com animais não infectados. Nos grupos TR submetidos a baixa dose de OVA IG *bystander* (1, 2 e 5 mg) observamos diminuição de IFN- γ e o aumento de IL-10 sugerindo mudança para um perfil regulatório condizente com a diminuição da lesão inflamatória nestes grupos. Nos grupos TS tolerizados observamos redução de IFN- γ e aumento de IL-10, embora permaneçam mais altos que nos TR, independente da dose oral a que foram submetidos. O efeito *bystander*, com doses baixas ou altas, não alterou a carga parasitária mostrando a dissociação desta com a modulação da patogenia. Os níveis de IFN- γ não se mostraram associados a redução da carga parasitária em TR e TS, já que na linhagem TS observou-se alta carga parasitária apesar do alto nível de IFN- γ enquanto que a linhagem TR apresentou menor nível de IFN- γ e baixa carga parasitária. A linhagem TS apresentou intrinsecamente uma proporção maior de células Treg (CD25+Foxp3+) que a linhagem TR, mas animais de ambas as linhagens atingiram a mesma proporção de células Treg após infectados com *L. amazonensis*. Uma compreensão melhor dos mecanismos regulatórios da imunidade inata e adaptativa nas fases iniciais da infecção é necessária para o desenvolvimento de protocolos capazes de limitar a inflamação e promover a eliminação dos parasitas.

Palavras-chave: Seleção Genética; Tolerância Oral; *Leishmania amazonensis*; Supressão *Bystander*; Ativação *Bystander*; Camundongo.

ABSTRACT

Oral tolerance (OT) is an induction of peripheral immune suppression and has been considered as a therapeutic strategy for inflammatory autoimmune diseases. Recent results (Tavares *et al* 2006) with strains of mice selected for extreme phenotypes of susceptibility (TS mice) and resistance (TR mice) to oral tolerance, showed differences in lesion development and parasite load after infection with *Leishmania amazonensis*. The *bystander* suppression by oral tolerance was initially described as a mechanism in which regulatory T cells triggered by an antigen-specific ingested, are capable of suppressing the response to an antigen-nonspecific, when given concurrently with antigen-specific. The TR and TS strains were used for the development of *bystander* suppression protocols in order to inhibit the inflammatory response induced by infection with *L. amazonensis*. The mice received 1, 2, 5 or 25 mg of OVA intragastrically (IG) for two consecutive days and a week later 107 were infected with promastigotes of *L. amazonensis* and challenged with 50 mg soluble OVA in the same place. In another protocol, mice were treated IG with OVA and challenged one week later with the same antigen followed by leishmania antigen in CFA in the same "*bystander* place". The following week were infected in the opposite foot. TR mice immunized with 25 mg OVA developed exaggerated inflammatory lesions when compared with the control group, while animals immunized with 1, 2 or 5 mg OVA developed a minor injury. The effect of *bystander* did not alter the parasite load. Regardless of the protocol used, the TS mice developed a minor injury. The cytokines IFN- γ and IL-10 were increased in animals infected with both strains compared to uninfected animals. In the TR mice underwent IG OVA low-dose *bystander* (1, 2 and 5 mg) observed reduction of IFN- γ and increased IL-10 suggesting a shift to regulatory status consistent with the reduction of inflammatory lesions in these groups. In immunized TS mice, observed a reduction of IFN- γ and increased IL-10, although they remain higher than in TR, regardless of the oral dose to which they were submitted. The *bystander* effect with low or high doses did not alter the parasite burden. The levels of IFN- γ were not associated with the reduction of parasite burden in TR and TS, since TS in the line there was a high parasite load despite high levels of IFN- γ while TR strain showed a lower level of IFN- γ and low parasite load. The TS strain had an inherently higher proportion of Treg cells (CD25 + Foxp3 +) than the strain TR, but animals of both strains reached the same proportion of Treg cells after infection with *L. amazonensis*. A better understanding of the regulatory mechanisms of innate and adaptive immunity in the early stages of infection is necessary for the development of protocols that may limit inflammation and promote the elimination of parasites.

Keywords: Palavras-chave: Genetic Selection; Oral Tolerance; *Leishmania amazonensis*; *Bystander* Suppression; *Bystander* Activation; Mice.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenvolvimento da Lesão EM Camundongos TR e TS infectados.....	35
Figura 2 – Carga Parasitária de Camundongos TR e TS infectados.....	36
Figura 3 – Proliferação Celular <i>in vitro</i> e Níveis de Citocinas em TR e TS normais e infectados.....	37
Figura 4 – Frequência de Células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3+ em animais normais e infectados.....	38
Figura 5 – Imunização Oral e Subcutânea com antígeno Bruto de Promastigotas.....	39
Figura 6 – Efeito <i>bystander</i> com OVA Solúvel e Antígeno Bruto de Promastigotas.....	40
Figura 7 – Efeito de OVA solúvel e <i>Leishmania</i> viável no sítio <i>bystander</i> após duas doses altas orais consecutivas de OVA.....	41
Figura 8 – Efeito de OVA solúvel e <i>Leishmania</i> viável no sítio <i>bystander</i> após duas doses orais consecutivas de diferentes concentrações de OVA.....	43
Figura 9 – Comparação entre os Protocolos para indução de Efeito <i>bystander</i> com Antígeno Bruto de Promastigotas ou Promastigotas viáveis em uma mesma Experiência.....	44
Figura 10 – Carga Parasitária nos Camundongos TS e TR Submetidos ao Efeito <i>Bystander</i>	45
Figura 11 – Proliferação <i>in vitro</i> de Células T Obtidas de Animais TR e TS submetidos a Tratamento <i>Bystander</i> Após Ingestão de Baixas e Alta Dose de OVA.....	46
Figura 12 – Quantificação de IFN- γ e IL-10 em TS e TR Infectados e Submetidos a Diferentes Doses Oraís <i>bystander</i> de OVA.....	48
Figura 13 – Frequência de células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3+ em TS e TR infectados e submetidos a diferentes doses oraís <i>bystander</i> de OVA.....	49
Figura 14 - Efetividade da Inibição da Lesão Inflamatória Induzida por Supressão <i>Bystander</i> com Baixas Doses Oraís de OVA.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ag –	Antígeno
APC –	Célula Apresentadora de Antígeno
CD –	Grupamento de Diferenciação (" <i>cluster of differentiation</i> ")
CFA –	Adjuvante Completo de Freund
DC –	Célula Dendrítica
EDTA –	Sal di-sódico do ácido etilenodiaminotetracético
FACS –	Citômetro de Fluxo (" <i>Fluorescence-Activated Cell Sorter</i> ")
FITC –	Isotiocianato de fluoresceína
IFN –	Interferon
Ig –	Imunoglobulina
IG –	Intra-Gástrica
IL –	Interleucina
iNOS –	Óxido Nítrico Sintase Induzível
Leish –	Leishmania
LPS –	Lipopolissacarídeo
MHC –	Complexo Principal de Histocompatibilidade
NO –	Óxido Nítrico
OVA –	Ovalbumina
PBS –	Tampão salina fosfato
PE –	Ficoeritrina
PTN –	Proteína
SFB –	Soro Fetal Bovino
TGF –	Fator de Transformação de Crescimento

- Th1 – Células T auxiliaadoras (“*helper*”) CD4+ produtoras de citocinas do tipo Th1
- Th2 – Células T auxiliaadoras (“*helper*”) CD4+ produtoras de citocinas do tipo Th2
- TNF – Fator de Necrose Tumoral
- TO – Tolerância Oral
- Tr – Células T regulatórias naturais
- TR – Linhagem Resistente à Tolerância Oral
- Treg – Células T regulatórias Naturais
- TS – Linhagem Sensível à Tolerância Oral

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	11
1	REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1	Leishmaniose	11
1.2	Modelos animais utilizados em estudos de infecções	12
1.3	Resposta imunológica associada à infecção experimental com <i>Leishmania amazonensis</i>	13
1.4	O Paradigma (Th1 x Th2) x Th17	15
1.5	Células regulatórias	18
1.5.1	<u>O relacionamento entre células regulatórias CD4+ CD25+ e as demais células regulatórias</u>	20
1.5.2	<u>Participação das células regulatórias na infecção com leishmania</u>	20
1.6	Tolerância oral e Supressão <i>Bystander</i>	21
1.6.1	<u>Supressão <i>Bystander</i></u>	22
1.7	Estudos com Linhagens Obtidas por Seleção Genética Bidirecional	24
1.7.1	<u>Vantagens no Uso de Linhagens Seleccionadas</u>	25
1.7.2	<u>Seleção Genética de Linhagens de Camundongos para Tolerância Oral</u>	26
1.7.3	<u>Estudo de Diferentes Características Imunológicas nas Linhagens Seleccionadas para Tolerância Oral</u>	27
2	OBJETIVOS	29
3	MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1	Animais	30
3.2	Protozoários e condições de crescimento	30
3.3	Preparação de antígenos de leishmania	31
3.4	Infecção	31
3.5	Supressão/ativação <i>bystander</i>	31
3.6	Quantificação da carga parasitária	32
3.7	Preparo de células de linfonodo	32
3.8	Dosagem de citocinas	33
3.9	Análise por citometria de fluxo	33
3.10	Análise estatística	34
4	RESULTADOS	35

4.1	Análise comparativa da lesão inflamatória e carga parasitária de camundongos TR e TS infectados.....	35
4.2	Proliferação celular <i>in vitro</i> e níveis de citocinas em TR e TS normais e infectados.....	36
4.3	Frequência de células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3+ em animais normais e infectados.....	38
4.4	Imunização oral e subcutânea com antígeno bruto de promastigotas.....	38
4.5	Efeito <i>bystander</i> com OVA solúvel e antígeno bruto de promastigotas.....	39
4.6	Efeito <i>bystander</i> com OVA solúvel e promastigotas viáveis.....	41
4.7	Comparação entre os protocolos para indução de efeito <i>bystander</i> com antígeno bruto de promastigotas ou promastigotas viáveis em uma mesma experiência.....	44
4.8	Carga parasitária nos camundongos TS e TR submetidos ao efeito <i>bystander</i>.....	45
4.9	Proliferação <i>in vitro</i> de células T obtidas de animais TR e TS submetidos a tratamento <i>bystander</i> após ingestão de baixas e alta dose de OVA.....	45
4.10	Quantificação de IFN-γ e IL-10 em TS e TR infectados e submetidos a diferentes doses orais <i>bystander</i> de OVA.....	47
4.11	Frequência de células T reguladora CD4+CD25+Foxp3+ de linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos TS e TR infectados e não infectados.....	49
4.12	Efetividade da inibição da lesão inflamatória induzida por supressão <i>bystander</i> com baixas doses orais de OVA.....	50
5	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÃO.....	59
	REFERÊNCIAS.....	60
	APÊNDICE – Artigo - Tavares D, Ribeiro RC, da Silva AC. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in <i>Leishmania amazonensis</i> infected mice genetically selected according to oral tolerance phenotypes, Microbes and Infection. 2006; 957-964.....	72

INTRODUÇÃO

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmaniose

As leishmanioses compreendem um grupo de doenças parasitárias amplamente distribuídas na América Latina acometendo também países do Velho Mundo (González *et al*, 2009, WHO/CSR/EDC-UNAIDS 2003). A organização Mundial de Saúde (OMS/WHO) estima que a incidência anual de leishmaniose pode variar entre 1,5 a 2 milhões de casos novos/ano, sendo a grande maioria decorrente de acometimento tegumentar da doença (WHO 2007).

A leishmaniose tegumentar americana é uma doença causada por protozoários parasitos que se incluem na ordem Kinetoplastida, na família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania* Ross (1903).

Seu ciclo biológico é realizado em dois hospedeiros, um vertebrado e um invertebrado. Os hospedeiros vertebrados incluem grande variedade de mamíferos: roedores, endentados, marsupiais, canídeos e primatas, incluindo o homem. Os hospedeiros invertebrados são pequenos insetos da ordem Díptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae.

No início da infecção, as formas promastigotas são inoculadas na derme durante o repasto sangüíneo do flebotomíneo. As células destruídas pela probóscida do inseto e a saliva inoculada atraem para a área células fagocitárias mononucleares, os macrófagos e outras células do sistema mononuclear fagocitário da pele. Certos macrófagos são capazes de destruir os parasitos diretamente, enquanto outros necessitam ser estimulados. Somente histiócitos não estimulados são hábeis para o estabelecimento da infecção. Ao serem fagocitadas, as promastigotas transformam-se em amastigotas e iniciam reprodução por divisões binárias sucessivas; mais macrófagos são atraídos ao sítio, onde se fixam e são infectados. A lesão inicial é manifestada por um infiltrado inflamatório composto principalmente de linfócitos e de macrófagos na derme, estando estes últimos abarrotados de parasitas.

A espécie estudada neste trabalho, *Leishmania amazonensis*, produz no hospedeiro uma lesão localizada e às vezes auto-resolutiva, como lesão mucosa, cutânea, cutâneo-difusa e visceral com variável ou nenhuma tendência a auto-definição da doença (Berman *et al*, 1988). As lesões iniciais são semelhantes, independentemente da espécie do parasito. Esta forma inicial pode regredir espontaneamente após um breve curso abortivo, pode permanecer estacionária ou evoluir para um nódulo dérmico chamado "histiocitoma", localizado sempre no sítio da picada do vetor infectado. Nos estágios iniciais da infecção, a lesão é caracterizada pela hipertrofia do extrato córneo e da papila, com acúmulo de histiócitos nos quais o parasito se multiplica. Gradualmente forma-se um infiltrado celular circundando a lesão, consistindo principalmente em pequenos e grandes linfócitos, entre os quais alguns plasmócitos. Como resultado, forma-se no local uma reação inflamatória do tipo tuberculóide, e ocorre necrose resultando na desintegração da epiderme e da membrana basal que culmina com a formação de uma lesão úlcero-crostosa. Após a perda da crosta, observa-se uma pequena ulcera com bordas ligeiramente salientes e fundo recoberto por exsudato seroso ou seropurulento. Esta lesão progride, desenvolvendo-se em uma típica úlcera leishmaniótica que, por seu aspecto morfológico, pode ser reconhecida imediatamente. Trata-se de uma úlcera de configuração circular, bordos altos (em moldura), cujo fundo é granuloso, de cor vermelha intensa, recoberto por exsudato seroso ou seropurulento e dependente da presença de infecções secundárias. Simultaneamente, ou em seguida ao aparecimento da lesão inicial, pode ocorrer disseminação linfática ou hematogênica, produzindo metástases cutânea, subcutânea ou mucosa.

1.2 Modelos animais utilizados em estudos de infecções

Linhagens murinas resistentes e susceptíveis a diferentes espécies de *Leishmania* têm sido amplamente utilizadas como modelo de infecção para o estudo dos fenômenos básicos envolvendo a resposta imunológica na leishmaniose. A utilização de modelos murinos é de grande importância devido a sua estreita correlação com a doença humana e tem auxiliado na compreensão da imunopatogenia da leishmaniose humana. Nos modelos murinos de leishmaniose cutânea, os animais podem ser classificados como resistentes ou susceptíveis à doença com base no curso da infecção. Camundongos da linhagem BALB/c são susceptíveis a muitas espécies de *Leishmania* enquanto que C57BL/6 e C3H/HeN são resistentes a *L. major*,

no entanto são susceptíveis à infecção com *L. amazonensis* (Barral-Neto *et al* 1987, Soong *et al* 1997; Qi *et al* 2001).

A constituição genética da linhagem de camundongo utilizada em associação com a espécie de *Leishmania*, a dose e o sítio de inoculação (Scott & Farrell 1998) são fatores que podem alterar o resultado da infecção, algumas vezes gerando resultados aparentemente controversos. Os modelos genéticos utilizados objetivam a identificação de genes do hospedeiro importantes na participação das respostas imunes às infecções e as abordagens utilizadas são de dois tipos (Boyartchuk & Dietrich 2002). (1) análise de alterações na resposta do hospedeiro induzidas por modificações genéticas dirigidas (knock-outs, knock-ins e transgênicos) e (2) análise genética das respostas imunes do hospedeiro aos agentes infecciosos para identificação de genes com participação nas infecções (linhagens isogênicas). Os modelos das infecções por *Leishmania*, utilizados nesta última abordagem, são as linhagens isogênicas C57BL/6, C3H/HeN e BALB/c.

Nós desenvolvemos uma estratégia que é a fusão de ambas as abordagens, e que convergem em um único método: a alteração genética de animais experimentais, por seleção genética de características importantes da resposta imunológica, e a análise genética dos fenótipos resultantes. A seleção genética permite que todos os genes participantes nos fenótipos resultantes sejam selecionados. Este modelo permite uma abordagem mais ampla e a caracterização de todos os genes participantes dos caracteres imunológicos estudados. Este modelo foi obtido por acasalamentos seletivos alterando simultaneamente o genoma e o fenótipo dos animais. O objetivo dos acasalamentos seletivos foi alterar a frequência dos genes responsáveis pelos fenótipos selecionados e criar linhagens de animais com fenótipos extremos facilmente diferenciáveis. Como os fenótipos selecionados foram baseados em modificação da função imunológica, estes animais mostram respostas alteradas para agentes infecciosos (Tavares *et al* 2006, Silva *et al* 2001, 1998), o que os tornam um modelo ímpar para o estudo de doenças infecciosas.

1.3 Resposta imunológica associada à infecção experimental com *Leishmania amazonensis*

Diferentemente do que acontece durante a infecção com a *L. major*, o conhecimento sobre a resposta imunológica do hospedeiro infectado com *L. amazonensis* está por ser

definido. A maioria das linhagens isogênicas de camundongos, incluindo BALB/c, C57BL/6 (B6), e C3H, são todas suscetíveis à *Leishmania amazonensis* e desenvolvem inevitáveis lesões com um acúmulo significativo de macrófagos altamente infectados, assim como de células T CD4+ e CD8+ (Soong *et al* 1997). O macrófago atua de forma determinante no curso da resposta efetora não apenas como célula alvo, mas também principalmente como célula efetora da destruição intracelular do parasito. Ele participa também do processamento e apresentação de antígenos aos linfócitos T, contribuindo assim para o desenvolvimento de uma resposta imunológica específica (Coutinho *et al* 1984).

Ao contrário da infecção com *L. major*, as células T derivadas dos camundongos infectados com *Leishmania amazonensis* indicam geralmente um fenótipo Th1 ou um misto Th1/Th2 produzindo IFN- γ e TNF- α , mas quase nenhuma IL-4 e IL-10 (Ji *et al* 2003, Qi *et al* 2001, Soong *et al* 1996, Afonso & Scott 1993). A importância das células T CD4+ na resolução das lesões induzidas por *Leishmania* foi estabelecida através de experiências de transferência e/ou depleção destas células. A transferência de células CD4+ obtidas de animais resistentes, que se curaram da infecção, ou de camundongos susceptíveis que se tornaram resistentes através de vacinação, levou ao desenvolvimento de imunidade específica nos animais susceptíveis (Liew *et al* 1989). Por outro lado, a depleção de células CD4+ levou ao desenvolvimento de infecção fatal mesmo em camundongos normalmente resistentes a *Leishmania* (Louis *et al* 1987). Porém, a esses dados foram acrescentadas evidências de que as células CD4+ não somente eram responsáveis pela resistência à infecção por *Leishmania*, mas também podiam mediar mecanismos relacionados à produção da doença (Scott & Farrell 1998, Reiner & Locksley 1995, Liew *et al* 1989). Soong e colaboradores (1997) demonstraram que células T CD4+ são o subconjunto de linfócitos que mediam a infiltração celular, a lesão patológica, e daí a susceptibilidade a infecção com *L. amazonensis*. Também, que estas células T CD4+ promotoras da doença têm as características de células Th1. Eles utilizaram camundongos “nude” B6, “knockout” MHC classe II e RAG2. Estes camundongos apesar de não terem células T CD4+ funcionais não desenvolveram lesão, em contraste com os camundongos B6 tipo-selvagem que desenvolveram grandes lesões ulcerativas durante infecção com *L. amazonensis*. Contudo, o mecanismo responsável pela susceptibilidade à infecção por *Leishmania amazonensis* ainda permanece indefinido e não está claro como o subconjunto de T CD4+ contribui à patogênese e quais componentes imunes impedem a progressão da doença.

Somaram-se a estes fatos as experiências que apontavam também para a importância dos linfócitos CD8+ tanto na resolução das infecções (Hill *et al* 1989, Titus *et al* 1987, Milon

et al 1985) como na resistência e possível proteção de animais vacinados (Gurunathan *et al* 1997, Farrell *et al* 1989). Estas células poderiam participar do processo exercendo atividade citotóxica específica sobre macrófagos parasitados (Conceição-Silva *et al* 1994, Coutinho *et al* 1984), mas também contribuindo através da produção de citocinas, como por exemplo o IFN- γ (Mosmann *et al* 1997, Miller *et al* 1991). Apesar de várias evidências de que células CD8⁺ (Gurunathan *et al* 1997, Kima *et al* 1997) exercem uma função favorável na leishmaniose, alguns autores observaram que camundongos deficientes em CD8⁺ também montavam uma imunidade duradoura (Huber *et al* 1998).

1.4 O Paradigma (Th1 x Th2) x Th17

Segundo o paradigma Th1/Th2, camundongos resistentes à infecção por *Leishmania major* desenvolvem uma resposta Th1 (IFN-g), enquanto os susceptíveis expandem preferencialmente uma resposta Th2 (IL-4, IL-10) (Mossman *et al* 1996). A produção de citocinas que ocorre logo após o estabelecimento da infecção, durante a resposta inata, tem sido considerada como determinante no direcionamento da resposta imunológica específica, Th1(IL-12/IFN-g) ou Th2 (IL-4) (revisto em Lohoff *et al* 1998).

Camundongos com perfil Th1 (C3H) produziram IL-12 capaz de estimular a capacidade citotóxica, e produção de IFN-g pelas células NK (revisto em Trinchieri & Scott 1995), que por sua vez levaria a ativação de macrófagos, aumentando a capacidade de animais ditos resistentes em destruir a *Leishmania major* e controlar a infecção. O tratamento com anti-IFN- γ (Belosevic *et al* 1989) levava camundongos resistentes a evoluírem com lesões mais graves de leishmaniose.

Camundongos com perfil Th2 (BALB/c) não têm a habilidade de controlar a disseminação da *Leishmania major*. O caráter progressivo da infecção nestes animais parece estar associado à produção precoce de IL-4 (revisto por Reiner & Locksley 1995). Por outro lado, o tratamento de camundongos BALB/c com anti-IL-4, levava ao desenvolvimento de resistência nestes animais (revisto por Scott & Farrell 1998). Entretanto, Guevara-Mendoza e colaboradores (1997) sugerem que a IL-4 não pode ser associada ao desenvolvimento da lesão cutânea.

A IL-17 (também chamada de IL-17a) tem sido associada a diversas doenças inflamatórias como artrite reumatóide, asma, lupus e rejeição a enxerto (Kolls & Linden 2004,

Moseley *et al* 2003, Aggarwal & Gurney 2002) O receptor de IL-17 (IL-17R) é distribuído em vários tecidos (Moseley *et al* 2003), e seu acoplamento ativa tanto o fator de transcrição NF- κ B como a via kinase Jnk (Schwandner *et al* 2000). Estes estudos têm apontado para uma função pro-inflamatória de IL-17, e em particular, ligada ao recrutamento neutrofílico aos tecidos através da indução de fator estimulador de colônia de granulócitos (granulocyte colony-stimulating factor - GCSF) e IL-8 (Kolls & Linden 2004). Camundongos deficientes de IL-17R mostram resposta impedida contra infecções devido à redução substancial de GCSF e da proteína inflamatória-2 no pulmão (Ye *et al* 2001).

A expressão de IL-17 é geralmente pensada ser restrita a células T. Em humanos, IL-17 é expresso por células T CD4 ativadas, por Th1 e por Th0 mas não por células Th2 (Yao *et al* 1995). Em camundongos, a expressão de IL-17 é fortemente induzida por IL-23 em células T de memória (Aggarwal *et al* 2003). Notavelmente, a deficiência de IL-23 (mas não de IL-12) é associada com a resistência a EAE e a artrite induzida por colágeno, um fenótipo que correlaciona com o defeito na expressão de IL-17 (Langrish *et al* 2005, Cua *et al* 2003; Murphy *et al* 2003). Esses dados sugerem que é necessário o requerimento de uma única citocina para a geração de células T que expressam IL-17.

Nos últimos anos, a descoberta de citocinas como IL-23 e IL-27 mudou o panorama da discussão sobre a relação imunidade inata e adaptativa. As citocinas tipo Th1 são uma superfamília de moduladores imunes definidos por regiões comuns de suas estruturas e de seus receptores. Assim, IL-6, IL-12, IL-23 e IL-27, membros da superfamília IL-12, estão intimamente associadas com a regulação da imunidade inata e adaptativa (Kastelein *et al* 2007).

Uma ligação previamente desconhecida tem também sido estabelecida entre IL-27 e células Th-17. As citocinas IL-4 e IFN- γ assim como IL-27 são descritas serem reguladoras negativas de Th-17, ao contrário de IL-23 que estimula o seu desenvolvimento (Aggarwal *et al* 2003). A IL-27 é produzida por DCs e macrófagos assim como IL-12 e IL-23. Assim, as citocinas das linhagens Th1 e Th2 não somente antagonizam uma a outra, mas também inibem o desenvolvimento de Th17, que é uma linhagem de células T inflamatórias caracterizadas pela produção de IL-17. Estudos são necessários para determinar se Th17 “dominam” o ambiente inflamatório para eliminar efetivamente certos tipos de patógenos como vem sendo demonstrado para Th1 e Th2 (Colgan & Rothman 2006). É importante notar que a elucidação da ligação entre IL-27 e supressão de Th17 podem abrir novos caminhos pelos quais o desenvolvimento de Th17 pode ser inibido antes das vias e cascatas de desenvolvimento pró-inflamatório serem estabelecidas.

A descoberta de Th17 assim como a emergência de células T regulatórias tem forçado uma reavaliação do modelo, descrevendo o desenvolvimento de células T efetoras, para incluir estas populações relativamente novas de células efetoras. Apesar da transição para o novo modelo, certas características do velho modelo não mudaram. Por exemplo, que citocinas IL-12 e IL-4 são críticas para gerar Th1 e Th2, respectivamente. Uma outra característica do “velho” modelo que prevalece é que o perfil de citocinas gerado pelo sistema imunológico inato funciona como um determinante principal para a diferenciação de células T CD4+. Da mesma forma IL-6 e TGF- β parecem ser indutores chaves do desenvolvimento de Th-17, enquanto que TGF- β sozinha promove a geração de células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3+, que por outro lado é inibida por IL-6 (Bettelli, *et al* 2006). Isto sugere que tanto as células efetoras como as regulatórias podem se diferenciar do mesmo precursor de células T dependendo do balanço de citocinas presente no ambiente.

Há evidências da participação de IL-27 em toxoplasmose, doença de Chagas, Leishmaniose e infecção por helmintos. Assim, camundongos deficientes de receptores de IL-27 (IL27ra $^{-/-}$) desenvolvem respostas de células Th exageradas durante os estágios agudos nestas infecções (Rosas 2006, Artis *et al* 2004; Hamano *et al* 2003, Villarino, 2003). Camundongos IL-27R $^{-/-}$ infectados com o parasita intracelular *Toxoplasma gondii* geram respostas IFN- γ normais por CD4+ e CD8+ que são suficientes para controlar a replicação parasitária, mas desenvolvem uma doença inflamatória letal dependente de células T CD4+. Esta resposta patológica foi intrínseca a células T e foi caracterizada por aumento da proliferação de células T, da produção de IFN- γ e IL-2, e da manutenção de uma população altamente ativada (CD62L low ,CD25 $^{+}$) de células T CD4+ e CD8+ (Villarino *et al* 2003). Similarmente, têm também sido observadas respostas exageradas de células T, acopladas com elevada produção de citocinas inflamatórias, que incluem IL-6, TNF- β , e IFN- γ após infecção com *Trypanosoma cruzi* (Hamano *et al* 2003) e *Leishmania donovani* (Rosas *et al* 2006), dois patógenos intracelulares que também causam doença sistêmica. Ainda, camundongos IL-27R $^{-/-}$ infectados com *Mycobacterium tuberculosis* têm uma menor carga parasitária que os controles não deficientes de receptor IL-27, mas desenvolvem patologia pulmonar mais severa, e sucumbe a esta infecção, presumivelmente uma consequência de patologia imunológica-mediada (Holscher *et al* 2005). Assim, IL-27 é necessária para regular estas doenças inflamatórias mediadas por células T.

1.5 Células regulatórias

A homeostase do sistema imunológico e a tolerância ao próprio são mantidos ativamente por uma população de células T, uma vez denominadas de “células T supressoras” (Gershon *et al* 1970) e agora células T regulatórias (Tregs). Se as Tregs podem ser definidas simplesmente como células T com uma atividade imuno-supressora, há diversos tipos diferentes de células Tregs, incluindo Tregs naturais CD4⁺CD25⁺, células Tr1 secretoras de IL-10, células Th3 secretoras de TGF- β , células T CD8⁺ Qa-1, células T CD8⁺ CD28⁺, células T CD8⁺ CD122⁺, e células NKT (Bach 2003). Algumas populações de Treg são produzidas naturalmente no sistema imunológico como populações funcionalmente distintas, enquanto outras são adaptativamente induzidas de células T “naïve” em consequência de um modo particular de exposição ao antígeno, especialmente em um ambiente particular de citocinas.

Entre as variedades de populações de Tregs, as Tregs naturais CD4⁺ CD25⁺ foram analisadas mais intensamente nos seres humanos e em murinos. Células Tregs surgem no timo e são encontradas no sangue periférico e em órgãos linfóides secundários. O marcador CD25 é o receptor de IL-2, citocina necessária para a manutenção das células regulatórias. A maioria das T efetoras expressa CD25 com intensidade baixa a moderada (CD25^{int}; int=intermediário). Somente 1-3% delas expressam CD25 com alta intensidade (CD25^{high}) (Baecher *et al* 2001). A população Tregs CD25^{high} no sangue expressa CTLA-4 intracelular. Além do mais, apresentam um fenótipo de células de memória, uma vez que são CD45RO⁺, CD45RB^{low} além de CD62L e CD38 com baixa intensidade (Powrie *et al* 1996, Jonuleit *et al* 2001, Lepault & Gagnerault 2000). Outros marcadores foram identificados, como PD1 ou membros da superfamília de receptor de fator de necrose tumoral (tumour necrosis factor receptor - TNFR), tal como GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) (Lafaille & Lafaille 2002).

Assim como a T-bet controla o desenvolvimento de células Th1, e o GATA-3 controla o desenvolvimento Th2, o fator de transcrição Foxp3 é a molécula chave no controle da função e do desenvolvimento das Tregs (Wildin *et al* 2001). O gene Foxp3 (forkhead box p3) faz parte da família de reguladores de transcrição forkhead/winged helix (Brunkow *et al* 2001) e parece ser central no desenvolvimento e função das Tregs CD25^{high}. O FOXP3, o análogo humano do Foxp3 de camundongo, foi encontrado como uma mutação em pacientes afetados por desregulação imunológica, poliendocrinopatia, enteropatia, e síndrome ligada ao

X (Ipex). Em contraste aos outros marcadores de Treg CD25^{high}, o Foxp3 não é induzido nas células T após estimulação (Hori *et al* 2003).

Nestes últimos anos, tem havido esforços para elucidar os mecanismos de supressão exercidos pelas Tregs CD4⁺ CD25⁺ (Shevach *et al* 2006, Izcue *et al* 2006; Wan & Flavell 2006). Numerosos mecanismos da supressão mediada por Treg foram propostos na literatura. Eles incluem a interação direta das células T envolvendo TGF- β , Lag3, ou CTLA-4, perforina e/ou morte dependente de granzima B, supressão mediada por IL-10, modificação da função das células dendríticas, e consumo de IL-2 por Tregs. Além destes, em análises *in vitro* das funções das Treg, foram feitas tentativas de visualizar seu comportamento *in vivo* (Tang *et al* 2006). Agora parece que mais de um mecanismo da supressão é operativo *in vivo*, e que uma Treg pode exercer a supressão por mais de um mecanismo dependendo das situações *in vivo* e *in vitro*.

A maneira como as Tregs são geradas no timo ou na periferia, e como são ativadas e mantidas no sistema imunológico, é outro foco-chave da pesquisa atual. O desenvolvimento tímico das Tregs naturais parece requerer uma interação elevada entre os seus TCRs e ligantes peptídeos-próprio/MHC, e a expansão das Tregs na periferia reconhecendo e selecionando os ligantes peptídeos-próprio/MHC (Picca *et al* 2006). As Tregs que expressam Foxp3, e são funcionalmente e fenotipicamente Tregs naturais, podem também se desenvolver *in vivo* e *in vitro* a partir de células T “naïve” sobre certas condições; em particular na presença de TGF- β *in vitro* (Kim 2006, Wan & Flavell 2006). As Tregs naturais são altamente dependentes de IL-2 exógeno para sua sobrevivência na periferia (Sakaguchi *et al* 2006 ; Kim & Rudensky 2006). IL-2 também é requerida para o desenvolvimento de células Tregs de novo das células T “naïve” na periferia (Lohr *et al* 2006). Além disso, a produção de IL-2 por outros linfócitos no local da inflamação pode expandir Tregs reativas com os antígenos microbiais ou auto-antígenos liberados do tecido danificado, contribuindo assim à supressão da resposta imunológica excessiva aos antígenos próprio e não-próprio (Shevach *et al* 2006). Além das citocinas, tais como IL-2, IL-10, e TGF- β , uma variedade de moléculas acessórias expressas por Tregs, incluindo CD28 e CTLA-4, é envolvida em ajustar o grau de ativação, expansão, e supressão de Tregs (Sansom & Walker 2006). A manipulação das Tregs poderá tornar os métodos atuais de vacinação contra micróbios mais eficazes.

1.5.1 O relacionamento entre células regulatórias CD4+ CD25+ e as demais células regulatórias

Um outro tipo de T regulatórias é modulado por IL-10 e secreta IL-10 e TGF- β e foi denominada célula Tr1 (Groux *et al* 1997). Durante a investigação de mecanismos associados com a tolerância oral, foi descoberta uma classe de células regulatórias distintas de outros subconjuntos de célula T, que eram dependentes de TGF- β para sua atividade biológica, e foram denominados subseqüentemente de células Th3. Se as células Th3 e Tr1 vêm de precursores similares ou de tipos diferentes de células regulatórias não é conhecido. Está também claro que as células T CD4+CD25+ são uma classe importante de células regulatórias (Thornton & Shevach 1998, Jordan *et al* 2001). Tem sido relatada a geração de células T CD4+CD25+ após a administração oral de antígeno (Thostenson & Khoruts 2001). O relacionamento destas células regulatórias com as células do tipo Th3 não está claro. As células T CD4+CD25+ regulatórias parecem agir através de contato célula a célula e requerem CTLA-4 para a indução. TGF- β parece desempenhar um papel central na função de células regulatórias CD4+CD25+. Nakamura e colaboradores (2001) relataram que a TGF- β ligada à superfície da célula é responsável pela auto-supressão dependente de contacto das células regulatórias CD4+CD25+, e Yamagiwa e colaboradores (2001) relataram que TGF- β participa da expansão destas células no sangue periférico humano.

1.5.2 Participação das células regulatórias na infecção com leishmania

O modelo experimental de infecção com *Leishmania major* provê um bom exemplo de que a célula Treg natural é necessária para a sobrevivência do patógeno. No modelo sem cura de *L. major*, a infecção resulta em lesões progressivas causadas pela resposta Th2 (Sacks & Noben-Trauth 2002). Parece importante considerar o papel de IL-10 produzido pelas células Tregs naturais CD4+CD25+high na susceptibilidade a *L. major*, uma vez que essas células parecem suprimir a capacidade dos linfócitos T CD4+, específicos para *L. major*, de produzir uma cura estéril (Belkaid *et al.*, 2002). Portanto, a amplitude da resposta e a subseqüente lesão tecidual são controladas pelas células Tregs naturais (Xu *et al.*, 2003). IL-10 produzido pelas células T CD4+ é tão importante quanto IL-4 na evolução da susceptibilidade à infecção

por *L. major*. Essa observação levanta a questão dessas citocinas serem secretadas pelas mesmas células Th2 ou produzidas por uma discreta subpopulação de células T CD4+ que surgem dos diferentes clones celulares ativados por outros antígenos (Sacks & Anderson 2004).

Entretanto, a infecção com *Leishmania amazonensis* em camundongos nos fornece outro exemplo do controle imuno-patológico exercido por Tregs naturais. Neste modelo de infecção, a patogenia e a expansão sustentada do parasito são associadas com as células T CD4+ efectoras e são independentes do desenvolvimento de uma resposta Th2. A infecção é caracterizada pelo acúmulo das Tregs naturais no local da infecção transiente que downregula a imunopatologia mediada pelas células Th1 leishmania-específicas (Ji *et al* 2004). Assim, neste modelo as Tregs permitem um melhor controle da carga parasitária e da patogenia, controlando as células T efectoras patogênicas.

1.6 Tolerância oral e Supressão *Bystander*

Nos tecidos de mucosa se desenvolveu um grande e complexo aparato imunológico, o qual é anatômica e funcionalmente distinto daqueles encontrados em outras partes do corpo, sendo capaz de discriminar a flora normal e os Ags do alimento de agentes patogênicos. Uma das questões centrais em imunologia permanece sendo o conhecimento dos mecanismos que controlam o balanço entre tolerância e imunidade no sistema imunológico associado aos tecidos de mucosa (Mowat & Viney L, 1997).

A tolerância oral é um mecanismo reconhecido de indução de tolerância periférica, e foi demonstrada classicamente pela supressão específica de respostas imunes celulares e/ou humoral a um antígeno, por administração prévia do antígeno por rota oral. Isto é, presumivelmente, para impedir reações de hipersensibilidade às proteínas do alimento e aos antígenos bacterianos presentes na flora mucosal. A tolerância oral é de importância imunológica única desde que é um evento imunológico natural contínuo dirigido pelo antígeno exógeno. Assim, a tolerância oral é um mecanismo imunológico que evoluiu para dispor dos agentes externos, que ganham acesso ao corpo através de uma rota natural, como componentes internos, que então se tornam partes do próprio. Está agora claro que a tolerância oral é um processo imunológico ativo. Assim, a tolerância oral é um processo complexo que envolve a supressão de algumas respostas imunes e a indução de outras.

Durante a investigação dos mecanismos associados com a tolerância oral, foi descoberta uma classe de células regulatórias distintas de outros subconjuntos de célula T que eram dependentes de TGF- β para sua atividade biológica e foram denominadas subsequentemente como células Th3.

Os mecanismos de indução envolvidos na tolerância oral dependem da dose administrada de Ag. Assim, administração de Ag em baixa dose leva à emergência de células T regulatórias CD4+, descritas como Th3, Tr1 e CD4+ CD25+ produzindo citocinas supressoras IL-4, IL-10 e TGF- β que controlam respostas Th1 e Th2, enquanto altas doses levam a anergia clonal e deleção de células T (Strober *et al* 1997, Weiner 1997, Chen *et al* 1995, 1994). Tem sido descrito que Ags administrados oralmente são encontrados sistemicamente dentro de todos os tecidos linfóides (Gutgemann *et al* 1998). Entretanto, com a utilização de altas doses, onde parte do Ag é absorvida em uma forma imunogênica, é ainda amplamente desconhecido se a geração de células supressoras está associada com deleção clonal, ou como as células T e os Ags residindo fora do tecido linfóide associado ao intestino (GALT) estão envolvidos na indução de tolerância.

1.6.1 Supressão *Bystander*

A administração oral de um imunógeno há muito tempo tem sido usada para induzir tolerância periférica de respostas imunes sistêmicas em larga escala. Um dos mecanismos imunorregulatórios mais úteis que podem ser induzidos pela tolerância oral é a supressão *bystander*, em que as respostas a um segundo imunógeno, podem ser inibidas quando é apresentado junto com o imunógeno para o qual a tolerância já está estabelecida. A supressão *bystander* foi demonstrada inicialmente *in vitro*, onde se observou que células de animais alimentados com proteína básica da mielina (PBM) após serem reestimuladas *in vitro* com o mesmo antígeno administrado por via oral, poderiam suprimir a proliferação de células T reativas à ovoalbumina, através da secreção de citocinas imunossupressoras no sobrenadante das culturas, possivelmente TGF- β (Miller *et al* 1991). De maneira análoga, células de animais alimentados com OVA quando reestimuladas *in vitro* com este antígeno são capazes de suprimir uma linhagem de linfócitos T reagentes à PBM. A funcionalidade da supressão *bystander* foi descrita em diversos modelos de tolerância oral *in vivo* em doenças autoimunes, onde o antígeno da alimentação pode impedir a indução da doença quando os animais são

desafiados com o antígeno tolerogênico e o autoantígeno junto, ou se o dois antígenos forem colocalizados no mesmo sítio anatômico (Miller *et al* 1991, Wildner & Thureau 1995). A base celular deste fenômeno ainda não está clara, e a maneira em que as células T virgens específicas para o antígeno *bystander* podem ser suprimidas não é conhecida.

Poucos estudos examinaram a tolerância *bystander* a nível celular *in vivo*. Em um trabalho (Pape *et al* 1998), duas diferentes populações de células T CD4⁺ transgênicas para TCR foram usadas para estudar a supressão *bystander* após a injeção i.v. de Ag solúvel, e não houve nenhuma inibição na expansão clonal da população de células T *bystander*. Foi demonstrado por Millington e colaboradores (2004) que a supressão *bystander* não é consequência de deleção clonal ou redução da expansão clonal das células T *bystander*, mas da alteração de sua diferenciação funcional.

Um número de populações de células T regulatórias foi relatado suprimir a proliferação de células T *bystander in vitro*, através da produção de citocinas tais como IL-10 ou TGF- β (Annacker *et al* 2001, Cong *et al* 2002 Levings *et al* 2002, Groux *et al* 1997, Powrie *et al* 1996) ou através do contato célula-célula (Nakamura *et al* 2001, Read *et al* 2000, Takahashi *et al* 2000). Entretanto, poucos estudos examinaram a tolerância *bystander* no nível celular *in vivo*. Em um trabalho (Pape *et al* 1998), duas diferentes populações de células T CD4⁺ TCR transgênicas foram usadas para estudar a supressão *bystander* após a injeção i.v. de antígeno solúvel, e não houve nenhuma inibição na expansão clonal da população de células T *bystander*. Entretanto, embora protocolos similares por via endovenosa induzam supressão *bystander in vivo* (Gumanovskaya *et al* 1999, Valujskikh *et al* 2001), isto não foi confirmado funcionalmente após a co-transferência das células T transgênicas (Pape *et al* 1998), e permanece possível que a tolerância induzida com antígeno alimentar tenha efeitos diferentes, na expansão e na diferenciação das células T *bystander*, daqueles encontrados após a indução da tolerância parenteral.

Nos últimos anos, a percepção das células dendríticas (DC) foi deslocada de indutores da reatividade imunológica para reguladores da imunidade, ou seja, encarregando as DC como contribuidoras para a tolerância de células T, através de moléculas co-estimulatórias ou fatores humorais (Morelli & Thomson 2007, Hubert *et al* 2007). Tem sido demonstrado que as DC contribuem diretamente para a indução de Treg, anergia clonal ou deleção, e as terapêuticas baseadas em DC têm sido investigadas para transplante ou doenças alérgicas (Fujita *et al* 2007). Em especial, a geração de células regulatórias antígeno-específicas parece ser resultado de apresentação de antígeno feita por DC associadas ao intestino Viney *et al* 1998). Vários estudos têm mostrado que um determinado subconjunto de DC pode induzir

células T reg produtoras de IL-10 (Ito *et al* 2007). Além disso, células T regulatórias secretoras de IL-10 podem ser induzidas nas Placas de Peyer (PP) de camundongos tolerizados oralmente (Tsuji *et al* 2001). Estudos recentes demonstram que a tolerância oral aumenta a proporção DC CD11b+, que expressam IL-10 e IL-27 (Shiokawa *et al* 2009) induzindo tolerância periférica através da supressão de Th17 (Ehreichou *et al* 2007).

1.7 Estudos com Linhagens Obtidas por Seleção Genética Bidirecional

Biozzi e colaboradores (1979) estudaram os fenômenos imunobiológicos através de experiências de seleção genética, de linhagens de camundongos, para fenótipos extremos de um caráter de interesse. Estas experiências utilizam os métodos da genética de populações. Nelas, a expressão dos caracteres imunobiológicos de interesse são mais facilmente observados do que o seriam em linhagens isogênicas. Isto se deve, obviamente, a expressão extremada do caráter em estudo.

Experiências de seleção genética bidirecional permitiram a produção de linhagens de camundongos com fenótipos extremos para resposta quantitativa de anticorpos específicos a diferentes antígenos naturais complexos. O caráter fenotípico selecionador foi a produção máxima ou mínima de anticorpos, em resposta aos antígenos escolhidos em condições de imunização previamente estabelecidas (Biozzi *et al* 1979). Experiências de seleção para produção máxima ou mínima de reação inflamatória a substâncias imunologicamente inertes, resposta ao mitógeno fitohemaglutinina (PHA) e para estudo de tolerância oral induzida por ovalbumina foram também desenvolvidas (Ibanez *et al* 1992, Stiffel *et al* 1977, Silva *et al* 1998).

Os alelos separados em cada linhagem pelo acasalamento seletivo permitem que os anticorpos produzidos contra os imunógenos selecionadores estejam sempre muito mais elevados nas linhagens H do que nas L. Estes alelos estão implicados no “efeito multiespecífico”, já que operam na resposta para muitos imunógenos não relacionados, tais como proteínas, polissacarídeos, vírus, antígenos bacterianos e parasitários (Biozzi *et al* 1979). Estas linhagens constituem bons modelos para o estudo da resposta imunológica específica e inespecífica.

As seleções para a resposta inflamatória e para tolerância oral foram iniciadas de uma população F0 heterogênea obtida pelo interacasamento equilibrado de oito linhagens

isogênicas (A/J, DBA/2J, P/J, SWR/J, SJL/J, CBA/J, BALB/cJ, C57BL/6J). A utilização de linhagens isogênicas para a produção da população fundadora permite que as experiências de seleção possam ser repetidas.

1.7.1 Vantagens no Uso de Linhagens Seleccionadas

As seleções são feitas pelo acasalamento preferencial de indivíduos apresentando fenótipos semelhantes. A finalidade deste tipo de acasalamento é modificar a frequência gênica da população inicial, pelo aumento da probabilidade de acasalamentos dos fenótipos extremos. Desta forma, é possível o acúmulo das características desejáveis, devido ao aumento da homozigose, após várias gerações de seleção. Os genes não ligados aos alelos sob seleção permanecerão segregando sem alteração sensível de suas frequências gênicas. Assim, grande parte da variabilidade genética é mantida nas linhagens seleccionadas. É possível então a análise individual de segregantes F2 e retrocruzados que reproduzem as populações naturais, permitindo assim o estudo comparativo entre populações geneticamente homogêneas e heterogêneas. Em outras palavras, as populações obtidas desta forma no laboratório, abarcam a amplitude de variação observada numa população natural, permitindo assim um estudo global do caráter (Mouton *et al* 1988).

Uma experiência de seleção apresenta, além daquela acima descrita, uma vantagem de grande importância biológica que é a detecção de determinados graus de relacionamento entre o caráter selecionado e um caráter não selecionado (às vezes insuspeitado), mas cujos genes se mantiveram ligados, durante o processo seletivo, nos indivíduos de uma população. Devemos observar que cada experiência de seleção é desenvolvida para fenótipos extremos de um único caráter. As correlações entre diferentes caracteres podem ser genéticas ou ambientais. No primeiro caso, os genes que afetam essas características podem ser os mesmos (pleiotropia) ou podem estar ligados entre si (situados no mesmo cromossomo). No segundo, os dois caracteres são influenciados pelas mesmas diferenças de condições ambientais internas ou externas (Falconer 1981).

1.7.2 Seleção Genética de Linhagens de Camundongos para Tolerância Oral

Uma experiência de seleção para o estudo de tolerância periférica foi desenvolvida através da produção de linhagens de camundongos com fenótipos extremos de sensibilidade (camundongos TS) e resistência (camundongos TR) à tolerância oral (Silva *et al* 1998). As linhagens resistente (TR) e sensível (TS) à tolerância oral foram selecionadas por sua produção de anticorpos decorrente do tratamento intragástrico prévio à imunização intraperitoneal com ovalbumina (OVA) em Al (OH)₃. Nesta experiência, a primeira ninhada de cada casal constituía a população tratada por via oral a partir da qual eram selecionados os animais com o fenótipo adequado para constituir os parentais da geração seguinte. A segunda ninhada constituía a população apenas imunizada que serviria como controle da capacidade imunogênica da prole de cada casal. Eram selecionados para constituir a geração seguinte das diferentes linhagens, apenas aqueles animais susceptíveis (TS) e resistentes (TR) à tolerância provenientes de famílias boas respondedoras. Os acasalamentos eram sempre entre iguais (susceptíveis x susceptíveis e resistentes x resistentes), sendo que animais de uma linhagem nunca eram acasalados com aqueles de outra linhagem. Como resultado desta estratégia, as linhagens diferem no nível de anticorpos quando previamente tratadas por via oral (tolerância oral), sendo ambas boas respondedoras quando apenas imunizadas sem o tratamento oral prévio (controle). O nível de IgG anti-OVA na linhagem TR após tratamento oral é 1000x maior na resposta primária (geração F12) e 2500x maior na resposta secundária, do que na linhagem TS. Diferenças similares são observadas no nível de IgE (Silva *et al* 2006). Esses dados são válidos quando estimamos a diferença interlinhagem ou mesmo quando comparamos os grupos experimentais com os grupos controles respectivos.

A regulação da tolerância oral da resposta celular à OVA, medida pelo teste de hipersensibilidade tardia (DTH), mostrou-se parcialmente independente da humoral, já que o DTH é suprimido também na linhagem TR (Silva *et al* 2001a, 1998). Entretanto, os animais TR são capazes de desenvolver respostas celulares potentes possivelmente como consequência da redução de sua capacidade regulatória.

1.7.3 Estudo de Diferentes Características Imunológicas nas Linhagens Seleccionadas para Tolerância Oral

O estudo de diferentes aspectos da resposta imunitária nas linhagens de camundongos TS e TR, tem o objetivo de detectar quais características foram alteradas pelo processo seletivo e qual a relação entre elas e tolerância oral. Isto é feito pelo estudo comparativo interlinhagem e por análises de correlação fisiológica ou genética.

Diferenças interlinhagem, no nível de IgG, são observadas também após ingestão de antígenos que não foram utilizados no processo seletivo, como HGG, HSA, amendoim, castanha de caju, IgY (imunoglobulina de aves) e SRBC. O nível de IgG é sempre mais alto nos animais TR (dado não publicado).

Quando respostas inflamatórias agudas são induzidas com carragenina, LPS ou poliacrilamida P-100 os camundongos TR sempre apresentam maior resposta inflamatória aguda do que os TS. Assim, a linhagem resistente a tolerância apresenta maior capacidade inflamatória que a linhagem susceptível a tolerância (enviado para publicação). Esta possível correlação e seu significado estão sendo investigados. Ou existem genes em comum entre resistência à tolerância oral e inflamação (pleiotropia), ou estes genes estão ligados ao mesmo cromossomo. É possível também que a maior inflamação em Tr funcione como um mecanismo de resistência a tolerância.

Animais TS são baixos produtores de IgE total e específica ao contrário dos TR. Assim, a tolerância oral protege animais TS de reações de hipersensibilidade mediada por IgE, mas não animais TR. Sabe-se que reações de hipersensibilidade mediadas por IgE são a base para a maioria das reações alérgicas no homem e pode envolver órgãos alvos múltiplos. No camundongo o órgão alvo mais importante é o intestino. Um outro fenômeno observado relacionado aos níveis de IgE e à inflamação, é que animais TS apresentam menor número de mastócitos que animais TR. Os caracteres número de mastócitos e nível de IgE total foram observados segregarem juntos em uma população F2 produzida a partir das linhagens TR e TS, o que é indicativo de ligação genética (Silva *et al* 2006).

Ainda, os animais TR também desenvolvem reações inflamatórias crônicas de grande intensidade. Quando infectados com *Sporothrix schenckii* (um fungo intracelular) os camundongos da linhagem TR produziram altos níveis de citocinas pró-inflamatórias e seus macrófagos mostraram maior capacidade de destruição de conídios, após estímulo com IFN- γ , do que os camundongos TS. Apesar disto, apresentaram maior taxa de mortalidade

indicando que a perda da homeostasia ocasionada pela alta atividade imunológica nos TR pode ter sido responsável pela susceptibilidade a infecção com fungo (Silva *et al* 2001b).

Assim, as linhagens TS e TR apesar de selecionadas para T.O. induzida por OVA intragástrica, diferem para características tais como: atopia, número de mástocitos, recrutamento de neutrófilos (LPS, carragenina, poliacrilamida) e eosinófilos (OVA), produção de moléculas de adesão, de citocinas supressoras e pró-inflamatórias, inflamação crônica.

2 OBJETIVOS

Estudar a Infecção por *Leishmania amazonensis* em modelo de camundongos selecionados para susceptibilidade e resistência à tolerância oral e desenvolver protocolos de supressão da patologia e da infecção que possam ser aplicados em humanos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos com 8 semanas de idade, BALB/c foram gentilmente cedidos pela Professora Maria Lúcia Barreto da Universidade Federal Fluminense. Camundongos da geração F24, das linhagens TS e TR selecionados para tolerância imunológica (da Silva *et al*, 1998), são mantidos no Departamento de Genética da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Todos os camundongos foram mantidos com alimentação padrão e água *ad libitum*. A manipulação dos animais foi aprovada pela “Comissão de Ética para o Uso de Animais Experimentais” do Instituto de Biologia Prof. Roberto de Alcântara Gomes da UERJ sob o número 217/2007.

3.2 Protozoários e condições de crescimento

Leishmania amazonensis da cepa Josefa foi gentilmente cedidas pelo Professor Alexandre Ribeiro Bello do Departamento de Parasitologia da Faculdade de Ciências Médicas, da UERJ, e *L. amazonensis* transfectada com proteína fluorescente verde (MHOM/BR/75/Josefa strain) foi gentilmente cedida pela professora Bartira Rossi-Bergmann do Instituto de Biofísica, da UFRJ. Para a manutenção e garantia da infectividade das leishmanias, estas foram inoculadas e mantidas em frequentes passagens nos camundongos BALB/c, sendo transferidas para meio de cultura e mantidas dessa forma por no máximo 3 repiques. As leishmanias utilizadas na fase promastigota cresceram a 25°C em meio Schneider, suplementado com 100U/mL de penicilina-estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB). As leishmanias cresceram de forma exponencial e o repique feito quando elas atingiam a fase estacionária.

3.3 Preparação de antígenos de leishmania

Os antígenos foram preparados a partir de promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio axênico. Após centrifugação (1000 x g por 10 min.) o precipitado foi lavado com PBS 0,15M pH 7,2. Os parasitas eram lisados em 6 ciclos de congelamento-descongelamento. O descongelamento era feito em banho-maria 37°C e o congelamento rápido em nitrogênio líquido. A suspensão era centrifugada (1500 x g por 15 minutos) e o sobrenadante separado em alíquotas e conservado em freezer -20° C até momento do uso. A quantificação das proteínas contidas nos extratos foi realizada pelo método de Lowry.

3.4 Infecção

Doze camundongos de ambos os sexos e linhagens foram inoculados, no coxim plantar esquerdo, com 20µL de suspensão contendo 1×10^7 promastigotas metacíclicos vivos de *L. amazonensis* em salina. O desenvolvimento da infecção foi medido semanalmente com o auxílio de um paquímetro, sendo calculada pela diferença entre o diâmetro da pata infectada e da pata colateral (resultado em In, sendo convertido em mm).

3.5 Supressão/ativação *bystander*

A supressão *bystander* foi feita por modificação de Miller *et al.* (1991). Os camundongos receberam, por via intragástrica (IG), 1, 2, 5 ou 25 mg OVA em PBS em um ou dois dias consecutivos. Sete dias após, um grupo foi imunizado com 50µg de OVA solúvel 8h após ser imunizado com 50µg de antígeno solúvel bruto de leishmania em adjuvante completo de Freund e infectados na semana seguinte na pata colateral (Tavares *et al.* 2006); ou imunizados com 50µg de OVA solúvel sem adjuvante 8 h após a infecção com leishmania na mesma pata. As medidas do inchaço das patas foram expressas em milímetros.

3.6 Quantificação da carga parasitária

A carga parasitária foi quantificada pelo método de diluição limitante ou pela intensidade de fluorescência (*Leishmanias amazonensis* transfectadas com proteína fluorescente verde). No método de diluição limitante (revista por Torres Santos *et al.*, 1999), a pata infectada sem a pele é pesada, peneirada e diluída em meio Schneider, suplementado com 100U/mL de penicilina-estreptomicina e 10% de SFB na concentração de 0,1g por mL. Esta suspensão foi diluída logaritmicamente em duplicata numa placa de 96 poços e cultivada à 25°C por 48 e 72h, sendo titulada no poço onde uma leishmania foi encontrada.

Em infecções com *L. amazonensis* transfectadas com proteína fluorescente verde, a carga parasitária foi medida por emissão de fluorescência no lisado do tecido do sítio de infecção (Pinto *et al.* 2003). Resumidamente, no final das experiências, cada pata infectada teve a pele retirada e então macerada em 2 ml de PBS e os detritos de tecido foram removidos por sedimentação durante 10 min. A intensidade de fluorescência dos sobrenadantes diluídos (2x) foram lidas em triplicatas num fluorímetro, utilizando-se comprimento de excitação de 435 nm e emissão de 538 nm.

3.7 Preparo de células de linfonodo

Animais com 8 semanas de infecção tiveram seus linfonodos inguinais e poplíteos correspondentes à pata infectada, isolados axênicamente, e macerados em RPMI. As suspensões de células foram lavadas, sendo centrifugadas a 500 x g por 10 minutos à 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e as células ressuspensas em 1 ml de meio RPMI Completo (10% SFB, 1% L-glutamina 2mM, com 100U/mL de Penicilina-estreptomicina e 2-Mercaptoethanol 0,05mM). A viabilidade celular foi testada com Eosina Amarelada 0,5% (sempre superior à 98%), e as células conservadas a 4°C até o momento do plaqueamento (máximo 1 hora).

3.8 Dosagem de citocinas

Linfócitos foram plaqueados em triplicatas em placas de 24 poços a 2×10^6 células por poço, incubadas durante 24h à 37°C em atmosfera de 5% CO₂, e estimulados com 1,6µg de Concanavalina A. As placas foram então centrifugadas a 500 x g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes estocados a -20°C para a dosagem de IL-2, IL-4, IL-10, IFN-γ e TGF-β por ELISA seguindo o protocolo do produtor (R&D). Foram colocados 50µL do anticorpo de captura por poço e as placas incubadas durante a noite. As placas foram lavadas 3x (PBS 7,4; 0,05% tween 20) e bloqueadas com 200µL da solução bloqueadora (PBS 7,4, 5% Sacarose, 1%BSA) e incubadas por 90 minutos. As placas foram novamente lavadas 3x, e colocados 50µL das amostras ou citocina recombinante padrão. As placas foram então incubadas por 3 horas a temperatura ambiente e lavadas novamente 3x. O anticorpo de detecção biotilado foi adicionado a 50µL/poço, e as placas incubadas por 3 horas e lavadas 4x. A seguir, 50µL por poço de Streptavidina HRP (diluído 1:20.000) foi adicionado por 30 minutos, lavado 4x e adicionado 100µL de TMB por poço entre 20 e 30 minutos no escuro. A reação foi parada com HCl 1N e leitura feita em 490nm de absorbância.

3.9 Análise por citometria de fluxo

Marcação por imunofluorescência e análise dos linfócitos dos linfonodos poplíteos e inguinais foram realizadas por citometria de fluxo (FACScalibur; Becton & Dickinson, Franklin Lakes, NJ), utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD4-allophycocyanin (H129.19; Pharmingen), anti-CD25-biotina (PC61, Pharmingen) e anti-forkhead box P3 (Foxp3)-PE (FJK-16s; eBioscience, San Diego, CA). Avidina-FITC (Sigma 083H4825; St Louis, MO) ou avidina-PE Cy5.5 (eBioscience) foram utilizadas em conjunto com anticorpos monoclonais marcados com biotina. A permeabilização da membrana celular para a marcação com Foxp3 foi realizada pelo tratamento com saponina 0,1%. Solução de paraformaldeído 2% foi utilizada para fixação das células.

3.10 Análise estatística

Os resultados foram analisados pelo teste t de Student ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Análise comparativa da lesão inflamatória e carga parasitária de camundongos TR e TS infectados

O desenvolvimento da lesão inflamatória e da carga parasitária foi avaliado, por comparação interlinhagem, em camundongos infectados por via subcutânea (coxim plantar) com 10^6 promastigotas em fase estacionária. Os camundongos TR desenvolveram maior lesão inflamatória (**Figura 1** e Tavares *et al.* 2006), a partir da 4ª semana ($p = 0,02386$), quando comparados com a linhagem TS. Não foi possível acompanhar o desenvolvimento da lesão após a 15ª semana nos camundongos TR que tiveram de ser submetidos à eutanásia em consequência do grande aumento da lesão inflamatória (lesão $> 3\text{mm}$). A linhagem TS apesar de inibir lesão inflamatória no sítio da infecção, não consegue impedir a proliferação e metástase do parasito, ocorrendo o crescimento dos linfonodos drenantes ao longo da infecção.

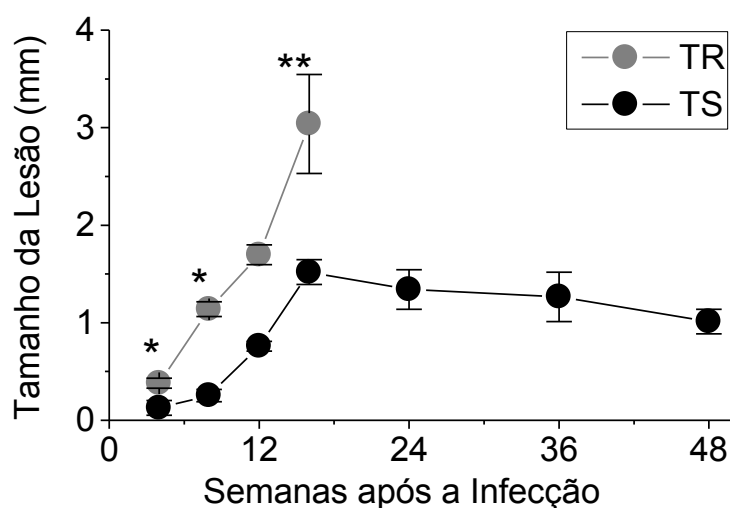


Figura 1: Desenvolvimento da lesão em camundongos TR e TS infectados com *L. amazonensis*. Camundongos de ambas as linhagens foram infectados no coxim plantar com 10^7 promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*. O tamanho da lesão foi medido por um paquímetro e expressa a diferença entre a pata infectada e não infectada (* $P < 0,05$ após 4 semanas, ** $P < 0,01$ após 15 semanas). Resultado representativo de duas experiências independentes (média \pm SE, $n = 4$).

A carga parasitária foi avaliada por diluição limitante (**Figura 2a** e Tavares *et al.* 2006) e pela emissão de fluorescência, resultante de infecção com promastigotas transfectadas com proteína fluorescente verde, no sítio de infecção (**Figura 2b**). Não houve diferença entre os dois métodos de avaliação. A carga parasitária foi inversamente proporcional ao tamanho da lesão em ambas linhagens. Camundongos TS apresentaram alta carga parasitária e pequena lesão, contrariamente aos TR que apresentaram baixa carga parasitária e grande lesão. A carga parasitária da linhagem TS aumentou até a 4ª semana após a infecção mantendo-se baixa e constante até a 16ª semana de observação ($1,5 \pm 1,2 \times 10^6$ parasitas). Nos TR a carga parasitária foi de $7,68 \pm 1,5 \times 10^6$ parasitas na 8ª semana chegando a $8,2 \pm 1,45 \times 10^6$ parasitas na 12ª semana (Figura 2a).

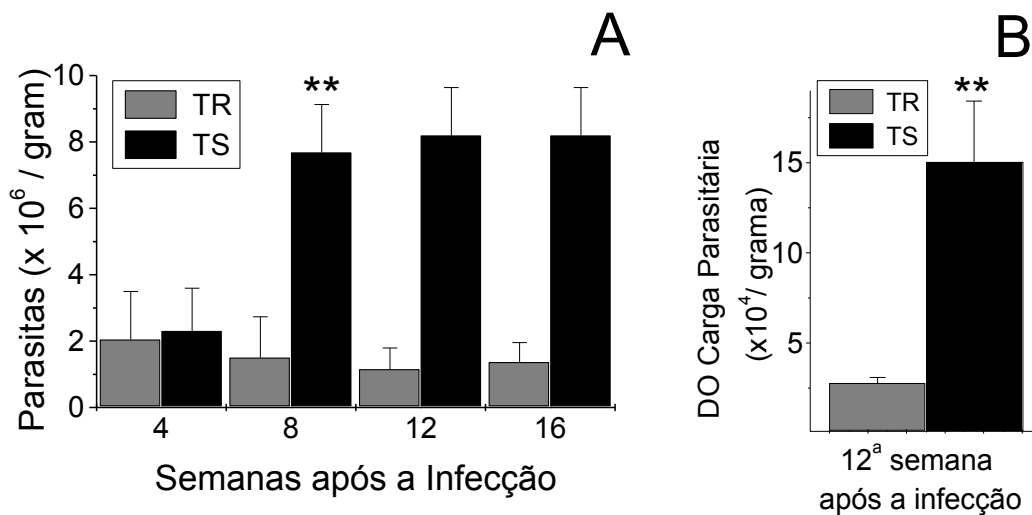


Figura 2: Carga parasitária em camundongos TR e TS infectados com *L. amazonensis*. A carga parasitária foi medida por diluição limitante (2A) e emissão de fluorescência (2B) no sítio de infecção. Para a medição por emissão de fluorescência os animais foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. amazonensis* transfectadas com gene de proteína fluorescente verde (MHOM/BR/75/Josefa strain). (**P < 0,01 após 8 semanas). Resultado representativo de três experiências independentes (média \pm SD, n = 4).

4.2 Proliferação celular *in vitro* e níveis de citocinas em TR e TS normais e infectados

Células dos linfonodos poplíteos e inguinais de animais normais ou infectados com *L. amazonensis* foram mantidas em cultura durante 48h após estimulação com ConA, e a proliferação foi avaliada por incorporação de Timidina Tritiada (H3-TdR) nas últimas 6 horas

de cultura. A proliferação de linfócitos coletados de TS não infectados, quando estimulados com ConA, foi maior do que nos TR (TR não infectados = $3,5 \pm 1,5$; TS não infectados = $8,0 \pm 1,8 \times 10^3$ cpm, $p < 0,05$). A maior resposta proliferativa *in vitro* de TS não se correlaciona com a observada *in vivo* (Tavares *et al*, 2006). Não observamos diferença significativa entre TR e TS infectados (TR infectado = $7,6 \pm 2,6$; TS infectado = $11,1 \pm 1,8 \times 10^3$ cpm, $p > 0,05$) (Figura 3A).

Os níveis de citocinas foram quantificados do sobredanante de linfócitos de camundongos TS e TR normais e infectados. Os níveis de IL-4, IL-10 e IFN- γ foram mais altos em camundongos TS infectados quando comparados com camundongos TR submetidos ao mesmo protocolo. Os níveis de citocinas de camundongos TS não infectados, foi também significativamente maior do que em TR (Figura 3 e Tavares *et al*, 2006). Entretanto, ambas as linhagens produziram altos níveis de TGF- β (Figura 3).

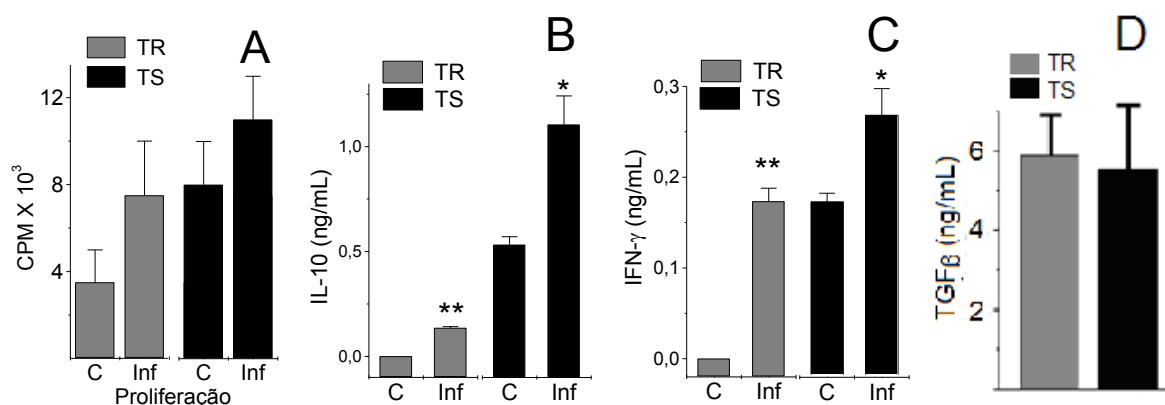


Figura 3: Proliferação celular e quantificação das citocinas IFN- γ , IL-10, TGF- β em camundongos TR e TS infectados com *L. amazonensis*. Quantificação da proliferação celular e dos níveis de citocinas em sobrenadante de culturas de linfócitos de linfonodos poplíteos e inguinais, coletados na 12^a semana de infecção de camundongos TS e TR, infectados com 10^7 promastigotas (Inf) e não infectados (C). Os sobrenadantes foram coletados de culturas estimuladas com ConA por 48 horas (média \pm SD, $n = 4$). O resultado é representativo de três experiências independentes, com exceção do TGF- β que foi dosado em apenas uma experiência.

4.3 Freqüência de células T regulatórias CD4+CD25+Foxp3+ em animais normais e infectados

A freqüência de células Treg (CD25⁺Foxp3⁺) de animais normais da linhagem TS, avaliada por citometria de fluxo de células dos linfonodos poplíteos e inguinais, foi maior do que na linhagem TR (15,0 ± 1,6 e 11,5 ± 0,4; p = 0,02128). Entretanto, não foi observada diferença interlinhagem (Freqüência ± SD, 21,8 ± 1,6 e 20,8 ± 1,0; p = 0,41057) nos animais infectados (Figura 4).

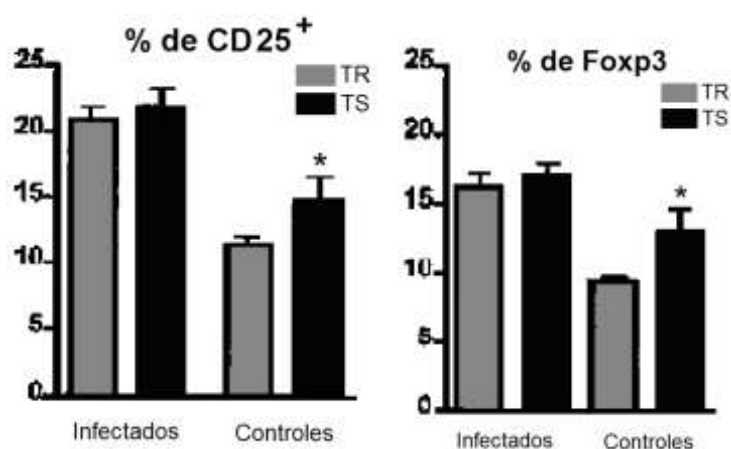


Figura 4: Freqüência de células T reguladoras CD4+CD25+Foxp3+ em camundongos TS e TR infectados com promastigotas de *L.amazonensis*. Freqüência de linfócitos CD4+CD25+Foxp3+ de linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos TS e TR infectados e não infectados (média ± SD, n = 4). Linfonodos de camundongos infectados com 10⁷ promastigotas coletados na 12^a semana de infecção. Resultado representativo de duas experiências independentes.

4.4 Imunização oral e subcutânea com antígeno bruto de promastigotas

Camundongos de ambas as linhagens foram tratados por via intragástrica (IG) com dose única de 500 µg de antígeno bruto solúvel de *Leishmania*. Um outro grupo de camundongos foi imunizado por via subcutânea com 50 µg de antígeno bruto em adjuvante completo de Freund. Os animais foram infectados uma semana após o tratamento IG ou ip com o antígeno. Não observamos diferença no desenvolvimento da lesão avaliada durante 13 semanas, entre os grupos tratados e não tratados com antígeno de *Leishmania* por uma ou outra via de imunização (Figura 5).

Grupos	Dia -07	Dia 0
Ag Oral	500 µg Ag <i>Leishmania</i> via IG	Infecção na pata esquerda
Ag sc	50µg Ag <i>Leishmania</i> + CFA na pata direita	Infecção na pata esquerda
Controle		Infecção na pata esquerda

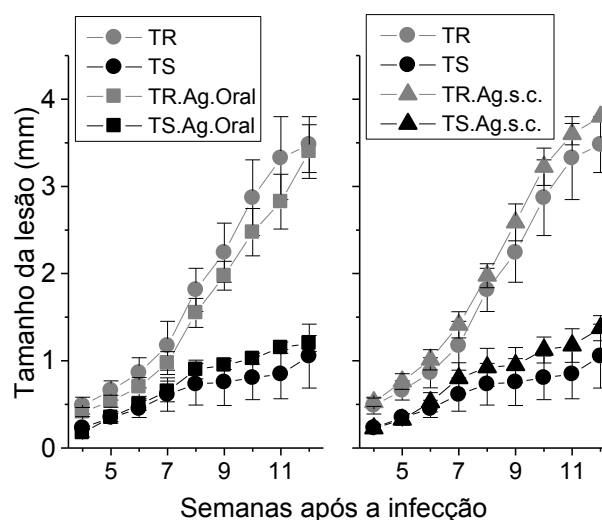


Figura 5: Imunização Oral e Subcutânea com antígeno bruto de promastigotas de *L. amazonensis*. Camundongos de ambas as linhagens, imunizados com 500µg IG de Ag *Leishmania* ou 50µg Ag *Leishmania* + CFA via subcutânea, e os controles não imunizados, foram infectados no coxim plantar com 10^7 promastigotas em fase estacionária de *L. amazonensis*. O tamanho da lesão foi medido por um paquímetro e expressa a diferença entre a pata infectada e não infectada. Resultado representativo de duas experiências independentes (média \pm SE, n = 4).

4.5 Efeito *bystander* com OVA solúvel e antígeno bruto de promastigotas

Para modulação do desenvolvimento da lesão utilizamos um protocolo onde o tratamento IG de OVA (indução de tolerância oral) foi seguido sete dias após, de injeção de antígeno bruto de *Leishmania* em emulsão com CFA e OVA solúvel no coxim plantar para observação de efeito *bystander* pela tolerância oral. A infecção com *Leishmania amazonensis* foi feita na pata colateral uma semana após. A lesão inflamatória foi medida em animais de ambas as linhagens tratadas oralmente com doses repetidas de 5mg ou 25mg em dois dias consecutivos. Os animais TR que ingeriram doses altas (25 mg) de OVA tiveram a lesão

inflamatória exacerbada (**Figura 6b**), e aqueles que ingeriram dose baixa (5 mg) tiveram a lesão reduzida (**Figura 6a**) quando comparados com o grupo controle não tratado por via IG.

Grupos	Dia -14	Dia -13	Dia -07	Dia 0
Experimental Figura A (Baixa Dose)	5 mg OVA IG	5 mg OVA IG	50 µg Ag <i>Leishmania</i> + CFA na pata direita + 50µg de Ova na mesma pata	Infecção na pata esquerda
Experimental Figura B (Alta Dose)	25 mg OVA IG	25 mg OVA IG	50 µg Ag <i>Leishmania</i> + CFA na pata direita + 50µg de Ova na mesma pata	Infecção na pata esquerda
Controle	Salina IG	Salina IG	Salina na pata direita	Infecção na pata esquerda
Controle (não mostrado)	Salina IG	Salina IG	50 µg Ag <i>Leishmania</i> + CFA na pata direita + 50µg de Ova na mesma pata	Infecção na pata esquerda

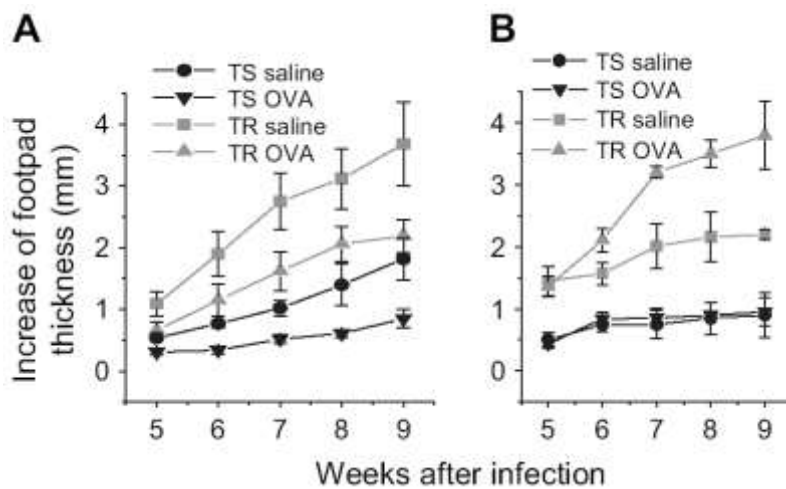


Figura 6: Efeito da injeção de OVA e Antígeno Bruto de *Leishmania* no Coxim Plantar Após Duas Doses Oraís Consecutivas de OVA. Para tratamento *bystander* os camundongos TR e TS foram tratados por via oral com duas doses de 05 mg (**Figura A**) ou 25mg (**Figura B**) de ovalbumina, e sete dias após a última dose oral injetados com OVA solúvel e antígeno bruto solúvel de *Leishmania* + CFA no mesmo coxim plantar. Uma semana após a imunização os animais foram infectados na pata colateral. O tamanho da lesão foi medido com paquímetro e expressa a diferença da pata antes e após a infecção. Resultado representativo de três experiências independentes (média \pm SE, n = 5).

4.6 Efeito *bystander* com OVA solúvel e promastigotas viáveis

Camundongos BALB/c, assim como os TR e TS, foram submetidos a um protocolo *bystander* após ingestão repetida de 5 ou 25mg de OVA durante dois dias consecutivos. A diferença deste protocolo em relação ao anterior é que o Ag bruto de *Leishmania* + CFA foram substituídos por promastigotas vivos injetados no mesmo coxim plantar. Quando submetidos a 25mg de OVA IG, a lesão foi potencializada tanto em camundongos TR como em BALB/c, entretanto, 5mg de OVA oral induziram supressão *bystander* reduzindo a lesão apenas na linhagem TR, não influenciando o desenvolvimento da lesão nos camundongos BALB/c e TS. Camundongos TS mostraram-se insensíveis aos protocolos *bystander* com 5 ou 25 mg de OVA IG, não potencializando ou suprimindo a lesão inflamatória (**Figura 7**).

Grupos	Dia -07	Dia -06	Dia 0
Experimental 5mg	5 mg OVA IG	5 mg OVA IG	Infecção na pata esquerda + 50µg de OVA na mesma pata
Experimental 25mg	25 mg OVA IG	25 mg OVA IG	Infecção na pata esquerda + 50µg de OVA na mesma pata
Controle	Salina IG	Salina IG	Infecção na pata esquerda + Salina na mesma pata

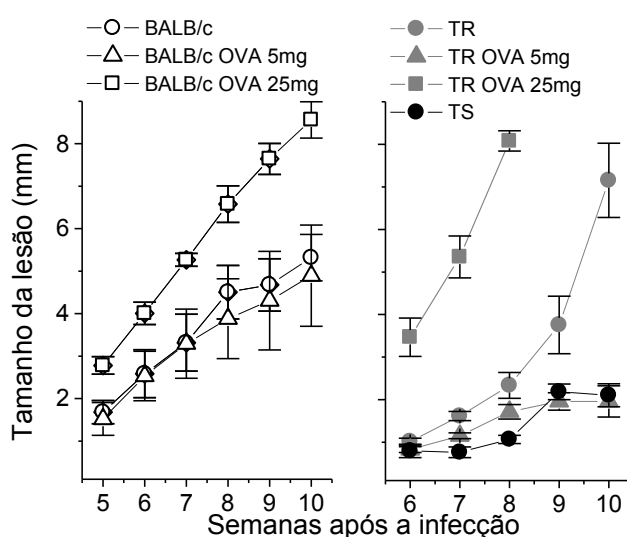


Figura 7: Efeito da injeção de OVA e *Leishmania* viável no Coxim Plantar após duas doses orais consecutivas de OVA. Comparação do efeito *bystander* entre camundongos TR, TS e BALB/c. Para indução de supressão *bystander* os camundongos TR, TS e BALB/c foram tratados por via IG com duas doses consecutivas de 5 mg ou 20 mg de OVA. Sete dias após a última dose IG os animais foram injetados com 50µg de OVA solúvel sem adjuvante junto com promastigotas viáveis de *Leishmania* no coxim plantar. O tamanho da lesão foi medido

por um paquímetro e expressa a diferença na pata infectada antes e após a infecção (média \pm SE, n = 4).

Como a dose de 5mg é considerada baixa dose por uns autores e alta por outros repetimos a experiência acima adicionando grupos com dose inequivocamente baixa. Os camundongos TS e TR foram submetidos a tratamento IG com doses baixas de 1mg e 5mg, e alta de 25mg de OVA, previamente à injeção no coxim plantar com o mesmo antígeno e *Leishmania* viável. Estes resultados confirmaram a indução de supressão com dose baixa e ativação com alta dose oral de OVA, como observado no protocolo em que antígenos solúveis de *Leishmania* foram usados para imunização no coxim plantar. Camundongos TR que ingeriram 1mg ou 5mg tiveram sua lesão diminuída (**Figuras 8**) sem diferença significativa entre elas, enquanto que aqueles que ingeriram 25 mg de OVA tiveram a lesão potencializada. Camundongos TS são insensíveis aos protocolos *bystander* utilizados, não potencializando ou suprimindo a lesão inflamatória (dado não mostrado).

Grupos	Dia -07	Dia -06	Dia 0
Experimental TR 1mg	1mg OVA IG	1mg OVA IG	Infecção na pata esquerda + 50 μ g de Ova na mesma pata
Experimental TR 5mg	5 mg OVA IG	5 mg OVA IG	Infecção na pata esquerda + 50 μ g de Ova na mesma pata
Experimental TR 25mg	25 mg OVA IG	25 mg OVA IG	Infecção na pata esquerda + 50 μ g de Ova na mesma pata
Controle TR	Salina IG	Salina IG	Infecção na pata esquerda + Salina na mesma pata

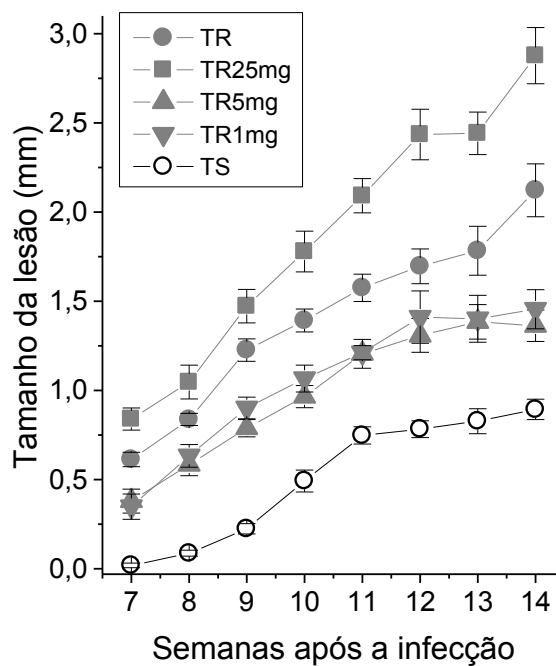


Figura 8: Efeito da injeção de OVA e *Leishmania* viável no Coxim Plantar após duas doses orais consecutivas de diferentes concentrações de OVA. Camundongos TR e TS, ingeriram OVA (1mg, **5mg e 25mg**) uma semana antes da injeção de OVA solúvel juntamente com a infecção. O tamanho da lesão foi medido por um paquímetro e expressa a diferença da lesão na pata antes e após a infecção. Resultado representativo de três experiências independentes (média \pm SE, n = 5).

4.7 Comparação entre os protocolos para indução de efeito *bystander* com antígeno bruto de promastigotas ou promastigotas viáveis em uma mesma experiência

Grupos	Dia -14	Dia -07	Dia 0
Experiência A OVA + <i>Leishmania</i> viável no sítio <i>bystander</i>		5 mg ou 25mg OVA IG	Infecção na pata esquerda + 50µg de Ova na pata mesma pata
Experiência B OVA + Ag bruto de <i>Leishmania</i> no sítio <i>bystander</i>	5 mg ou 25mg OVA IG	50 µg Ag <i>Leishmania</i> + CFA na pata direita + 50 µg de Ova na mesma pata	Infecção na pata esquerda
Controle TR			Infecção na pata esquerda

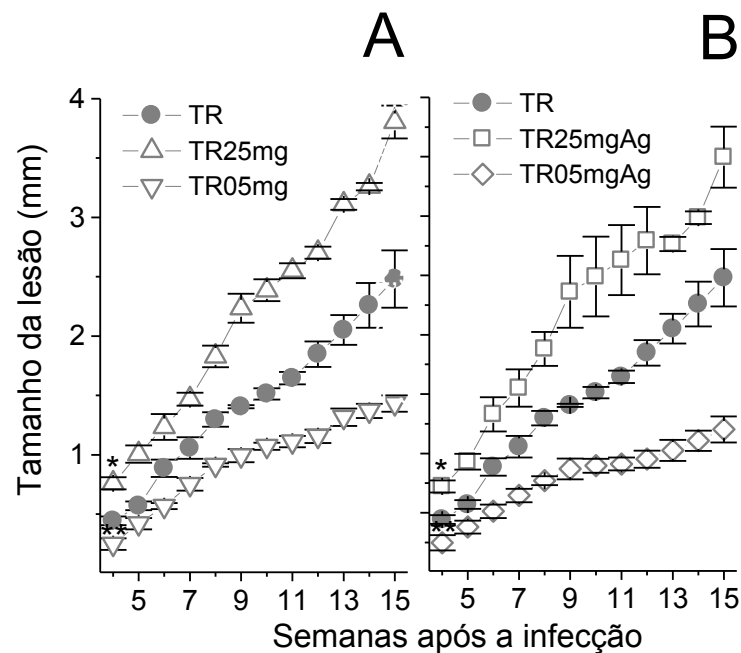


Figura 9: Comparação de diferentes protocolos e diferentes doses *bystander* na infecção de camundongos TR em uma mesma experiência. Camundongos TR ingeriram 5 ou 25mg de OVA uma semana antes da injeção de OVA solúvel junto com antígeno bruto solúvel (**Figura 9A**) ou com a infecção (**Figura 9B**). O tamanho da lesão foi medido por um paquímetro e expressa a diferença na pata infectada antes e após a infecção. Resultado representativo de três experiências independentes (média \pm SE, n = 5).

4.8 Carga parasitária nos camundongos TS e TR submetidos ao efeito *bystander*

A carga parasitária foi avaliada através da técnica de diluição limitante e da dosagem de fluorescência dos parasitas coletados da pata infectada (**Figura 10**). Animais TR tratados oralmente com 1mg, 2mg, 5mg ou 25 mg de OVA quando submetidos a protocolo *bystander* não apresentaram diferença significativa na carga parasitária, entre si ou quando comparados com o grupo controle que não ingeriu OVA. A linhagem TS não apresentou diferença na carga parasitária, que sempre foi maior do que na linhagem TR.

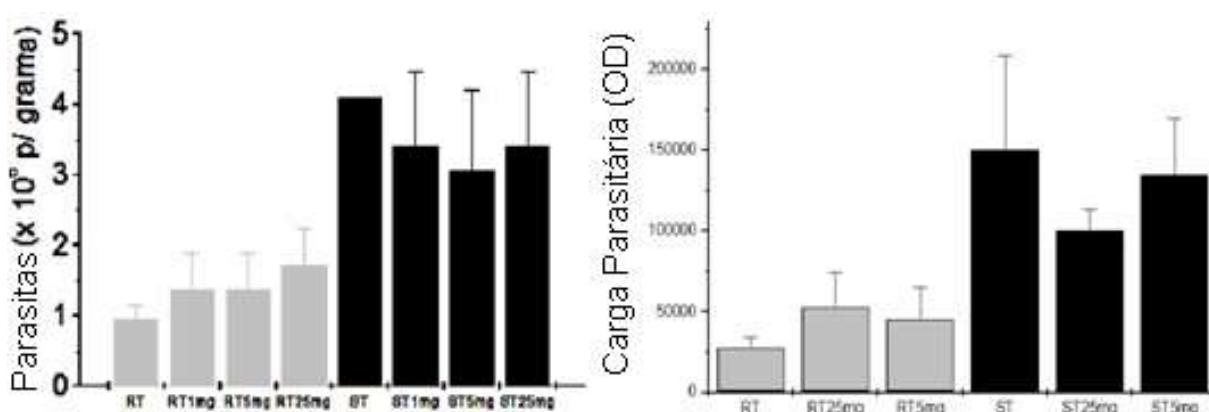


Figura 10: Carga Parasitária nos Camundongos TS e TR Submetidos ao Efeito *Bystander*. A carga parasitária foi medida por diluição limitante (Figura 10A) e emissão de fluorescência (Figura 10B) no sítio de infecção na 14^a semana. Os animais foram infectados com 10^7 promastigotas de *L. amazonensis* transfectada com gene de proteína fluorescente verde (MHOM/BR/75/Josefa strain). Resultado representativo de três experiências independentes (média \pm SD, n = 4).

4.9 Proliferação *in vitro* de células T obtidas de animais TR e TS submetidos a tratamento *bystander* após ingestão de baixas e alta dose de OVA

Células dos linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos TS e TR na 12^a semana pós-infecção com *L. amazonensis*, tratados IG com 1mg, 2mg ou 5mg de OVA antes de serem submetidos ao protocolo *bystander* foram estimuladas *in vitro* com ConA por 24h (**Figura**

11). Na linhagem TR, houve significativa redução na proliferação de linfócitos T ($p < 0.05$) dos animais que ingeriram 1 mg de OVA (Controle não infectado = $3,5 \pm 1,4$; Controle infectado = $7,5 \pm 2,5$; 1 mg OVA oral = $4 \pm 1,5 \times 10^3$ cpm). Aqueles que ingeriram 5 e 20mg de OVA não apresentaram resposta diferente do controle infectado. Os animais do grupo controle TS apresentaram maior resposta proliferativa que o grupo TR respectivo, e que foi reduzida em todos os grupos oralmente tratados com OVA (Controle não infectado = 8 ± 2 ; Controle infectado = 11 ± 2 cpm; Tratados com 1 mg OVA IG = $4,5 \pm 1,5$ cpm; Tratados com 5 mg OVA IG = 5 ± 1 cpm; Tratados com 25 mg OVA IG = $6 \pm 1 \times 10^3$ cpm) com significância em relação ao controle infectado de $p < 0,001$; $p < 0,01$, e $p < 0,01$ respectivamente.

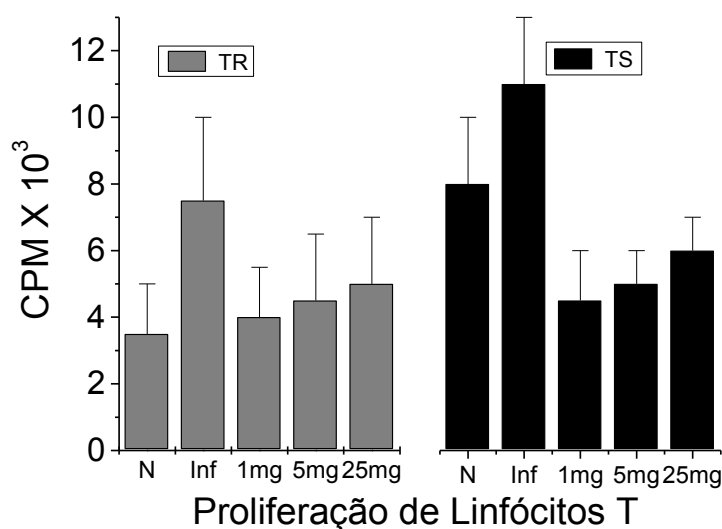


Figura 11: Proliferação celular de linfócitos de animais tratados oralmente com diferentes doses de OVA, submetidos a tratamento *bystander* e infecção com *L. amazonensis*. Cultura de linfócitos estimulados com ConA por 48 horas. Linfonodos poplíteos e inguinais coletados na 12^a semana de infecção de camundongos TS e TR infectados com 10^7 promastigotas. Animais foram tolerizados com 1, 5 ou 25 mg de ovalbumina oral uma semana antes da imunização com OVA solúvel junto com antígeno bruto solúvel de *Leishmania* + CFA no coxim plantar. Uma semana após foram infectados com *L. amazonensis* na pata colateral. A proliferação foi avaliada por incorporação de timidina tritiada (H3-TdR) nas últimas 6 horas de cultura (média ± SD, n = 3). Resultado representativo de duas experiências independentes.

4.10 Quantificação de IFN- γ e IL-10 em TS e TR infectados e submetidos a diferentes doses orais *bystander* de OVA

Sobrenadante de cultura de linfócitos da linhagem TS apresentaram títulos significativamente maiores de IFN- γ e IL-10 (**Figura 12**), quando comparados com a linhagem TR. Resultados dos animais infectados mostram aumento de IFN- γ em ambas as linhagens e aumento de IL-10 apenas nos TS (**Figura 12A e 12C**). Nos grupos TR tratados oralmente com doses baixas (tolerogênicas) de OVA (1mg e 5mg) observou-se diminuição de IFN- γ e aumento de IL-10, quando comparados com o grupo controle infectado (**Figuras 12B e 12D**). Entretanto, animais TR oralmente tratados com dose alta (potencializadora da lesão) de OVA (25 mg) mantiveram seus níveis altos de IFN- γ e baixos de IL-10, similares aos dos animais infectados. Nos grupos TS tolerizados observamos redução nos títulos de IFN- γ e aumento de IL-10, embora permaneçam altos, independente da dose oral a que foram submetidos.

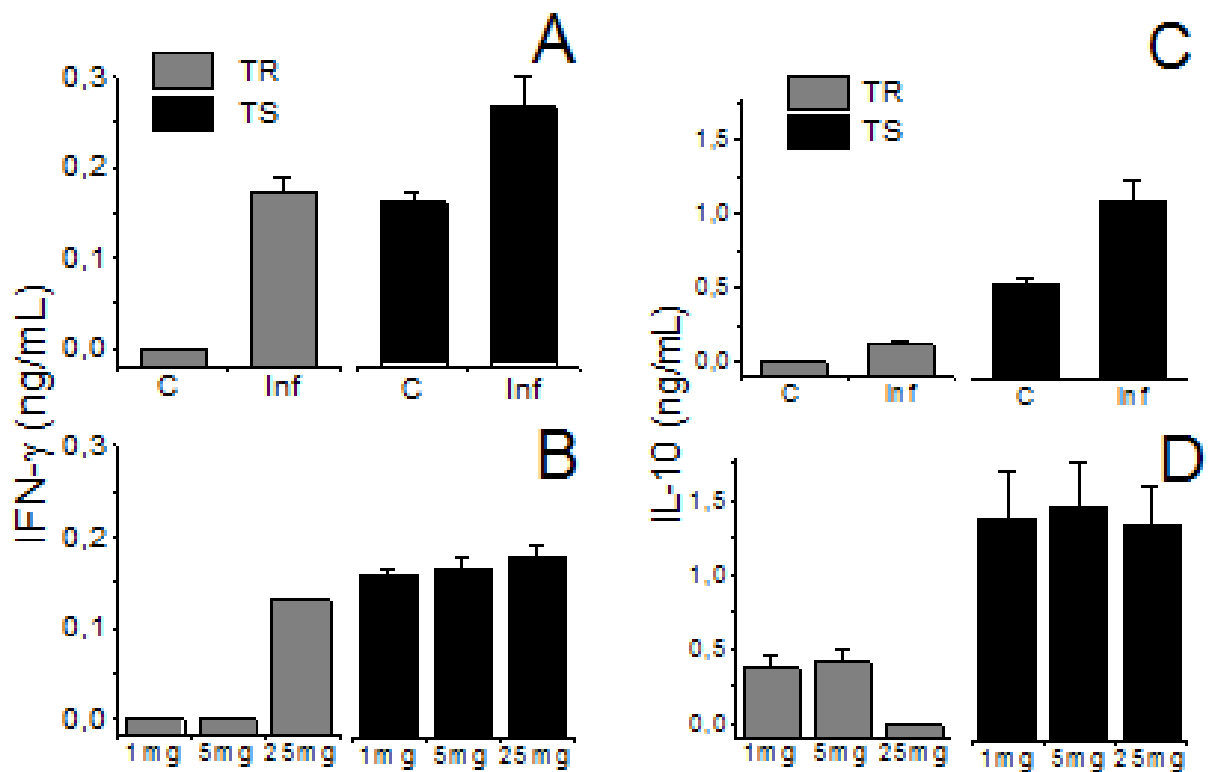


Figura 12: Quantificação de IFN- γ e IL-10 em TS e TR infectados e submetidos a diferentes doses orais *bystander* de OVA. Culturas de linfócitos estimulados com ConA por 48 horas. Linfonodos poplíteos e inguinais, foram coletados na 12^a semana de infecção de camundongos TS e TR, infectados com 10^7 promastigotas. Animais foram tolerizados com 1, 5 ou 25 mg de ovalbumina oral uma semana antes de imunizados com OVA solúvel junto com antígeno bruto solúvel de *Leishmania* + CFA no coxim plantar. Uma semana após foram infectados com *L. amazonensis* na pata colateral. Dosagem de citocinas de sobrenadantes foram coletados de culturas estimuladas com ConA por 48 horas (média \pm SD, n = 4). Resultado representativo de 3 experimentos independentes. **Figura 12A** e **Figura 12C** - animais normais e infectados não submetidos ao tratamento *bystander*. **Figura 12B** e **Figura 12D** - animais infectados, tratados oralmente com diferentes doses de OVA (1, 5 e 25mg) e submetidos ao tratamento *bystander*.

4.11 Frequência de células T reguladora CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ de linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos TS e TR infectados e não infectados

A caracterização dos células T CD4⁺ dos linfonodos drenantes, com o fenótipo regulatório CD25⁺ Foxp3⁺, para avaliação de sua participação na supressão *bystander* foi feita por citometria de fluxo. Os resultados mostraram que entre os animais não infectados, os animais TS exibiram maior frequência de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ que os TR. Camundongos infectados exibiram maior frequência de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ que os não infectados. Entretanto, não houve diferença entre TR e TS controle infectados ou entre os grupos *bystander*. Animais TR submetidos ao protocolo *bystander* com alta dose de OVA oral (25 mg) e expressando grande lesão inflamatória, apresentaram a mesma proporção de células T reguladoras CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ que aqueles que ingeriram baixa dose (5 mg).

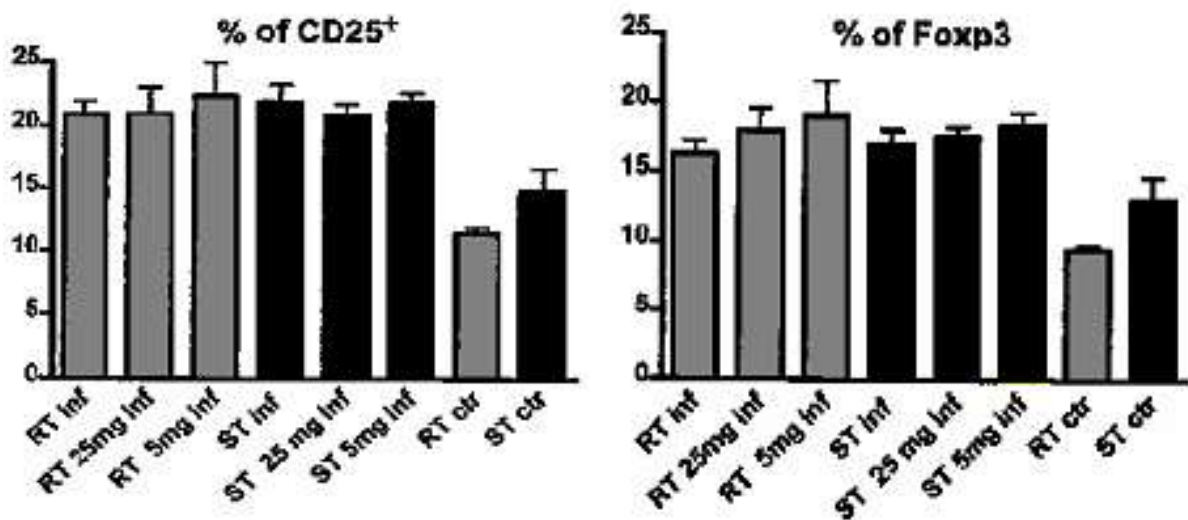


Figura 13: Frequência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ de linfonodos poplíteos e inguinais de camundongos TS e TR infectados e não infectados. A proporção das células CD25⁺ e Foxp3⁺ foi avaliada dentro os linfócitos CD3⁺ CD4⁺. Os linfonodos poplíteos e inguinais foram coletados na 12^a semana de infecção de camundongos infectados com 10⁷ promastigotas. Animais não infectados (C) e infectados (Inf) foram tratados com 1, 5 ou 25 mg de ovalbumina oral 1 semana antes de imunizados com OVA solúvel junto com uma dose imunizante de antígenos bruto solúvel de *Leishmania* + CFA, 1 semana antes da infecção na pata colateral (média ± SD, n = 4).

4.12 Efetividade da inibição da lesão inflamatória induzida por supressão *bystander* com baixas doses orais de OVA

Os animais TR infectados que serviram como controle e os tratados oralmente com 25mg de OVA foram eutanasiados e seus resultados são mostrados até a 16ª semana (Controle = $3,04 \pm 0,51$ mm; Tratados com 25 mg = $5,06 \pm 1,01$ mm). A lesão nos TR submetidos a supressão *bystander* com doses baixas de 1mg e 5 mg de OVA IG foi mantida baixa e constante por 12 meses (1mg = $1,52 \pm 0,25$ mm; 5 mg = $2,15 \pm 0,51$ mm) (**Figura 14**). Os animais TS infectados (controle) e aqueles tratados IG com diferentes doses de OVA não mostram diferença e foram representados na figura por apenas uma linha (48 semanas = $1,01 \pm 0,13$ mm).

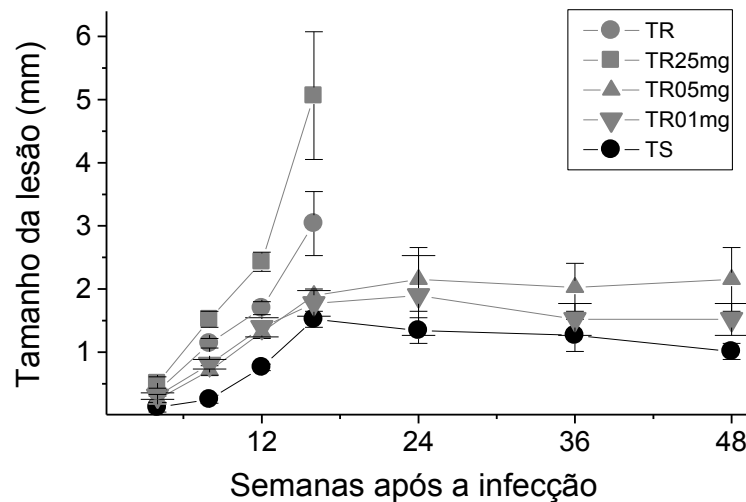


Figura 14: Redução da Lesão Inflamatória por Supressão *Bystander* pela Tolerância Oral a Doses Baixas de OVA. Camundongos TR ingeriram 5 ou 25mg de junto com antígeno bruto solúvel (**Figura 10A**) ou com a infecção. Camundongos TR e TS ingeriram 1, 5 e 25mg de OVA uma semana antes da injeção de OVA solúvel 8 horas após a infecção. Aqueles que ingeriram dose de 25 mg de OVA tiveram a lesão inflamatória exacerbada e foram submetidos a eutanásia. O tamanho da lesão foi medido por um paquímetro e expressa a diferença da lesão na pata antes e após a infecção. (média \pm SE, n = 5).

5 DISCUSSÃO

Nos últimos 20 anos, houve pouco progresso na conduta clínica de várias condições relacionadas à autotolerância e à regulação das respostas imunes tais como doenças auto-imunes, tolerância à transplantação, imunidade de tumores, alergia, e desenvolvimento de vacinas nas infecções crônicas. Apesar do interesse sobre a regulação da resposta imunológica pela Tolerância Oral, como terapia para doenças auto-imune, seu uso como ferramenta para o estudo da modulação da resposta imunológica nas infecções não tem sido o foco de interesse da comunidade científica.

Linhagens de camundongos produzidas por seleção genética bidirecional para fenótipos extremos de Tolerância Oral têm se mostrado boas ferramentas no estudo das infecções. Estudos de infecção experimental com, o fungo *Sporothrix schenckii* (Silva *et al*, 2001), o trematódeo *Schistosoma mansoni* (Silva *et al*, 2005), os protozoários *Toxoplasma gondii* (Leite, 2008), e *Leishmania amazonensis* (Tavares *et al*, 2006) estão sendo desenvolvidos com estas linhagens de camundongos. As primeiras observações de infecções com estas linhagens mostraram que os camundongos TR apresentam altos níveis de citocinas pró inflamatórias (principalmente TNF- α) tendo como consequência um alto índice de mortalidade ao contrário dos camundongos TS (Silva *et al.*, 2001).

O presente estudo com estas linhagens de camundongos utiliza a Tolerância Oral como ferramenta de interesse terapêutico na infecção por *L. amazonensis*. Publicado em 2006, o primeiro estudo com *Leishmania amazonensis* utilizando as linhagens TS e TR, mostrou grande divergência interlinhagem (**Figura 01** e Tavares *et al.* 2006) possivelmente decorrente do processo seletivo para a Tolerância Oral (da Silva *et al*, 1998). Os camundongos da linhagem TR são resistentes à indução de tolerância e são capazes de desenvolver respostas humorais e celulares mais potentes que os da linhagem TS. Por este motivo, o maior desenvolvimento da lesão na pata, após infecção experimental dos camundongos TR com *L. amazonensis*, nos permite inferir que o perfil inflamatório e pouco tolerogênico dos camundongos desta linhagem foram responsáveis pela exacerbação da lesão. Por outro lado, a atividade regulatória ao deprimir a inflamação no TS e evitar reação aguda letal, também inibe a resposta e a eliminação do microorganismo contribuindo para a manutenção da infecção. Esta característica da linhagem TS resulta em uma pequena lesão crônica sem conseguir promover a resolução da infecção característica das infecções murinas por *L.*

amazonensis (Sacks e Anderson, 2004). A linhagem TR (com perfil inflamatório) controla a proliferação do protozoário, entretanto, desenvolve uma grande lesão que progride até a amputação do membro infectado (Tavares *et al* 2006 e **Figura 1B**).

A análise da carga parasitária no sítio da infecção (**Figuras 1b, 1c** e Tavares *et al.* 2006), mostrou que o aumento da lesão nos camundongos TR não foi acompanhada de aumento no número de parasitas. Ao contrário, a maior carga parasitária estava presente nos camundongos TS que mostraram menor lesão inflamatória na pata inoculada. A relação inversa entre desenvolvimento de lesão e carga parasitária durante a infecção por *Leishmania* é coerente com as divergentes respostas inflamatórias agudas e crônicas dos TR e TS induzidas por outros agentes. Camundongos da linhagem TR quando infectados com *Sporothrix schenckii* produziram maior DTH e altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, entretanto mostraram maior taxa de mortalidade, devido à perda da estrutura de órgãos vitais como consequência da expansão dos granulomas por estas citocinas (da Silva *et al.* 2001).

Animais das linhagens TS e TR apresentam um perfil de citocinas não coerente com os perfis Th1 ou Th2. Animais TS normais produzem altos níveis de IL-10 e de IFN- γ . Quando infectados com *L. amazonensis*, camundongos TS mostram níveis aumentados destas citocinas, inclusive IL-4, enquanto a linhagem TR produz baixos níveis (Tavares *et al* 2006). Isto nos leva a acreditar que os animais TS produzem um ambiente regulatório, já que tanto IL-10 como IFN- γ , além de IL-27 são necessários para indução de tolerância oral (Shiokawa A, 2009) induzindo tolerância periférica através da supressão de Th17 (Ehreichiou D, 2007). Ao contrário, os TR produzem um ambiente inflamatório que modula negativamente sua produção de IL-10 e IFN- γ e positivamente IL-12 (da Silva MFS, 2003) e possivelmente IL-17. Estes resultados nos levam a supor que as atividades inflamatórias dos animais TR podem ter maior participação de citocinas da família IL-12 (IL-6, IL-23, IL-27), do que de IFN- γ . Por outro lado, quando infectados com *L. amazonensis*, ambas as linhagens produzem altos níveis de TGF- β (**Figura 2F**). A TGF- β é uma citocina com papéis múltiplos no sistema imunológico. O resultado do efeito de TGF- β em estimular ou inibir linfócitos T depende fortemente de seu estágio de diferenciação e do contexto de citocinas (Gorham *et al.*, 1998, Cerwenka & Swain, 1999). Assim, existe a possibilidade de TGF- β junto com IL-10 estimular a presença de Treg nos animais TS, e também de células inflamatórias efetoras Th17 nos animais TR quando na presença de IL-6. A produção de IL-6 não foi ainda avaliada nestas linhagens.

A supressão da reatividade imunológica é atualmente atribuída a uma população de células T regulatórias dedicadas a manter a tolerância periférica para auto-antígenos ou prevenir respostas imunopatológicas danosas. Células T regulatórias, obtidas de hospedeiros não manipulados são definidas por marcadores tais como CD25, FOXP-3 e CTLA-4 e podem mediar sua função por liberação de citocinas inibitórias tais como TGF- β e IL-10 e ou mecanismos dependentes de contato.

A linhagem TS apresenta intrinsecamente uma proporção maior de células Treg (CD25⁺Foxp3⁺) que a linhagem TR (**Figuras 4d e 4e**), e inicialmente, a diferença dos perfis inflamatórios destas linhagens poderia ser atribuída a maior ou menor quantidade de Treg. Entretanto, animais de ambas as linhagens atingiram a mesma proporção de células Treg após infectados com *L. amazonensis* (**Figuras 4d e 4e**). Como exemplo, uma explicação para as diferenças das respostas imunes na infecção entre TS e TR poderia ser a presença de moléculas como a CD103 (cadeia α_E da integrina $\alpha_E\beta_7$) em células Treg que têm o papel de retê-las no sítio da infecção, tornando o hospedeiro susceptível e contribuindo para a infecção crônica (Suffia I. *et al.*, 2005). Outra explicação seria a existência de mecanismos de resistência à indução de tolerância nos camundongos TR, como a presença de citocinas pró-inflamatórias, maior número de mastócitos (Silva *et al.*, 2006), ou a possível participação de células Th17. Também é sugerido que os parasitos desenvolvem meios de manipular a população Treg natural garantindo condições seguras de sobrevivência do hospedeiro vertebrado por um extenso período de tempo (Belkaid *et al.* 2006).

Apesar da regulação da patologia imunológica mediada por células T ser bem documentada, não é bem entendido como muitos diferentes tipos de células T regulatórias podem atuar, como elas estão relacionadas e como funcionam. De acordo com Stockinger *et col.* (2001) a manutenção de um sistema imune periférico balanceado pode não ser responsabilidade de um único subconjunto de células T dedicadas à regulação imunológica. Barthlott *et col.* (2003) mostram que células T não relacionadas àquelas da resposta patológica podem proteger os camundongos da patologia tão bem como as T reg CD25⁺, e que estas células podem ser encontradas no repertório de células T CD4 virgens depletado de T CD25⁺. Tais células T CD4⁺ mostram aumentada expansão homeostática e expressam altos níveis de CD5. O CD5 é um regulador negativo de sinalização TCR e possui alto potencial de expansão homeostática para sinais MHC-auto-peptídeos. Células T CD5⁺ no timo asseguram que timócitos com alta avidéz para MHC-auto-peptídeos não sejam abertamente auto-reativas na periferia (Wong *et col.* 2001). Estas células além de terem propensão para proliferação

homeostática *in vivo* podem proteger da doenças. Timócitos, células T maduras, e células B1 são hiper-respondedoras para sinalização TCR/BCR em camundongos deficientes de células T CD5. Entretanto, células T se desenvolvem normalmente em camundongos deficientes de CD5 (Tarakhovsky et col, 1994).

Como a participação de células T reg e das citocinas inibitórias não ficou bem definida na infecção por *L. amazonensis* em nossos resultados, as características dos camundongos TS não podem prescindir da participação de células T CD5+, por seu potencial de expansão homeostática e sua capacidade de manter a tolerância periférica independente da especificidade da reatividade imunológica.

Os estudos dos fenômenos de regulação das respostas imunes nas infecções têm despertado grande interesse, pela possibilidade de compreensão de mecanismos importantes para resolução de várias patologias e na elaboração de fármacos e vacinas. A imunização com antígeno bruto de *Leishmania* por via oral ou via subcutânea, em ambas as linhagens de camundongos, não impediu o aumento da lesão (**Figura 6**). A modulação da resposta imunológica às infecções pela tolerância oral é muito pouco estudada, havendo poucas informações sobre o uso desta forma de tolerância para modular os processos patológicos e inflamatórios desencadeados pela infecção (Pinto *et al*, 2003). Por conta disso, desenvolvemos protocolos baseados no fenômeno de supressão *bystander* da tolerância oral que é um mecanismo capaz de modular respostas sistêmicas para antígenos diferentes daquele administrado oralmente. Atividade *bystander* pela tolerância oral a OVA, foi induzida nos camundongos TR e TS, antes da infecção com *L. amazonensis*. A tolerância oral foi induzida para altas e baixas doses de OVA (1, 2, 5 e 20 mg) e o efeito *bystander* estimulado pela injeção subcutânea de OVA e antígeno bruto de *Leishmania* em CFA. Os TR que ingeriram 25 mg de OVA tiveram a lesão inflamatória exacerbada, e aqueles que ingeriram baixas doses tiveram lesão reduzida, quando comparados com o grupo controle. A linhagem TS não apresentou diferença no desenvolvimento da lesão nos diferentes protocolos *bystander* a que foi submetida (**Figura 6**). Resultados similares a estes foram obtidos quando o parasito viável era injetado no sítio *bystander* junto com OVA (**Figura 7 e Figura 9**). Isto aponta também para a participação de antígenos liberados dos promastigotas na supressão *bystander*. As respostas dos camundongos BALB/c foram intermediárias aos dos animais TR e TS, que mostram fenótipos extremos também na infecção por *Leishmania* (**Figura 7**). Entretanto, o efeito *bystander* com doses baixas ou altas não alterou a carga parasitária mostrando sua

dissociação com a modulação da patogenia. Estes resultados sugerem que o protocolo *bystander* não tem efeito na viabilidade do parasito.

A proliferação de células de linfonodos em cultura estimuladas com ConA, de animais TS submetidos a diferentes doses de OVA oral, foi significativamente reduzida comparada com os grupos controles infectados ou não infectados. A proliferação de células dos camundongos TR tratados IG com 1 mg de OVA foi significativamente reduzida. Porém o tratamento IG com 5 mg ou 25mg de OVA não foi diferente do controle infectado (**Figura 11**). Assim, o desenvolvimento de células T associadas com o aumento da lesão inflamatória *in vivo* poderia ser inibido pela supressão *bystander* com baixas doses IG de OVA, levando a redução da lesão.

A linhagem TS apresentou sempre títulos maiores de IFN γ (**Figura 3C**) e IL-10 (**Figura 3B**), quando comparada com a linhagem TR. Nos animais TS infectados, observamos aumento significativo nos títulos de IFN γ e IL-10 quando comparados com os grupos controle respectivos. Nos grupos TR *bystander* tratados com baixa dose IG (1mg e 5mg) observamos diminuição dos títulos de IFN γ (Figura 12B) e o aumento dos títulos de IL-10 (Figura 12D), quando comparados com os grupos controle (Figura 12A e Figura 12C) infectados sugerindo mudança para um perfil regulatório condizente com a diminuição do tamanho da lesão inflamatória nestes grupos.

Podemos sugerir que os níveis de IFN- γ não se mostraram associados a redução da carga parasitária em TR e TS, já que na linhagem TS observou-se alta carga parasitária apesar do alto nível de IFN- γ enquanto que a linhagem TR apresentou menor nível de IFN- γ e baixa carga parasitária. Estes resultados são coerentes com os achados de)que atribuem ao IFN γ um papel ambíguo, pois ao mesmo tempo em que a ativação dos macrófagos por IFN γ é necessária para matar promastigotas, na ausência de outros fatores estimula a replicação de amastigotas dentro dos macrófagos infectados.

Tem sido atribuído às células Treg e não às células Th2, o papel principal na produção de IL-10 durante a infecção por *Leishmania* em camundongos (. A produção de IL-10 por células Treg foi observada durante a infecção por *L. amazonensis* em camundongos C57BL/6, como um mecanismo que inibe a lesão tecidual pela resposta imunológica durante a fase inicial da infecção, embora esta modulação seja superada posteriormente por outras células T efectoras (Ji *et al.*, 2005). Assim, a atividade de células Treg não seria responsável pela exacerbação da lesão.

Utilizando protocolos apropriados foi possível inibir a lesão inflamatória em camundongos TR por supressão *bystander* da Tolerância Oral após ingestão de doses baixas de OVA (1, 2 e 5 mg) mas não com dose alta (25mg). É conhecido que na Tolerância Oral baixas doses de Ag oral induzem células T CD4⁺ CD25⁺ regulatórias periféricas e que altas doses (normalmente mais de 10 mg por animal) induzem anergia/deleção de células T (Weiner, 1994; Weiner, 1997; Lanoue *et al.*, 1997; Blanas *et al.*, 1996). No entanto, foi demonstrado por Millington *et al* (2004) que a supressão *bystander* não é consequência de deleção clonal ou redução da expansão clonal das células T *bystander*, mas da alteração de sua diferenciação funcional. Uma questão adicional na tolerância *bystander*, é se o fenômeno é induzido apenas por protocolos no qual a exposição oral inicial ao Ag produz tolerância, ou se células T re-expostas ao Ag na periferia, por sua frequência aumentada ou a melhor habilidade para interagir com APCs (Células Apresentadoras de Antígenos), podem simplesmente prevenir ativação de uma população *bystander*, por competir pelo acesso ao Ag e/ou fatores de crescimento (Barthlott *et al*, 2003).

Nossos resultados de Infecção com *L. amazonensis* sugerem que nem sempre ocorre supressão *bystander* quando a exposição oral inicial ao Ag produz Tolerância Oral. Isto depende do perfil genético do animal. A resposta inflamatória *bystander* em TR pode ser prevenida por baixa dose e potencializada por alta dose (Tavares *et al.* 2006), apesar de tanto baixa ou quanto alta dose de OVA (5 ou 25 mg respectivamente) são reconhecidamente indutoras de tolerância oral. Resultados do Laboratório (não publicados) descrevem que os camundongos TR apresentam 10 x mais proteínas intactas no soro após ingestão de OVA do que os camundongos TS. É conhecido que moléculas íntegras com capacidade imunogênica são encontradas na circulação após ingestão (Watanabe *et al*, 2002). Considera-se que 1% da proteína ingerida é absorvida intacta pela mucosa intestinal (Bernstein et Ovary, 1968). É possível que células T na periferia, estimuladas por esta OVA circulante “imunogênica”, poderiam ser capazes de se sobrepor às células T regulatórias ativadas por APC-OVA que migraram do intestino. Assim, células T durante o contato com Ags de *Leishmania amazonensis* no sítio *bystander*, seriam estimuladas (ao invés de serem inibidas por células T regulatórias) por citocinas que foram previamente ativadas por OVA “imunogênica” ou por APCs (DCs e macrófagos). Isto poderia justificar a exacerbação da lesão em animais TR tratados oralmente com alta dose (25 mg OVA).

Dentre os muitos tipos de APC profissionais (incluindo DCs, células B e macrófagos) envolvidos nas respostas à ingestão de Ags, as DCs são propostas como importantes na

discriminação entre tolerância e imunidade. Em um dos primeiros trabalhos descrevendo a importância das DCs na tolerância oral, camundongos tratados com Flt3-ligante (um fator de crescimento que expande DCs *in vivo*) exibiram aumentada tolerância oral sistêmica (Viney *et al*, 1998). Resultados de Kobets *et al* (2003) indicam que Ags imunologicamente relevantes podem ser detectados em DCs CD8a⁻ nos tecidos linfóides locais e sistêmicos após ingestão de Ags na forma tolerogênica ou imunogênica. Assim, DCs poderiam ser as células pivô na discriminação entre tolerância e imunidade, também no sítio *bystander*, após ingestão de Ag.

Tem sido descrito que células TCD4⁺ induzidas por Ag oral educam, através de interações de superfície e de IL-4 e IL-10, as DCs (células dendríticas) a induzirem células T naive a produzirem estas mesmas citocinas (Alpan *et al*, 2004). Também, células T em resposta à imunização podem educar DCs a ativarem T killers, e induzirem células T naive a produzirem IFN- γ (Ridge *et al*, 1998; Schoenberger *et al*, 1998; Bennet *et al*, 1998). Estas células TCD4⁺ não necessitam reconhecer o mesmo Ag reconhecido pela célula T naive para a qual as DCs educadas enviam a mensagem (Alpan *et al*, 2004). Assim, DCs educadas por TCD4⁺ induzidas por Ag oral a reconhecerem OVA, poderiam induzir células T naive que reconhecem Ags de *Leishmania* a produzirem citocinas pró- ou anti-inflamatórias.

Um outro mecanismo potencial que controla ativação imunológica versus supressão é o corrente dogma do estado de maturação das APCs, em que DCs imaturas e APCs não profissionais que não expressam suficientes moléculas coestimulatórias induzem apoptose ou anergia de células T ou diferenciação de células T supressoras, enquanto DCs maduras que expressam altos níveis de moléculas coestimulatórias suportam ativação imunológica. Um outro mecanismo pelo qual APCs controlam tais efeitos opostos envolve sua habilidade para modular a produção de citocinas pró- (IL-6, GM-CSF, e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β). Cabe aqui lembrar que IL-6 junto com TGF- β promove a geração de Th17 que é uma célula inflamatória.

Trabalho recente (Ehrichtou *et al*, 2007), mostra a interferência de DCs e células Th17 na Tolerância Oral. APCs de camundongos deficientes de CD11b apresentam aumentada produção de IL-6 que promove subsequente diferenciação preferencial de células T naive para células Th17. Conseqüentemente, ingestão de Ag seguida de imunização de camundongos CD11b^{-/-} resulta em significativa produção de IL-17 dentro do linfonodo drenante que interfere com o estabelecimento de tolerância oral. Assim, é concluído que CD11b facilita a tolerância oral por suprimir a diferenciação imunológica de Th17. Embora não conclusivas, estas justificativas permitem criar argumentos que expliquem nossos

resultados em que os animais TR apresentam supressão *bystander* para baixas doses e ativação *bystander* para altas doses de OVA oral.

6 CONCLUSÕES

1. As linhagens TR e TS apresentam relação inversa entre carga parasitária e lesão inflamatória.
2. O maior desenvolvimento da lesão na pata, após infecção dos camundongos TR com *L. amazonensis*, nos permite inferir que o perfil inflamatório e resistência à tolerância dos camundongos TR foram responsáveis pela exacerbação da lesão.
3. Os níveis de IFN- γ não estão associados ao controle parasitário em TR e TS, já que na linhagem TS observa-se alta carga parasitária e alto nível desta citocina enquanto que a linhagem TR apresenta menor nível de IFN- γ e baixa carga parasitária.
4. As atividades inflamatórias dos animais TR podem ter maior participação de citocinas da família IL-12 (IL-6, IL-23) e de células inflamatórias efetoras Th17, do que de IFN- γ .
5. A retenção das células Treg no sítio de infecção é uma possibilidade para explicar a menor lesão e a maior carga parasitária nos TS.
6. Nem sempre ocorre supressão *bystander* quando a exposição oral inicial ao Ag produz Tolerância Oral. Isto depende do perfil genético do animal.
7. A supressão *bystander*, induzida por baixas doses de OVA IG é capaz de reduzir a lesão inflamatória na infecção por *L. amazonensis* em camundongos TR, sugerindo a participação de tolerância ativa.
8. O efeito *bystander* com doses baixas ou altas não altera a carga parasitária mostrando sua dissociação com a modulação da inflamação.
9. A maior absorção de OVA intacta na circulação (ova imunogênica) e menor frequência de CD11b (que estimularia resposta Th17) poderiam explicar o aumento da lesão na linhagem TR, após alta dose de ova oral
10. Uma melhor compreensão dos mecanismos regulatórios da imunidade inata e adaptativa nas fases iniciais da infecção é necessária para o desenvolvimento de protocolos capazes de limitar a inflamação e promover a eliminação dos parasitas.

REFERÊNCIAS

Afonso, LCC., Scott, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 1993; 61:2952-2959.

Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, De Sauvage FJ, Gurney AL. Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J. Biol Chem.* 2003; 278:1910–1914.

Aggarwal S, Gurney AL. IL-17: prototype member of an emerging cytokine family. *J. Leukoc Biol.* 2002; 71:1–8 ,

Alpan O, Bachelder E, Isil E, Arnheiter H, Matzinger P. 'Educated' dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells. *Nat Immunol.* 2004 Jun;5(6):615-22.

Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Barbosa TC, Cumano A, Bandeira A. CD25+ CD4+ T cells regulate the expansion of peripheral CD4 T cells through the production of IL-10. *J. Immunol.* 2001; 166:3008.

Artis D, Villarino A, Silverman M, He W, Thornton EM, Mu S et al. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J. Immunol.* 2004; 173:5626–34.

Bach JF. Regulatory T cells under scrutiny. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3:189-98.

Baecher-Allan C, Brown JA, Freeman GJ, Hafler DA. CD4+CD25high regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 167:1245-53

Barral-Netto M, Cardoso SA, Barral A. Different patterns of disease in two inbred mouse strains infected with a clone of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Acta Trop.* 1987 Mar;44(1):5-11

Barthlott T, Kassiotis G and Stockinger B. T cell regulation as a side effect of homeostasis and competition. *J. Exp. Med.* 2003 Feb; 197(4): 451–460

Belkaid Y, Blank RB and Soffia I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. *Immunological Reviews.* 2006; 212:287-300.

Belkaid Y, Piccirillo CA, Mendez S, Shevach EM, Sacks DL. CD4+CD25+ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. *Nature*. 2002 Dec 5;420(6915):502-7.

Belosevic M, Finbloom DS, Van Der Meide PH, Slayter MV, Nacy CA. Administration of monoclonal anti-IFN-gamma antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major*. *J Immunol*. 1989 Jul;143(1):266-74.

Berman, JD. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev Infect Dis*. 1988;10(3):560-86

Bernstein ID, Ovary Z. Absorption of antigens from the gastrointestinal tract. *Int Arch Allergy Appl Immunol*. 1968;33(6):521-7.

Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006; 441:235–38

Biozzi G, Mouton D, Heumann AM, Bouthillier Y, Stiffel C, Mevel JC. Genetic analysis of antibody responsiveness to sheep erythrocytes in crosses between lines of mice selected for high or low antibody synthesis. *Immunology*. 1979 Mar;36(3):427-38.

Biozzi G., Mouton D, Sant'Anna OA., Passos HC, Gennari M, Reis MH, et al. Genetics of Immunoresponsiveness to Natural Antigens in the Mouse. *Curr. Top. Microbiol. Immunol*. 1979; 85:31-97.

Blanas E, Carbone FR, Allison J, Miller JF, Heath WR. Induction of autoimmune diabetes by oral administration of autoantigen. *Science*. 1996 Dec 6;274(5293):1707-9.

Boyartchuk V, Dietrich W. Genetic dissection of host immune response. *Genes Immun*. 2002; 3:119.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001; 27:68–73.

Cerwenka A, Swain SL. TGF- β 1: immunosuppressant and viability factor for T lymphocytes. *Microbes and Infection*. 1999; 1:1291-6

Chen Y, Inobe J, Weiner HL. Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8-depleted mice: both CD4⁺ and CD8⁺ cells mediate active suppression. *J Immunol.* 1995;155:910-916.

Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J-I, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T-cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 1994;265:1237-1240.

Colgan J, Rothman P. All in the family: IL-27 suppression of TH-17 cells. *Nature Immunology.* 2006; 7(9):899-901.

Conceição-Silva F, Perlaza BL, Louis JÁ, Romero P. *Leishmania major* infection in mice primes for specific major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ cytotoxic T cell responses. *Eur J Immunol.* 1994 Nov;24(11):2813-7.

Cong Y, Weaver CT, Lazenby A, Elson CO. Bacterial-reactive T regulatory cells inhibit pathogenic immune responses to the enteric flora. *J. Immunol.* 2002; 169:6112.

Coutinho A. MHC restriction in T/B cell collaboration: is the controversy settled? *Ann Immunol.* 1984; 135D(1):71-3.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature.* 2003; 421:744–748.

Ehreichiou D, 1 Xiong Y, Xu G, Chen W, Shi Y and Zhang L. CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *JEM.* 2007; 204: 1519-24.

Falconer DS. *Introduction to Quantitative Genetics.* Second Edition. Longman Inc., 1981, New York.

Farrell JP, Muller I, Louis JA. A role for Lyt-2⁺ T cells in resistance to cutaneous leishmaniasis in immunized mice. *J Immunol.* 1989 Mar 15;142(6):2052-6.

Fujita S, Sato Y, Sato K, Eizumi K, Fukaya T, Kubo M et al., Regulatory dendritic cells protect against cutaneous chronic graft-versus-host disease mediated through CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Blood.* 2007; 110:3793–3803.

Gershon RK and Kondo K. Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*. 1970 May; 18(5):723–737.

González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis (Review). Cochrane review The Cochrane Library 2009, Issue 2

Gorham JD, Güler ML, Fenoglio D, Gubler U, Murphy KM. Low dose TGF-beta attenuates IL-12 responsiveness in murine Th cells. *J Immunol*. 1998 Aug 15;161(4):1664-70.

Groux H, O'Garra A, Bigler M, Rouleau M, Antonenko S, de Vries JE, Roncarolo MG. A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature*. 1997; 389:737.

Guevara-Mendoza O, Une C; Carreira PF, Örn A. Experimental infection of Balb/c mice with *Leishmania panamensis* and *Leishmania mexicana*: induction of early IFN- γ but not IL-4 is associated with the development of cutaneous lesions. *Scand. J. Immunol*. 1997; 46: 35-40.

Gumanovskaya ML, Myers LK, Rosloniec EF, Stuart JM, Kang AH. Intravenous tolerization with type II collagen induces interleukin-4-and interleukin-10-producing CD4+ T cells. *Immunology*. 1999; 97:466.

Gurunathan S, Sacks DL, Brown DR, Reiner SL, Charest H, Glaichenhaus N, Seder RA. Vaccination with DNA encoding the immunodominant LACK parasite antigen confers protective immunity to mice infected with *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1997 Oct 6;186(7):1137-47

Gutgemann I, Fahrner AM, Altman JD, Davis MM, Chien YH. Induction of rapid T cell activation and tolerance by systemic presentation of an orally administered antigen. *Immunity*. 1998; 8:667.

Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, Ishii K, Yamanaka A, Takeda A et al. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity*. 2003; 19:657–67

Hill JO, Awwad M, North RJ. Elimination of CD4+ suppressor T cells from susceptible BALB/c mice releases CD8+ T lymphocytes to mediate protective immunity against *Leishmania*. *J Exp Med*. 1989 May 1;169(5):1819-27.

Hölscher C, Hölscher A, Rückerl D, Yoshimoto T, Yoshida H, Mak T et al. The IL-27 receptor chain WSX-1 differentially regulates antibacterial immunity and survival during experimental tuberculosis. *J. Immunol.* 2005; 174:3534–44

Hölscher C, Arendse B, Schwegmann A, Myburgh E, Brombacher F. Impairment of alternative macrophage activation delays cutaneous leishmaniasis in nonhealing BALB/c mice. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):1115-21.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003; 299:1057-61.

Huber M, Timms E, Mak TW, Rollinghoff M, Lohoff M. Effective and long-lasting immunity against the parasite *Leishmania major* in CD8-deficient mice. *Infect Immun.* 1998 Aug; 66(8):3968-70.

Hubert P, Jacobs N, Caberg JH, Boniver J e Delvenne P. The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil?, *J Leukoc Biol.* 2007; 82:781–794

Ibanez OM, Stiffel C, Ribeiro OG, Cabrera WK, Massa S, De Franco M et al. Genetics of non-specific immunity: I. Bidirectional selective breeding of lines of mice endowed with maximal or minimal inflammatory responsiveness. *European J. Immunol.* 1992; 22:2555-63.

Ito T, Yang M, Wang YH, Lande R, Gregorio J, Perng OA et al. Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand. *J Exp Med.* 2007; 204:105–115

Izcue A, Coombes JL, Powrie F. Regulatory T cells suppress systemic and mucosal immune activation to control intestinal inflammation. *Immunol Rev.* 2006; 212:256– 271.

Ji J, Masterson J, Sun J, Soong L. CD4+CD25+ regulatory T cells restrain pathogenic responses during *Leishmania amazonensis* infection. *J Immunol.* 2005; 174:7147–7153.

Ji J, Sun J, Soong L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect. Immun.* 2003; 71:4278-4288.

Jonuleit H, Schmitt E, Stassen M, Tuettenberg A, Knop J, Enk AH. Identification and functional characterization of human CD4+ CD25+ T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J Exp Med.* 2001; 193:1285-94.

Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA et al. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2001; 2:301-306.

Kastelein RA, Hunter CA and Cua DJ. Discovery and Biology of IL-23 and IL-27: Related but Functionally Distinct Regulators of Inflammation. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25:221–42.

Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 212:86–98.

Kima PE, Ruddle NH, McMahon-Pratt D. Presentation via the class I pathway by *Leishmania amazonensis*-infected macrophages of an endogenous leishmanial antigen to CD8⁺ T cells. *J Immunol.* 1997 Aug 15;159(4):1828-34.

Kobets N, Kennedy K, Garside P. 2003. An investigation of the distribution of antigen fed in tolerogenic or immunogenic forms. *Immunology Letters* 88:147-155.

Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity.* 2004;21:467–476.

Lafaille MA, Curotto de, Lafaille JJ. CD4⁺ regulatory T cells in autoimmunity and allergy. *Curr Opin Immunol.* 2002; 14:771-8.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2005; 201:233–240.

Lanoue A, Bona C, von Boehmer H, Sarukhan A. Conditions that induce tolerance in mature CD4⁺ T cells. *J. Exp. Med.* 1997; 185, 405–414.

Lepault F, Gagnerault MC. Characterization of peripheral regulatory CD4⁺ T cells that prevent diabetes onset in nonobese diabetic mice. *J Immunol.* 2000; 164:240-7.

Levings MK, Sangregorio R, Sartirana C, Moschin AL, Battaglia M, Orban PC, M. et al. Human CD25⁺CD4⁺ T suppressor cell clones produce transforming growth factor, but not interleukin 10, and are distinct from type 1 T regulatory cells. *J. Exp. Med.* 2002; 196:1335.

Liew FY Functional heterogeneity of CD4+ T cells in leishmaniasis. *Immunol Today*. 1989 Feb;10(2):40-5. Review.

Lohoff M, Prechtel S, Sommer F, Roellinghoff M, Schmitt E, Gradehandt G. et al. A multidrug-resistance protein (MRP)-like transmembrane pump is highly expressed by resting murine T helper (Th) 2, but not Th1 cells, and is induced to equal expression levels in Th1 and Th2 cells after antigenic stimulation *in vivo*. *J Clin Invest*. 1998 Feb 1;101(3):703-10.

Lohr J, Knoechel B, Abbas AK. Regulatory T cells in the periphery. *Immunol Rev*. 2006; 212: 149–162.

Louis JA, Titus RG, Mendonca SC, Marchal G, Milon G. Attempts to assess the contribution of T lymphocytes from the L3T4+ and LYT2+ subsets in the immunological control of cutaneous leishmaniasis. *Lepr Rev*. 1986 Dec; 57 Suppl 2:255-61

Miller A, Lider O, Weiner HL. Antigen-driven *bystander* suppression following oral administration of antigens. *J. Exp. Med*. 1991; 174:791-798.

Millington OR, Mowat AM, Garside P. Induction of *Bystander* Suppression by Feeding Antigen Occurs despite Normal Clonal Expansion of the *Bystander* T Cell Population. *J. Immunology*. 2004; 173:6059.

Milon G, Marchal G. Radiosensitivity of the circulation of DTH effector T lymphocytes: an accurate estimate using a quantitative assay. *Adv Exp Med Biol*. 1985; 186:629-36

Morelli AE, Thomson AW. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:610–621

Moseley TA, Haudenschild DR, Rose L, Reddi AH. Interleukin-17 family and IL-17 receptors. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2003; 14:155–174.

Mosmann TR, Li L, Sad S. Functions of CD8 T-cell subsets secreting different cytokine patterns *Semin Immunol*. 1997 Apr; 9(2):87-92

Mouton D, Siqueira M, Sant'Anna OA, Bouthillier Y, Ibanez O, Ferreira VC et al. Genetic regulation of multispecific antibody responsiveness: improvement of "high" and "low" characters. *Eur J Immunol*. 1988 Jan;18(1):41-9.

Mowat AM, Viney JL. The anatomical basis of intestinal immunity. *Immunol Rev.* 1997 Apr;156:145-66.

Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA et al. Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med.* 2003; 198:1951–1957.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4+ CD25+ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor. *J. Exp. Med.* 2001; 194:629.

Pape KA, Merica R, Mondino A, Khoruts A, and Jenkins MK. Direct evidence that functionally impaired CD4+ T cells persist *in vivo* following induction of peripheral tolerance. *J. Immunol.* 1998; 160:4719.

Picca CC, Larkin J 3rd, Boesteanu A, Lerman MA, Rankin AL, Caton AJ. Role of TCR specificity in CD4+CD25+ regulatory T cell selection. *Immunol Rev.* 2006; 212: 74– 85.

Pinto EF, Cortezia MM, Rossi-Bergmann B. Interferon-gamma-inducing oral vaccination with *Leishmania amazonensis* antigens protects BALB/c and C57BL/6 mice against cutaneous leishmaniasis. *Vaccine.* 2003; 21:3534–3541

Powrie F, Carlino J, Leach MW, Mauze S, Coffman RL. A critical role for transforming growth factor-beta but not interleukin 4 in the suppression of T helper type 1-mediated colitis by CD45RB(low) CD4+ T cells. *J Exp Med.* 1996;183:2669-74.

Qi H, Popov V, Soong L. *Leishmania amazonensis*-dendritic cell interactions *in vitro* and the priming of parasite-specific CD4+ T cells *in vivo*. *J. Immunol.* 2001; 167: 4534-4542

Qi H, Ji J, Wanasen N, Soong L. Enhanced replication of *Leishmania amazonensis* amastigotes in gamma interferon-stimulated murine macrophages: implications for the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Infect Immun.* 2004 Feb;72(2):988-95.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25+CD4+ regulatory cells that control intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* 2000; 192:295.

Reiner SL, Locksley RM. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol.* 1995; 13:151-77.

Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4⁺ T-helper and a T-killer cell. *Nature*. 1998 Jun 4;393(6684):474-8.

Rosas LE, Satoskar AA, Roth KM, Keiser TL, Barbi J, Hunter C et al. Interleukin-27R (WSX-1/T-cell cytokine receptor) gene-deficient mice display enhanced resistance to *Leishmania donovani* infection but develop severe liver immunopathology. *Am. J. Pathol.* 2006; 168:158–69

Rossi-Bergmann B, Lenglet A, Bezerra-Santos CR, Costa-Pinto D, Traub-Czeko YM. Use of fluorescent *Leishmania* for faster quantitation of parasite growth *in vitro* and *in vivo*. *Mem I Oswaldo Cruz* 1999; 94 (Suppl. II):74.

Sacks D, Anderson C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol Rev.* 2004; 201:225-38.

Sacks D, Noben-Trauth N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. *Nat Rev Immunol.* 2002; 2:845-58.

Sakaguchi S, Ono M, Setoguchi R, Yagi H, Hori S, Fehervari Z et al. Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease. *Immunol Rev.* 2006; 212:8– 27

Sansom DM, Walker LSK . The role of CD28 and cytotoxic T lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology. *Immunol Rev.* 2006; 212:131– 148.

Schoenberger SP, Toes RE, van der Voort EI, Offringa R, Melief CJ. T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions. *Nature*. 1998; 393(6684):480-3.

Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin 17 signal transduction. *J Exp Med.* 2000;191:1233–1240.

Scott P, Farrell JP. Experimental cutaneous leishmaniasis: induction and regulation of T cells following infection of mice with *Leishmania major*. *Chem Immunol.* 1998; 70:60-80

Shevach EM, DiPaolo RA, Andersson J, Zhao DM, Stephens GL, Thornton AM et al. The lifestyle of naturally occurring CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006; 212: 60– 73.

Shiokawa A, Tanabe K, Tsuji NM, Sato R, Hachimura S. IL-10 and IL-27 producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. *Immunol Lett.* 2009 May 14; 125(1):7-14.

Silva MF, da Costa SC, Ribeiro RC, Sant'Anna OA, da Silva AC, Independent genetic control of B- and T-cell tolerance in strains of mouse selected for extreme phenotypes of oral tolerance. *Scandinavian Journal of Immunology.* 2001(a); 53:148-154.

Silva AC, Bezerra LM, Aguiar TS, Tavares D, Araujo LM, Pinto CE et al. Effect of genetic modifications by selection for immunological tolerance on fungus infection in mice. *Microbes and Infection.* 2001(b); 3:215-222.

Silva MF, Nóbrega A, Ribeiro RC, Levy MS, Ribeiro OG, Tambourgi DV et al. Genetic selection for resistance or susceptibility to oral tolerance imparts correlation to both Immunoglobulin E level and mast cell number phenotypes with a profound impact on the atopic potential of the individual. *Clin Exp Allergy.* 2006 Nov; 36(11):1399-407.

Silva AC, Souza KW, Machado RC, Silva MFS, Sant'Anna OA. Genetics of immunological tolerance: I. Bidirectional selective breeding of mice for oral tolerance. *Res. Immunol.* 1998; 149:151-161.

Silva MFS. Estudo de caracteres associados em camundongos obtidos por seleção genética bidirecional para tolerância oral: correlação inversa entre tolerância oral e inflamação. 2003. Tese (Ciências (Microbiologia) - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Soong L, Chang CH, Sun J, Longley BJ, Ruddle NH, Flavell RA et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. *J. Immunol.* 1997; 158:5374-5383

Soong L, Xu C, Grewal IS, Kima P, Sun J, Longley B et al. Disruption of CD40-CD40 ligand interactions results in an enhanced susceptibility to *Leishmania amazonensis* infection. *Immunity.* 1996; 4:263-273.

Stiffel C, Liacopoulos-Briot M, Decreusefond C, Lambert F. Genetic selection of mice for quantitative responsiveness of lymphocytes to phytohemagglutinin. *Eur. J. Immunol.* 1977; 7:291.

Stockinger B, Barthlott T, G. Kassiotis. T cell regulation: a special job or everyone's responsibility? *Nat. Immunol.* 2001; 2:757-758.

Strober W, Kelsall B, Fuss I, Marth T, Ludviksson B, Ehrhardt R, Neurath M. Reciprocal IFN-gamma and TGF-beta responses regulate the occurrence of mucosal inflammation. *Immunol Today*. 1997; 18: 61-64.

Suffia I, Reckling SK, Salay G, Belkaid Y. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J Immunol*. 2005 May 1; 174(9):5444-55.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med*. 2000; 192:303.

Tang Q, Bluestone JA. Regulatory T-cell physiology and application to treat autoimmunity. *Immunol Rev*. 2006; 212: 217– 237.

Tarakhovsky A, Kanner SB, Hombach J, Ledbetter JA, Muller W, Killeen N et al. A role for CD5 in TCR-mediated signal transduction and thymocyte selection. *Science*. 1995; 269:535– 537.

Tavares D, Ribeiro RC, da Silva AC. Inflammatory lesion and parasite load are inversely associated in *Leishmania amazonensis* infected mice genetically selected according to oral tolerance phenotypes, *Microbes and Infection*. 2006; 957-964

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998; 188:287-296.

Thostenson KM, Khoruts A. Generation of anergic and potentially immunoregulatory CD4+/CD25+ T cells *in vivo* after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen. *J Immunol* 2001; 167:188-195.

Titus RG, Milon G, Marchal G, Vassalli P, Cerottini JC, Louis JA. Involvement of specific Lyt-2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 1987 Oct; 17(10):1429-33.

Torres-Santos EC, Rodrigues JM Jr, Moreira DL, Kaplan MA, Rossi-Bergmann B. Improvement of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial activities of 2', 6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone by entrapment in poly(D,L-lactide) nanoparticles. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999 Jul;43(7):1776-8.

Trinchieri G, Scott P, Scharon-Kersten T, Afonso LC, Wysocka M. IL-12 is required for natural killer cell activation and subsequent T helper 1 cell development in experimental leishmaniasis. *J Immunol*. 1995 May 15; 154(10):5320-30.

Tsuji N.M., Mizumachi K. and Kurisaki J., Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology*. 2001; 103:458–464.

Valujskikh A, VanBuskirk AM, Orosz CG, Heeger PS. A role for TGF- β and B cells in immunologic tolerance after intravenous injection of soluble antigen. *Transplantation*. 2001; 72:685

Villarino A, Hibbert L, Lieberman L, Wilson E, Mak T, Yoshida H et al. The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection. *Immunity*. 2003; 19:645–55.

Viney JL, Mowat AM, O'Malley JM, Williamson E, Fanger NA. Expanding dendritic *cells in vivo* enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol*. 1998; 160:5815–5825

Wan YY, Flavell RA. The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells. *Immunol Rev* 2006; 212: 114– 130.

Watanabe T, Yoshida M, Shirai Y, Yamori M, Yagita H, Itoh T et al. Administration of an Antigen at a High Dose Generates Regulatory CD4₊ T Cells Expressing CD95 Ligand and Secreting IL-4 in the Liver. *J. Immunol*. 2002; 168:2188–99.

Weiner HL. Oral tolerance: immune mechanisms and treatment of autoimmune diseases. *Immunol. Today*. 1997; 18:335.

Weiner, HL, Friedman A, Miller A, Khoury SJ, Al-Sabbagh A, Santos L et al. Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. *Annu. Rev. Immunol*. 1994; 12:809–837.

WHO/CDS/NTD/IDMWHO Informal Consultative Meeting for the Control of Cutaneous Leishmaniasis in the Middle East and Maghreb, Geneva. 2007.

Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet*. 2001; 27:18–20

Wildner G, Thureau SR. Orally induced *bystander* suppression in experimental autoimmune uveoretinitis occurs only in the periphery and not in the eye. *Eur. J. Immunol.* 1995; 25:1292.

Wong P, Barton GM, Forbush KA, and Rudensky AY. Dynamic tuning of T cell reactivity by self-peptide-major histocompatibility complex ligands. *J. Exp. Med.* 2001; 193:1179–1187.

Yamaguchi S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF- β in generation and expansion of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol.* 2001; 166:7282-7289.

Yao Z, Painter SL, Fanslow WC, Ulrich D, Macduff BM, Spriggs MK et al. Human IL-17: a novel cytokine derived from T cells. *J Immunol.* 1995; 155:5483–5486.

Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P et al. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med.* 2001; 194:519–527.