Bianca Almeida Natali dos Santos Detilio

**Caracterização das células T *Natural Killer* (NKT) de
células mononucleares de sangue periférico em
indivíduos saudáveis de diferentes continentes**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e
Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges
Kallás

**São Paulo
2012**

Bianca Almeida Natali dos Santos Detilio

**Caracterização das células T *Natural Killer* (NKT) de
células mononucleares de sangue periférico em
indivíduos saudáveis de diferentes continentes**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em
Ciências

Programa de Alergia e
Imunopatologia
Orientador: Prof. Dr. Esper Georges
Kallás

**São Paulo
2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Santos-Deitlio, Bianca Almeida Natali dos

Caracterização das células T *Natural Killer* (NKT) de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos saudáveis de diferentes continentes / Bianca Almeida Natali dos Santos Deitlio. -- São Paulo, 2012.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Células T *Natural Killer* 2.Movimento celular 3.Ativação celular 4.Citometria de fluxo

USP/FM/DBD-042/12

ERRATA

Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 100µL de PFA 1%, visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais utilizados.

As células foram transferidas, respectivamente para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob-refrigeração até o momento da leitura no Citômetro de Fluxo.

Figura 4 – Estratégia de análise para avaliar a produção de citocinas IFN-γ⁺ e TNF-α⁺ pela população de células NKT. A partir da população de linfócitos T CD3⁺ foi feita uma janela de identificação de células T *Natural Killer* (Vα24⁺ Vβ11⁺), desta foi feita uma janela de identificação para avaliar a expressão dos marcadores de citocinas IFN-γ e TNF-α.

4.5.5 Preparação das beads para realizar o ajuste das voltagens do aparelho

Em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizada por 15 minutos através da utilização de UV, em um microtubo foram adicionados 800µL de Tampão MACS, duas gotas de Negative Control (FBS) (BD™) e duas gotas de Anti-Mouse Ig, κ (BD™), 100 µL deste

**“É necessário ter o caos cá dentro para gerar
uma estrela” (Friedrich Nietzsche)**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Esper Georges Kallás por ter aberto as portas de seu laboratório e permitir que eu integrasse sua equipe, por todas as oportunidades que me foram fornecidas visando meu desenvolvimento intelectual e profissional.

À minha Co-orientadora Dra. Karina Carvalho Salmazi por quem tenho enorme gratidão e admiração, quem me ensinou muito além de fazer pesquisa e conviver com a ciência como também a encarar a vida de frente.

A toda minha família em especial meu pai Rubens e minha mãe Églê pelo apoio incondicional, por sempre acreditarem em mim e sempre me estimularem a seguir em frente em busca de realizar meus sonhos e objetivos profissionais e pessoais.

Ao meu marido por me ajudar a encarar a realidade da vida me estimulando a batalhar pela minha independência e nunca desistir.

Ao Prof. Dr. Jorge Kalil pelas discussões enriquecedoras e pela coordenação do Programa de Alergia e Imunopatologia.

A Universidade de São Francisco e ao Instituto Karolinska juntamente dos professores Douglas Nixon e Johan Sandberg; aos colaboradores Lyen Loh, Vanessa York e Dominic Proulix pela doação das amostras e todo conhecimento científico.

A todos os colegas de laboratório do LIM-60 com quem tive convívio durante o desenvolvimento deste trabalho principalmente a amigo Leandro Tarosso que foi quem me direcionou a fazer mestrado.

Aos meus amigos Fernanda, Maíra, Susan, Fernanda Malta, Denise, Angélica, Lidiane, Carla, Priscila, Claudia, Helena, Teresa, Fabio e Candida pelo apoio, conversas, risadas por sempre estarem dispostas a ceder um ombro amigo nos momentos de alegria e desafios.

As minhas amigas do coração Juliana, Thais, Marina, Paula e Liã por tudo de bom que vivemos juntas e pela amizade que se propagou na vida aqui fora.

Aos amigos Ruth e Carlos por fazerem parte desta etapa de minha vida.

Aos amigos Issler, Nicole e Sérgio pela inestimável ajuda, atenção e carinho disponibilizados.

A querida Zelinda por quem tenho enorme simpatia e carinho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES pelo apoio dado através da bolsa de mestrado concedida que proporcionou a realização deste trabalho.

À Universidade de São Paulo pelo alojamento concedido.

Ao laboratório de hematologia do HC/FMUSP que me acolheu em meu primeiro contato com a técnica de citometria de fluxo.

Às secretárias do Programa de Pós-Graduação em Alergia e Imunopatologia, Tânia e Andréia, pela ajuda com as questões burocráticas.

À querida Dona Inês pelas conversas, brincadeiras, carinho e amizade.

Às queridas amigas Noemia, Rosangela, Patrícia e Lúcia por terem me abrigado no início da minha jornada com citometria de fluxo e por toda amizade e carinho que levo por toda vida.

Aos professores Niels Saraiva Câmara e Alexandre de Castro Keller pela enorme contribuição com críticas e sugestões em minha qualificação do trabalho de mestrado.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente na realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1.INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Origem das células T <i>Natural Killer</i> (NKT).....	1
1.2 Tipos de células NKT.....	3
1.3 CD1d.....	5
1.4 Glicolipídeos.....	5
1.5 Subpopulações das células NKT.....	7
1.6 Funções das células NKT.....	8
1.7 Células NKT nas doenças.....	9
1.8 Frequência das células NKT.....	13
2.JUSTIFICATIVA.....	15
3.OBJETIVOS.....	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.2 Objetivos Específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
4.1 Planejamento do estudo.....	17
4.2 Casuística.....	17
4.3 Recrutamento.....	17
4.4 Coleta das amostras.....	18
4.5 Procedimentos laboratoriais.....	19
4.5.1 Processo de separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	19

4.5.2	Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico criopreservadas.....	21
4.5.3	Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico.....	21
4.5.4	Imunofenotipagem intracelular em células mononucleares do sangue periférico.....	25
4.5.5	Preparação das beads para realizar o ajuste das voltagens do aparelho.....	29
4.5.6	Expansão das células NKT.....	31
4.5.7	Quantificação CD3/CD4/CD8 do sangue periférico.....	33
4.5.8	Método de diagnóstico.....	34
4.5.9	Análise de citometria.....	34
4.5.10	Análise estatística.....	35
4.5.11	Aspectos éticos.....	35
5.	RESULTADOS.....	36
5.1	Dados demográficos.....	36
5.2	Idade.....	37
5.3	Idade do gênero feminino.....	37
5.4	Idade do gênero masculino.....	38
5.5	Linfócitos T CD3 ⁺	39
5.6	Linfócitos T CD4 ⁺	40
5.7	Linfócitos T CD4 ⁺ CD69 ⁺	42
5.8	Linfócitos T CD4 ⁺ CCR5 ⁺	43
5.9	Linfócitos T CD8 ⁺	44
5.10	Linfócitos T CD8 ⁺ CD69 ⁺	46
5.11	Linfócitos T CD8 ⁺ CCR5 ⁺	47
5.12	Mensuração de células NKT em células mononucleares do sangue periférico (CMSP).....	48
5.13	Expressão da subpopulação CD4 ⁺ de células NKT Va24 ⁺ /Vβ11 ⁺	50

5.14 Expressão da subpopulação CD8 ⁺ de células NKT Vα24 ⁺ /Vβ11 ⁺	50
5.15 Expressão da subpopulação CD4 ⁻ CD8 ⁻ de células NKT Vα24 ⁺ /Vβ11 ⁺	50
5.16 Expressão da subpopulação CD4 ⁺ CD8 ⁺ de células NKT Vα24 ⁺ /Vβ11 ⁺	51
5.17 Expansão de células NKT.....	51
5.17.1 Células vivas pré-expansão e pós-expansão.....	51
5.17.2 Linfócitos T CD3 ⁺ pré-expansão e pós-expansão.....	52
5.17.3 Células CD14 ⁺ /CD19 ⁺ pré-expansão e pós-expansão.....	53
5.17.4 Células NKT pré-expansão e pós-expansão.....	54
5.17.5 Células NKT CD4 ⁺ pré-expansão e pós-expansão.....	55
5.17.6 Células NKT CD8 ⁺ pré-expansão e pós-expansão.....	56
5.18 Citocinas.....	56
5.18.1 Mensuração da produção da citocina IFN-γ pelas células NKT.....	57
5.18.2 Mensuração da produção da citocina IFN-γ pelas células NKT.....	57
5.19 Resumo dos resultados.....	58
6.DISSCUSSÃO.....	61
7.CONCLUSÕES.....	73
8.ANEXOS.....	74
8.1 Anexo 1 Questionário de Anamnese.....	74
8.2 Anexo 2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	77
8.3 Anexo 3 Aprovação CAPPesq.....	81
8.4 Anexo 4 Aprovação CONEP.....	83
8.5 Anexo 5 Comprovante de doação das células mononucleares do sangue periférico das amostras provenientes de São Francisco.....	85
8.6 Anexo 6 Comprovante de doação das células mononucleares do sangue periférico das amostras provenientes de Estocolmo.....	86
9.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	87

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Reconhecimento microbiano direto e indireto pela célula NKT.....	7
Figura 2: Estratégia de definição da janela de identificação (<i>gate</i>) para mensuração de células NKT.....	24
Figura 3: Estratégia de análise para avaliar a ativação e migração das subpopulações de células NKT.....	25
Figura 4: Estratégia de análise para avaliar a produção de citocinas IFN- γ^+ e TNF- α^+ pela população de células NKT.....	29
Figura 5: Estratégia de análise para avaliar a expansão células das células NKT e suas subpopulações CD4 $^+$ e CD8 $^+$	33
Figura 6: Estratégia de definição da janela de identificação para mensuração da quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8 do sangue periférico.....	34
Figura 7: Expressão de idade.....	37
Figura 8: Expressão de idade do gênero feminino.....	38
Figura 9: Expressão de idade do gênero masculino.....	39
Figura 10: Expressão de linfócitos T CD3 $^+$	40
Figura 11: Expressão de linfócitos T CD3 $^+$ CD4 $^+$	41
Figura 12: Expressão de linfócitos T CD3 $^+$ CD4 $^+$ e de marcador de ativação celular CD69 $^+$	43
Figura 13: Expressão de linfócitos T CD3 $^+$ CD4 $^+$ CCR5 $^+$	44
Figura 14: Expressão de linfócitos T CD3 $^+$ CD8 $^+$	45
Figura 15: Expressão de linfócitos T CD3 $^+$ CD8 $^+$ e de marcador de ativação celular CD69 $^+$	46

Figura 16: Expressão de linfócitos T CD3 ⁺ CD8 ⁺ e de marcador de migração celular CCR5 ⁺	48
Figura 17: Expressão de células T <i>Natural Killer</i> Vα24 ⁺ Vβ11 ⁺ em células mononucleares do sangue periférico.....	49
Figura 18: Expressão de células vivas pré-expansão e pós-expansão.....	52
Figura 19: Expressão de linfócitos T CD3 ⁺ pré-expansão e pós-expansão..	53
Figura 20: Expressão de células CD14 ⁺ /CD19 ⁺ pré-expansão e pós-expansão.....	54
Figura 21: Expressão de células NKT pré-expansão e pós-expansão.....	55
Figura 22: Expressão de células NKT CD4 ⁺ pré-expansão e pós-expansão.....	56
Figura 23: Mensuração da produção da citocina IFN-γ ⁺ pelas células NKT..	57
Figura 24: Mensuração da produção da citocina TNF-α ⁺ pelas células NKT.....	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diferenças e similaridades entre células T convencionais, células NKT e células NKT inata.....	4
Tabela 2: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para realizar a marcação de superfície.....	23
Tabela 3: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para realizar a marcação de superfície celular.....	27
Tabela 4: Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para realizar a marcação intracelular.....	28
Tabela 5: Informações sobre o comprimento de onda de excitação e de emissão dos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais utilizados.....	30
Tabela 6: Características demográficas dos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo, Estocolmo e São Francisco.....	36
Tabela 7: Resumo dos resultados da marcação de superfície celular.....	59
Tabela 8: Resumo dos resultados da expansão celular.....	60
Tabela 9: Resumo dos resultados da marcação intracelular.....	60
Tabela 10: Tabela comparativa da frequência de células NKT de indivíduos saudáveis.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

%	Porcentagem
APC	Alofococianina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CCR5	Receptor de Quimiocina do tipo 5
CD	Designação de grupos
CMSP	Células Mononucleares do Sangue Periférico
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
DMSO	Dimetil-sulfóxido
<i>et al.</i>	E outros
FITC	Isoticianato de fluoresceína
FMUSP	Faculdade de Medicina de São Paulo
FSC	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz
FSC-H	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede a altura
FSC-A	<i>Forward Scatter</i> – dispersão frontal da luz que mede a área
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HLA-DR	Antígeno leucocitário Humano da subclasse DR
ICV	Imunodeficiência Comum Variável
IFN- α	<i>Interferon</i> alfa
IFN- β	<i>Interferon</i> beta
IFN- γ	<i>Interferon</i> gama
IL	Interleucina
LIM-60	Laboratório de Investigação Médica 60
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
mL	Mililitro
μ L	Microlitro
NK	<i>Natural Killer</i>
NKT	<i>Natural Killer T</i>
nm	Nanômetro
°C	Grau centígrado
PB	Permeabilizante

PE	Ficoeritrina
PercP	Proteína clorofilperidina
R10	Meio RPMI suplementado com 10% de SFB
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura para células desenvolvido pelo instituto <i>Roswell Park Memorial</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SSC	<i>Side Scatter</i> – dispersão lateral da luz
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de célula T
TGF- β	Fator de crescimento transformador beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
UV	Ultravioleta
α -Galcer	Alphagalactosilceramida

RESUMO

As células T *Natural Killer* (NKT) são linfócitos que expressam o rearranjo V α 24V β 11 com TCR invariante e reconhecem glicolípídeos como o alfa-galactosilceramida (α -GalCer) apresentado no contexto da molécula MHC-não clássica chamada CD1d. As NKT são divididas em subgrupos distintos: os fenótipos CD4⁺ e CD4⁻ em camundongos e humanos, e CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ em humanos. Após estímulo, as NKT secretam citocinas Th1 e Th2. A frequência das NKT representa menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico humano. O objetivo deste trabalho é primeiro, identificar a frequência, o fenótipo e a função da população de células NKT nos grupos de indivíduos saudáveis de procedências distintas. Segundo, avaliar a influência da idade, gênero e país de moradia na frequência das NKT, incluindo suas subpopulações, no sangue periférico; Terceiro, verificar se há variabilidade ou não na apresentação da molécula CD1d. Quarto, verificar se há alteração na função das NKT utilizando o estímulo α -GalCer e por fim, verificar o perfil das NKT quanto ao seu estado de ativação e migração celular quando submetidas a expansão. As amostras são provenientes de São Paulo, Brasil; São Francisco, Estado Unidos da América e Estocolmo, Suécia. Os parâmetros imunológicos foram analisados por citometria de fluxo. Demonstramos que o grupo de São Paulo, não apresentou maiores valores de linfócitos T CD3⁺, no entanto, apresentou valores significantes de células NKT V α 24⁺/V β 11⁺. Não estabelecemos a expressão dos marcadores de ativação e migração nas NKT. Estabelecemos, no grupo de São Paulo, a capacidade funcional das NKT que expressaram IFN- γ e TNF- α assim como de expansão, sob estímulo de α -GalCer. Os resultados sugerem que vários fatores podem alterar a quantidade das células NKT na periferia. Mais estudos devem ser endereçados para esclarecer melhor estes fatos.

Descritores: 1. Células T *Natural Killer* 2. Movimento Celular 3. Ativação Celular 4. Citometria de Fluxo

ABSTRACT

Natural Killer T cells (NKT cells) are lymphocytes that express the invariant TCR rearrangement V α 24V β 11 and recognize glycolipid as α -galactosylceramide (α -GalCer) presented in conjunction with a non-MHC pathway molecule named CD1d. The NKT cells are divided into distinct subsets: the CD4⁺ and CD4⁻ phenotype in mice and humans and the CD8⁺ and CD4⁻CD8⁻ phenotype in humans. After stimulation, the NKT secrete Th1 and Th2 cytokines. The frequencies of NKT cells represent <1% of the population of T lymphocytes in human peripheral blood. The objective of this study is to 1) identify the frequency, phenotype and function of NKT cell population in groups of healthy individuals from different racial/ethnic origins, 2) evaluate the influence of age, gender and country of residence on the frequency of NKT cells/subpopulations, 3) investigate the variability of presentation of the CD1d molecule, 4) investigate the functional variability of NKT cells using α -GalCer stimulation, and 5) study the activation and migration profile of NKT cells after expansion. Immunologic parameters of clinical samples from Sao Paulo, Brazil; San Francisco, California and Stockholm, Sweden were analyzed by flow cytometry. We demonstrate that the São Paulo group does not have an elevated number of CD3⁺ T lymphocytes, but does have significantly more NKT V α 24⁺/V β 11⁺ cells. We have not yet determined expression of NKT markers for activation and migration. Thus, we have shown that among sample obtained in São Paulo, there is increased functional capacity of IFN- γ and TNF- α -expressing NKT cells along with NKT cells expansion under stimulation with the α -GalCer. These results suggest that there are several factors that can modulate NKT cell number and function in the peripheral blood and additional studies are needed to further clarify these findings.

Keywords: 1. *Natural Killer* T cells 2. Cell migration 3. Cell activation 4. Flow Cytometry

1. INTRODUÇÃO

1.1 *Origem das células T Natural Killer (NKT)*

A imunidade natural (também chamada de imunidade inata ou nativa) é a primeira linha de defesa contra microrganismos, consistindo em mecanismos de defesas celulares e bioquímicas que já existiam antes do estabelecimento de uma infecção e são rapidamente ativados por eles antes do desenvolvimento das respostas imunológicas adquiridas. Os principais componentes do sistema imunológico natural são barreiras físicas e químicas, tais como o epitélio e as substâncias antibacterianas presentes nas superfícies epiteliais da pele, do revestimento dos tratos gastrointestinal e respiratório (Salio, 2009). As principais células efetoras da imunidade natural são os neutrófilos, os fagócitos mononucleares (macrófagos) e células *Natural Killer* (NK). As principais proteínas circulantes da imunidade natural são as proteínas do sistema complemento e outras proteínas plasmáticas que reconhecem estruturas microbianas, tais como a lectina do tipo C de ligação a manose, mediadores da inflamação e proteínas denominadas citocinas (fator de necrose tumoral [TNF], interleucina 1 [IL-1], quimiocinas, interferon alfa [IFN- α], IFN-beta [INF- β] e IFN-gama [IFN- γ], IL-10, IL-12, IL-15 e fator de crescimento transformador - beta [TGF- β]), que ativam os fagócitos e estimulam a reação celular da imunidade natural, chamada inflamação (Abbas, 2008).

A origem das células NKT continua sendo um ponto de controvérsia. Várias linhagens de células T são selecionadas positivamente após interações auto-reativa de alta avidéz entre timócitos duplo-positivos e as moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex* – MHC) ou CD1 expressos por células epiteliais ou medulares do tecido tímico. Tais interações não levam à eliminação dessas células, mas sim a uma alteração do programa celular resgatando as

mesmas da morte por negligência (Bendelac, 2004). Embora esta auto-reatividade seja uma característica comum de diversas linhagens, a exposição diferencial aos sinais de células acessórias e o tempo de exposição ao antígeno podem resguardar estas células da morte e dar origem a populações com funções específicas, porém pouco compreendidas. Dentre estas linhagens estão às células NKT que parecem surgir do mesmo precursor de timócitos duplo-positivos que originam linfócitos T convencionais (Borowski, 2005).

Vários estudos sugerem que existem dois sítios independentes formando os precursores V α 24 das células NKT: os órgãos hematopoiéticos que produzem as células NKT ao longo da vida, compreendendo o desenvolvimento do fígado e da medula óssea de adultos, e a maturação do timo (Ohteki, 1994), sugerindo que eles exercem suas funções em localizações especializadas (Bendelac, 1994; Shimamura, 2001).

Se a origem das células NKT humanas presentes no sangue periférico são derivadas do timo ou de origem extratímica ainda não está bem estabelecida na literatura (Gurney, 2002).

As células T *Natural Killer* (NKT) são um grupo distinto de células T e foram originalmente descritas como linfócitos T que expressam ao mesmo tempo o receptor de células T (TCR) e também proteínas de superfície da linhagem de células *Natural Killer* (NK) do tipo C-lectina NK1.1 em camundongos *C57BL/6* (CD161 [(NKR-P1A)] nos humanos). Recentemente essas células foram definidas como um subtipo único de linfócitos T que expressam a cadeia alfa (α) invariante V α 24J α Q e repertório V β limitado, sendo a grande maioria V β 11 (Lee, 2002; Prussin, 1997). Também já foram descritas células T reativas a CD1d com repertório de TCR diverso (Behar, 1999; Bix e Locksley, 1995; Bendelac, 1995; Bendelac, 1997; Kronenberg, 2002; Taniguchi, 2003; Berzins, 2004; Brigl and Brenner, 2004).

Ao contrário dos linfócitos T convencionais que estão no MHC de classe I e II (Beckman, 1994) as células NKT são conhecidas como linfócitos T não convencionais por reagir com antígenos glicolipídicos do MHC-não

clássico associados à molécula CD1d, operando na fronteira entre a imunidade inata (Kronenberg, 2002) e a imunidade adaptativa (Godfrey, 2004; Bendelac, 2007; Van Kaer, 2007; Diana, 2009).

Em geral, as células NKT representam menos de 1% da população de linfócitos T no sangue periférico humano (Emoto, 1999; Ohteki, 1994) e possuem funções distintas dos linfócitos T convencionais. As células NKT se distinguem das demais células em sua especificidade, diversidade de TCR, desenvolvimento, “*homing*”, expressão de co-receptores e secreção de citocinas (Yoshimoto, 1994; Matsuda, 2000).

1.2 Tipos de células NKT

Atualmente é proposto que as células NKT podem ser classificadas em três grupos distintos: células NKT tipo I ou células NKT invariante (iNKT), células NKT tipo II e células NKT $\alpha\beta$ (Prussin, 1997; Godfrey, 2004). Os dois primeiros grupos são ativados pela molécula de MHC-não clássica chamada CD1d e o terceiro grupo pelo MHC de classe I ou de classe II (Godfrey, 2004).

Entre as características inatas das populações de células NKT está a habilidade de reconhecer um número limitado de antígenos (Lee, 2002; Prussin, 1997). As células NKT invariantes são assim chamadas porque expressam um TCR invariante codificado pelo segmento V α 14J α 18 emparelhado com um número limitado de cadeias V β (principalmente V β 8.2, V β 7 ou V β 2) em camundongos (Godfrey e Kronenberg, 2004; Kronenberg e Gapin, 2002) e, correspondentemente, pelo V α 24J α 18 codificado pelo segmento de genes da cadeia V β 11, em seres humanos (Dellabona, 1994; Porcelli, 1993). Células NKT do tipo II possuem TCR variável, com rearranjos que são distintos daqueles usados pelas células NKT do tipo I (iNKT) (Behar, 1999; Cardell, 1995; Chiu, 1999); A principal via de reconhecimento das células NKT tipo II ocorre através do auto-glicolípídeo galactosilceramida 3-sulfatado, chamado sulfatide, e pode ser identificado pela interação sulfatide

com o tetrâmero da molécula CD1d (Jahng, 2004). As células NKT tipo II possuem maior diversidade de TCR e necessita de CD1d, porém não reconhecem α -GalCer (Arrenberg, 2009). As células NKT $\alpha\beta$ também possuem TCR diverso e seu reconhecimento ocorre via antígenos peptídicos (Godfrey, 2004).

Uma das principais diferenças entre os três grupos das células iNKT, células NKT do tipo II e células NKT $\alpha\beta$ está relacionada com seu TCR e seus ligantes conhecidos (Godfrey, 2004).

Tabela 1: Diferenças e similaridades entre células T convencionais, células NKT e células NKT inata

Características	Células NKT			Células NKT inatas			
	$\alpha\beta$ T	Tipo I	Tipo II	MAIT	T CD4+	T CD8+*	$\gamma\delta$ T †
Repertório TCR	Diverso	V α 14J α 18 V β 8.2, V β 7, V β 2	Diverso, alguns têm V α 3.2J α 9, V α 8J α 9, V β 8	V α 19J α 33 V β 8, V β 6	Diverso	Diverso	V γ 1.1 V δ 6.3
Restrição de MHC	MHC I ou MHC II	CD1d	CD1d	MR-I	MHC II	MHC I	ND
Seleção de ligantes celulares de TCR	TEC	DP	DP	Células B ou DCs	DP	DP	ND
	Antígenos peptídicos	iGb3 α GalCer	Sulfatide Liso-sulfatide	Antígenos hidrofílicos ou lipídicos	ND	ND	Antígenos não peptídicos
Seleção positiva	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não
Expressão de CD4/CD8	CD4+ ou CD8+	CD4+ ou DN	CD4+ ou DN	Primeiramente DN	CD4+	CD8+	Não
Fenótipo ativado	Após exposição ao antígeno	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Dependente de SLAM-SAP	Não	Sim	Sim	Não	Sim	Sim	Sim
Expressão de PLZF	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim
Reatividade com α GalCer	Não	Sim	Não	Não	Não	Não	Não

NKT, T natural killer T; TCR, receptor de célula T; MHC, complexo maior de histocompatibilidade; MR-I, moléculas relacionadas ao complexo de histocompatibilidade-I; MAIT, mucosa associada a invariante T; TEC, células tímicas epiteliais; DP, duplo positivo; DN, duplo negativo; SLAM, molécula de sinalização de ativação linfocítica; SAP, molécula associada a SLAM; iGb3, isoglobotriexosilceramida; PLZF, porção de zinco promielocítica; α -GalCer, alfa-galactosilceramida; ND, não determinado.* Subtipos de células T CD8+ inatas encontradas em camundongos deficientes de Itk. Subtipo específico de células T $\gamma\delta$ definida pela expressão de V γ 1.1+V δ 6.3+ TCR. As informações presentes nesta tabela são para células NKT e células NKT inatas de murinos e estão nas referências 12, 46, 48, 49, 79, 123, 129, 135. Fonte: Modificado de DAS, 2010.

Todos os TCRs das células NKT reconhecem lipídeos que são ligados a moléculas semelhantes ao MHC classe I, chamadas de moléculas CD1.

Existem diversas proteínas CD1 expressas em humanos e camundongos (Abbas, 2008).

1.3 CD1d

CD1d é uma molécula crítica para o desenvolvimento e função das células iNKT e também para as células NKT tipo II, é um membro da família CD1 de MHC de classe I presente em várias células apresentadoras de antígenos (APC) (Godfrey, 2004). Todas as moléculas CD1 são glicoproteínas de superfície associadas à microglobulina $\beta 2$ (Beckman, 1994; Moody, 2005). Em humanos, a família CD1 é composta por cinco membros, designados CD1a, CD1b, CD1c, CD1d e CD1e. Com base em relações de homologia e detalhes de sua expressão e função CD1a/b/c/e são classificados como moléculas do grupo 1. CD1d compromete um grupo separado e é o único membro do grupo 2 da molécula CD1 (Porcelli, 1995). Ambos os grupos 1 e 2 da molécula CD1 são proteínas de ligação que podem apresentar lipídeos próprios e glicolipídeos às células T. Moléculas do grupo 1 de CD1 tem sido caracterizadas mais detalhadamente em humanos e tem demonstrado apresentar antígenos lipídicos microbianos e alguns lipídeos próprios para um grupo diversificado de células T. Moléculas CD1 do grupo 2 têm sido extensivamente estudadas em camundongos bem como em humanos (Brossay, 1998).

1.4 Glicolipídeos

As células NKT de porção invariável V α 24 expressam um TCR restrito que reconhece o antígeno glicolipídico sintético alfa-galactosilceramida (α -GalCer), originalmente isolado da esponja marinha *Agelas mauritianus* (Morita, 1995), que ao ser associado ao CD1d forma um complexo capaz de

interagir com o TCR destas células tornando-as efetivamente ativadas (Hayakawa, 2004).

Yang e cols. utilizaram o glicolípídeo PBS-57 e o α -GalCer proveniente da KRN7000 fornecido pelo Instituto Nacional de Saúde (NIH) e ambos demonstraram alta afinidade de interação entre os receptores de células NKT com CD1d favorecendo a secreção de citocinas como IFN- γ e IL-4. No entanto, o PBS-57 é mais solúvel que o α -GalCer, sendo capaz de estimular as células NKT com mais eficiência e em menores concentrações em timócitos e esplenócitos de camundongos (Liu, 2006).

A capacidade das células NKT de camundongos em reconhecer antígenos glicolipídicos associados ao CD1d de humanos e vice-versa mostra a conservação das células NKT no processo evolutivo e sugere um papel único para as mesmas. Isso faz com que as células NKT reconheçam antígenos que parecem ser ignorados pelos linfócitos T convencionais (Sandberg, 2004).

As células NKT são capazes de reconhecer glicolípídeos conservados, endógenos iso-globo-tri-hexosil-ceramida (iGb3) (Zhou, 2004) e exógenos como antígenos bacterianos tais como glicoesfingolípídeos, encontrados na parede celular de *Sphingomonas capsulata* (Wu, 2005) que é capaz de ativar diretamente as células NKT (Mattner, 2005), e manosídeo fosfatidil inositol (PIM), um glicolípídeo presente na parede celular micobacteriana (Fischer, 2004).

Apesar do repertório limitado, as células NKT apresentam duas diferentes estratégias no reconhecimento de patógenos. O primeiro mecanismo observado no reconhecimento de bactérias gram-negativas, LPS positivos, ocorre pela sinalização de receptores do tipo Toll (TLR) (Kinjo, 2005). O segundo mecanismo observado no reconhecimento de bactérias gram-negativas, LPS negativo, ocorre pelo reconhecimento específico de glicosilceramidas presentes na parede celular da bactéria, apresentadas por CD1d. Tal via de sinalização assegura o reconhecimento de patógenos que não apresentam ligantes para TLRs em sua parede celular (Mattner, 2005). É

importante ressaltar que o LPS é uma estrutura predominante na membrana celular de bactérias gram-negativas e um dos mais potentes ativadores da imunidade natural (Kinjo, 2005).

Figura 1: Reconhecimento microbiano direto e indireto pela célula NKT - Fonte: Modificado de Bendelac, 2007. Duplo reconhecimento de auto-antígeno microbiano e glicoesfingolipídeos durante infecções microbianas. À esquerda, infecção pela bactéria Gram-negativa, LPS-negativa *Sphingomonas* induz a ativação direta de células NKT através do reconhecimento da parede celular microbiana α -glycuronylceramida. À direita, infecção pela bactéria Gram-negativa, LPS-positiva *Salmonella* ativa através do LPS TLR4 e induz a produção de IL-12, revelando o reconhecimento autoreativo constitutivo da iGb3 através da secreção de IFN- γ (reconhecimento microbiano indireto).

1.5 Subpopulações das células NKT

As subpopulações de células NKT diferem na expressão de integrinas, moléculas envolvidas na interação de célula-célula e na matriz extracelular (Rolf, 2008). As células NKT podem se dividir em subgrupos distintos CD4⁺ e CD4⁻ em camundongos (Sandberg, 2004) e nos humanos e macacos também podem expressar os fenótipos CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ (Godfrey, 2000; Metelitsa, 2001; Chang, 2002; McDonald, 2003).

A molécula CD4 possui a capacidade de ativar células T restritas ao MHC classe II e essa ligação parecem estabilizar a interação entre o TCR/ MHC classe II (Wang, 2001). Os resultados apresentados por Chen e cols.

mostraram que a molécula CD4 pode interferir na ativação das células NKT independente do ligante na célula apresentadora de antígeno (APC) (Chen, 2007). As células NKT CD4⁻ produzem apenas citocinas do tipo Th1, como IFN- γ , fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e interleucina-2 (IL-2) (Chang, 2002) e expressam o receptor co-estimulatório de células NK (NKG2D e CD94) (Chen, 2007).

As subpopulações CD4⁺ tendem a produzir citocinas Th1 que secretam IL-2, TNF- α e IFN- γ , possuem função efetora da imunidade mediada por células contra microorganismos intracelulares e reações de hipersensibilidade do tipo tardia e expressam o receptor co-estimulatório de células NK (NKG2D e CD94) (Coffman, 2006, Mosmann, 2002). Esta subpopulação CD4⁺ também produz citocinas Th2 que secretam IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, que, juntamente com IL-4, inibem algumas funções dos macrófagos (Akbari, 2003; Fuss, 2004).

1.6 Funções das células NKT

As funções das diferentes subpopulações das células iNKT do sangue periférico humano ainda não são bem compreendidas, no entanto, as células NKT também possuem diversas características das células T da imunidade adaptativa.

Estas células possuem um papel importante em respostas alérgicas (Jin, 2009), inflamatórias (Murdoch, 2007), antitumorais (Kenna, 2003) e autoimunes (Crowe, 2003), além de participarem da regulação da resposta imunológica diante de infecções virais e bacterianas (Godfrey, 2000).

Os subtipos CD4⁺, CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻ parecem definir seus perfis de expressão gênica, produção de citocinas e capacidade de ativar células vizinhas (Chang, 2002; Sandberg, 2003; Yuling, 2009; Lin, 2006).

Uma das características dessas células que desperta grande interesse é sua capacidade de secretar diferentes citocinas poucas horas após sua

ativação, justificando sua participação numa gama enorme de respostas imunes.

Estudos iniciais indicam que as células NKT podem ter um fenótipo “Th0”, pois podem secretar rapidamente grandes quantidades tanto de citocina Th1 IFN- γ , quanto da citocina Th2 IL-4 (Godfrey, 2000). Além disso, IFN- γ produzido por células NKT pode ativar células NK, reforçando este braço do sistema imune inato (Carnaud, 1999; Eberl, 2000).

1.7 Células NKT nas doenças

O papel das células NKT restritas para CD1d na saúde e na doença humana se encontra sob intensa investigação. Em alguns modelos estas células parecem causar doenças, enquanto em outros parecem ser protetoras.

O número absoluto de células NKT V α 24 no sangue periférico diminui em uma ampla variedade de doenças autoimunes, como na esclerose múltipla (Illes, 2000) artrite reumatóide (Kojo, 2001), esclerose sistêmica (Sumida, 1995), síndrome de Sjögren (Kojo, 2001), lúpus eritematoso sistêmico (Kojo, 2001), hepatite autoimune (Exley, 2002), doença de Crohn (Senjo, 1991), colite ulcerativa (Fuss, 2004), psoríase (Chan, 2003), lúpus eritematoso cutâneo (Kojo, 2001) e dermatoses bolhosas (Vliet, 2001).

Dados recentes indicam que o número de células NKT encontra-se diminuídos em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) (Fulcher, 2009; Carvalho, 2010). Especula-se que o baixo número de células NKT em pacientes com ICV pode ser uma consequência do papel deficiente da resposta humoral (Fulcher, 2009). No entanto, ele também poderia estar associado a uma resposta inata deficiente, com implicações na suscetibilidade a doenças oportunistas. O aumento do número de células NKT através da modulação terapêutica pode ser um valioso tratamento adjuvante em indivíduos com ICV (Carvalho, 2010).

Estudos anteriores registraram um aumento de células NKT V α 24 na miastenia *gravis*, em contraste com outras doenças autoimunes analisadas, que não são caracterizadas principalmente pela destruição do tecido inflamatório. Além disso, a super expressão de células NKT demonstrou retardar a doença autoimune em modelos de camundongos diabéticos e com colite (Lehuen, 1998; Hammond, 1998), talvez devido a baixa regulação de auto-anticorpos produzidos pelas células B ou por insuficiente modulação de células T autoreativas (Vliet, 2001). Vários estudos sobre a análise de células iNKT em pacientes com diabetes tipo 1 estão sendo publicados e não há um consenso, uma vez que alguns autores descreveram uma diminuição na frequência e função das células iNKT nestes pacientes, mas não foi confirmado por outros investigadores (Kukreja et al., 2002; Oikawa et al., 2002). Apesar da complexidade de analisar células iNKT em humanos, tem sido amplamente demonstrado em estudos com modelos murinos que a manipulação de células iNKT é capaz de prevenir e até curar a diabetes tipo 1 em vários modelos murinos (Novak, 2007; Novak, 2011). Parece, portanto, que a diminuição no número de células NKT V α 24 circulante é um achado comum, mas não uma característica exclusiva de distúrbio autoimune (Illes, 2000).

Deve-se perceber que esses distúrbios raramente são completamente desprovidos de atividade inflamatória. Logo, uma relação entre processos inflamatórios crônicos e diminuição no número de células NKT V α 24⁺/V β 11⁺ na circulação não podem ser excluídos (Illes, 2000, Maeda, 1999).

Indivíduos controles saudáveis apresentam cerca de 1450 células NKT/ml no sangue periférico segundo estudo de Vliet e cols. e é possível constatar que a idade (25 a 80 anos) e o gênero não interferem de maneira significativa no número de células NKT destes indivíduos. Da mesma forma, não há relação observada com a duração da doença autoimune (dados não demonstrados), implicando que os defeitos na população de células NKT V α 24⁺/V β 11⁺ precede ou coincide com o aparecimento deste tipo de doença (Illes, 2000; Vliet, 2001). Segundo dados apresentados por Vliet e cols. se concluem que o desenvolvimento de terapias que visam restaurar as funções

das células NKT $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ podem ser de grande importância clínica no tratamento das doenças autoimune em seres humanos (Vliet, 2001).

O efeito do Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) nas células NKT $V\alpha 24$ e a função dessas células na defesa contra o HIV-1 ainda não foram completamente elucidados. Sandberg e cols. descreveram que as células NKT $CD4^+$ estão depletadas (preferencialmente em relação às células T $CD4^+$ totais) durante a infecção por HIV-1 *in vitro* (Sandberg, 2002). Células NKT também são altamente suscetíveis a infecção com diversas cepas de HIV-1 *in vitro* (Fleuridor, 2003). A perda ou o deslocamento funcional de subpopulações de células NKT poderia contribuir para a patogênese do HIV-1 devido a seu papel no direcionamento da resposta imunológica anti-HIV tanto inata quanto adaptativa. Além disso, a proteína Nef do HIV induz a regulação negativa de CD1d em células infectadas (Chen, 2006). Isso sugere que o HIV evoluiu para evitar uma potente resposta imunológica de células NKT.

Moll e cols. acompanharam indivíduos infectados pelo HIV-1, que apresentaram diminuição no número absoluto de células NKT na entrada do estudo. Entretanto, alguns pacientes fizeram o uso de tratamento antiretroviral (ART) e apresentaram um aumento insignificante do número absoluto destas células (Moll, 2006).

Pacientes com câncer apresentam diminuição considerável no número de células NKT $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ quando comparados a indivíduos saudáveis. Esta redução independe do tipo de câncer (carcinoma de cólon, carcinoma de cabeça e pescoço, carcinoma de células renais, câncer de mama e melanoma) e carga tumoral (Motahashi, 2002). A remoção do tumor após cirurgia ou radioterapia não parece restaurar o número de células NKT. Devido ao baixo número de células NKT circulantes, ocorre também redução na quantidade de IFN- γ sendo secretado por estas células, o que pode representar um fator de risco que precede o desenvolvimento de doenças malignas e não uma consequência devido à presença do tumor (Tahir, 2001). De acordo com estes dados, futuras estratégias terapêuticas deverão visar o

aumento de células NKT secretando IFN- γ devido a sua importante função imunorreguladora (Molling, 2005), podendo contribuir para uma resposta antitumoral eficiente através da ativação de outros tipos celulares, como células NK (Carnaud, 1999; Eberl, 2000).

Há evidências de aumento de células NKT no lavado broncoalveolar de pacientes com asma, que recrutam estas células capazes de produzir rapidamente citocinas tipo Th2 (IL-4 e IL-13), provocando o desenvolvimento de hipersensibilidade das vias aéreas (Unutmaz, 2003). Cerca de 90% das células NKT no lavado broncoalveolar são CD4⁺, em comparação a apenas 50% no sangue periférico. Estes dados sugerem que ocorre migração de células NKT para o pulmão onde são encontradas em quantidade cem vezes maior que no sangue periférico. Sendo assim, conclui-se que as células NKT desempenham um papel proeminente na patogênese da asma e o uso de terapias capazes de interromper a ativação ou a função efetora de células NKT pulmonares pode ser útil no tratamento desses pacientes (Akbari, 2006).

As células NKT parecem também ter um papel nas infecções causadas por micobactérias (Emoto, 1999). No caso de infecções provocadas por *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium leprae* causadoras respectivamente da tuberculose e da hanseníase, ocorre uma significativa diminuição no número de células NKT CD4⁻CD8⁻ e um aumento proporcional de células NKT CD4⁺ em comparação a indivíduos saudáveis, demonstrando alterações fenotípicas nos indivíduos acometidos por estas infecções e sugerindo um papel específico das células NKT que, ao serem ativadas, secretam citocinas e provocam citotoxicidade contra células infectadas por bacilos (Jin, 2008).

Na sarcoidose, um tipo de doença granulomatosa humana, o papel das células NKT restritas ao CD1d não é tão claro. Dois estudos com sarcoidose no Japão e no Reino Unido encontraram números reduzidos de células NKT restritas ao CD1d em sangue periférico e fluido de lavado bronco-alveolar (BAL), porém apresentaram resultados conflitantes quanto à presença destas células no tecido granulomatoso (Ho, 2005; Kobayashi,

2004). Desse modo esses dados clínicos sugerem que pode haver deficiência de células NKT restritas ao CD1d em pacientes com sarcoidose, porém, se estas células estão sequestradas no tecido granulomatoso, ainda não está definido.

A chamada “teoria da higiene” proposta no começo dos anos 90 busca explicar o notável aumento de doenças mediadas via IgE, como a asma, o eczema e a rinite, que ocorreu durante as últimas décadas, relacionadas ao ambiente (von Mutius, 2000). Esta exacerbação é mais prevalente na zona urbana de países desenvolvidos e é paralela ao desenvolvimento de um estilo de vida de pessoas que fazem uso de diversos recursos que propiciam a higiene, o uso do aspirador de pó, os produtos esterilizados e os próprios hábitos do cotidiano. A conexão entre sensibilização alérgica e estilo de vida, conduziu a elaboração desta teoria, no qual o aumento da higiene, o uso difundido de antibióticos, de água potável purificada e as imunizações por vacinas podem ter privado o sistema imune em desenvolvimento, de estímulos ambientais moldados pela evolução, para manter a imunidade adaptativa longe das respostas Th2. Em síntese, ocorre uma redução nas taxas de estimulação microbiana na infância (Romagnani, 1994; Romagnani, 2000).

1.8 *Frequência das células NKT*

Células NKT são raras no sangue periférico de humanos e roedores, representando geralmente de 0,001% e 1% dos linfócitos, respectivamente (Emoto, 1999).

Em camundongos as células iNKT são encontradas principalmente no fígado, timo e baço, onde constitui até 30-40%, 0,5% e 1% dos linfócitos nestes órgãos respectivamente (Benlagha, 2000; Matsuda, 2000). Elas são menos abundantes no sangue periférico. A distribuição das células NKT é bem menos estudada em seres humanos; entretanto, células iNKT compreende 0,008 - 1,176% das células T do sangue periférico (Marsh,

2009), 0,001 - 0,01% do total de timócitos humanos estudados a partir do timo de crianças de 0 a 5 anos de idade que sofreram cirurgia cardíaca corretiva (Baev, 2004; Berzins, 2005), e 1% de linfócitos no fígado (Benlagha, 2000; Matsuda, 2000).

No início da gestação são encontrados os progenitores das células NKT V α 24, estes são mais frequentes no timo e o número relativo dessas células declina com o tempo (Bendelac, 2007). A frequência das células NKT é de aproximadamente 0,06% na 13ª semana de gestação, porém este número cai para 0,02% na 20ª semana e são raros ou ausentes no timo após o nascimento. No sangue periférico de adultos, 50% das células NKT são CD4⁺ com baixa ou nenhuma expressão de CD8 (Sandberg, 2003). Este achado sugere que as células NKT possuem desenvolvimento timo-independente, ou seja, são produzidas em um determinado período de tempo durante o desenvolvimento tardio ou mesmo logo após o nascimento (Sandberg, 2004).

Existem poucos estudos sobre a frequência de células NKT em indivíduos saudáveis. No estudo realizado por DelaRosa et al., 2002, a porcentagem média de células V α 24, verificada pela técnica de citometria de fluxo, em adultos jovens saudáveis foi cerca de 0,3%. Tahir et al., 2001 demonstraram através da técnica de citometria de fluxo que a frequência de células NKT definida V α 24/6 β 11 foi 0,11% em indivíduos saudáveis. Montoya et al., 2007 demonstrou utilizando a técnica de citometria de fluxo a média da frequência de células iNKT/6 β 11 de indivíduos saudáveis no valor de 0,17%. No estudo realizado por Molling et al., 2005 a média de células NKT V α 24/V β 11 avaliada pela técnica de citometria de fluxo foi cerca de 0,09%.

A frequência de células NKT V α 24 no sangue periférico de indivíduos saudáveis varia de 0,001 a 1%, fazendo com que seja difícil avaliar as diferenças entre indivíduos normais e aqueles que apresentam algum tipo de doença (Emoto, 1999; Ohteki, 1994).

2. JUSTIFICATIVA

O aumento do interesse em células NKT vem colocando novos desafios para o estudo desta população celular. É possível que variações em resultados sejam somente consequência de diferenças regionais no comportamento das células NKT, influenciadas por fatores ambientais. Algumas observações preliminares dos laboratórios que participaram deste trabalho fizeram suspeitar que a frequência das células NKT no sangue periférico poderia ser diferente em populações na América do Norte, América do Sul e Europa.

Desenvolvemos, então, o presente trabalho para determinar se essa diferença é de fato verdadeira. Se confirmada, seus resultados devem influenciar todo o campo de estudo de células NKT, tanto na consideração de eventuais diferenças dependentes do local de realização de um estudo, como na busca de quais são os fatores determinantes dessas diferenças.

3. OBJETIVOS

3.1 *Objetivo Geral*

Identificar a frequência, o fenótipo e a função da população de células NKT nos grupos de indivíduos controles saudáveis de procedências distintas.

3.2 *Objetivos Específicos*

Avaliar a influência da idade, gênero e país de moradia na frequência de células NKT, incluindo suas subpopulações, no sangue periférico;

Verificar se há variabilidade ou não na apresentação de CD1d;

Verificar se há alteração na função das células NKT utilizando como estímulo específico o α -galactosilceramida;

Verificar o perfil das células NKT quando submetidas a expansão.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Planejamento do estudo*

Este trabalho foi desenvolvido como um estudo prospectivo de corte transversal, com a participação voluntária dos sujeitos da pesquisa.

4.2 *Casuística*

Foram incluídos neste estudo apenas amostras de indivíduos saudáveis, de ambos os gêneros. Os voluntários foram avaliados por questionário interrogativo de anamnese (**Anexo 1**), foram considerados indivíduos saudáveis aqueles que relataram não apresentar nenhuma doença descrita na anamnese.

Com o objetivo de se descartar outras variáveis que possam interferir na imunofenotipagem do sangue periférico, foram excluídos indivíduos que tenham se submetido a tratamento com imunomoduladores ou corticóides nos 30 dias que antecederam sua admissão no estudo.

4.3 *Recrutamento*

Todos os voluntários participantes deste estudo leram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (**Anexo 2**), aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – (CAPPesq), do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (número do processo: 0784/09) (**Anexo 3**) e pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) (parecer CONEP/MS nº253/10) (**Anexo 4**).

As amostras provenientes de Estocolmo foram compradas do Banco de Sangue do Hospital do Instituto Karolinska em Estocolmo, portanto, não possuem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 5**).

As amostras de São Francisco foram compradas do Banco de Sangue da Universidade de Stanford nos Estados Unidos da América, portanto, não possuem Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Anexo 6**).

4.4 Coleta das amostras

Foram coletados 90 mililitros (mL) de sangue periférico por punção venosa em membro superior de indivíduos saudáveis, após cuidadosa assepsia local.

Foi utilizada a técnica de coleta a vácuo que compreende na punção da veia do paciente permitindo que o sangue flua diretamente para o tubo de coleta a vácuo. Esta técnica é ideal, pois possibilita a coleta de vários tubos e se caracteriza por ser um sistema fechado e sem a necessidade de manuseio com a amostra.

O material de São Paulo foi coletado no Laboratório de Investigação Médica 60 – LIM60 da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da Faculdade de Medicina de São Paulo (FMUSP), onde foi processado no mesmo dia.

Os materiais provenientes de Estocolmo e de São Francisco foram comprados do Banco de Sangue do Instituto Karolinska e do Banco de Sangue da Universidade da Califórnia de São Francisco respectivamente.

No caso das amostras de São Paulo os procedimentos laboratoriais foram realizados em cabine de segurança biológica devidamente esterilizada. Foi realizada a separação das células mononucleares e posterior criopreservação em nitrogênio líquido; Em relação às amostras provenientes de Estocolmo e de São Francisco a separação das células mononucleares e posterior criopreservação em nitrogênio líquido foi realizada no Banco de Sangue local.

Vale a pena ressaltar que as amostras criopreservadas (CMSP) de Estocolmo e de São Francisco foram embaladas com gelo seco e encaminhadas, através de transporte aéreo, ao Laboratório de Investigação Médica 60 – LIM60, para futuros ensaios imunológicos utilizando a técnica de citometria de fluxo.

Das amostras coletas em São Paulo também foi separado e congelado a -80°C, 0,5mL de soro coletado em um tubo adicional sem anticoagulante.

Adicionalmente foram separados 100 microlitros (µL) de sangue total periférico para quantificação de subpopulações linfocitárias (com o painel CD3/CD4/CD8) apenas das amostras coletadas em São Paulo.

4.5 Procedimentos laboratoriais

Os ensaios laboratoriais foram realizados no Laboratório de Investigação Médica 60 – LIM60 da Disciplina de Imunologia Clínica e Alergia da FMUSP.

4.5.1 Processo de separação de células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Em cabine de segurança biológica nível 2, esterilizada por 15 minutos através da utilização de luz ultravioleta (UV), os 90mL do sangue coletado de cada voluntário foram diluídos separadamente com Solução Tampão Salina Hank's (HBSS) (Gibco™).

Posteriormente, foram cuidadosamente transferidos para outros tubos contendo 15mL de solução de gradiente de densidade Ficoll-Paque™ PLUS (Amersham Biosciences). Estes foram centrifugados por 40 minutos a 300 xg em temperatura de 18 a 20°C.

Após a centrifugação, as células se separaram pela diferença de densidade de gradiente, e a camada de interesse com as células

mononucleares do sangue periférico foi transferida para outros tubos, e lavadas duas vezes com HBSS.

As hemácias ainda presentes foram lisadas através da solução tampão Lise ACK [com cloreto de amônia – 8,3g/L, EDTA disódico dihidratado – 0,0372 e bicarbonato de potássio – 1,0g/L (Gibco™)]. Para neutralizar a ação da solução de lise, após 3 minutos foi adicionado meio de cultura R10, composto por: 500mL de meio de cultura RPMI 1640 (Gibco™), 50 mL soro fetal bovino (Gibco™) inativado pelo calor, 5 mL solução tampão Hepes 1M (Gibco™); 5mL L-Glutamina - 200mM (Gibco™), solução piruvato 100mM (Gibco™), 5mL penicilina e estreptomicina (Gibco™), 0,5mL 2-mercaptoetanol (Gibco™) e novamente foram centrifugados por 10 minutos a 250 xg em temperatura de 18 a 20°C.

A viabilidade celular foi definida através da utilização do corante azul de tripan 1% (Sigma®), na diluição 1:10 e a correção da concentração celular estabelecida para 1×10^7 células/mL através da contagem na câmara de Neubauer (Boeco Germany).

O cálculo da concentração celular foi realizado através do número médio das células contadas nos quatro quadrantes da câmara x 10 (valor da diluição) x 10.000 (valor de correção da câmara de Neubauer) e a quantidade de células, calculada a partir do valor da concentração x 20 (volume da suspensão).

Após os cálculos, os tubos foram centrifugados por 10 minutos a 250 xg em temperatura de 18 a 20°C. As células foram ressuspensas no volume necessário de meio de congelamento, composto por 90% soro fetal bovino (GIBCO™), 10% dimetil sulfóxido (DMSO) (Hybri-Max®) e transferidas para criotubos, que permaneceram armazenados no freezer -80°C por aproximadamente 24 horas. Posteriormente, foram transferidos para o tanque de nitrogênio líquido.

Todas as amostras permaneceram estocadas no próprio LIM60 até o momento da realização dos experimentos.

4.5.2 Descongelamento das células mononucleares do sangue periférico criopreservadas

Este procedimento foi realizado em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizada por 15 minutos através da utilização de UV.

O número de criotubos necessários foi retirado e mantido em um recipiente com gelo seco até o momento do seu descongelamento. Os criotubos foram parcialmente descongelados em banho-maria a 37°C. Foi adicionado 1mL de meio de cultura R10 no criotubo, gotejado lentamente. Posteriormente foi transferido o conteúdo total da amostra para um tubo cônico contendo R10, previamente identificado, utilizando também, do procedimento de gotejamento. Para a realização da lavagem do criotubo foi adicionado mais 1mL de R10 e este volume transferido para o tubo contendo R10.

Em seguida, o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 250 xg em temperatura de 4 a 6°C; o sobrenadante desprezado e adicionados 2mL de R10, para realização da contagem celular através da câmara de Neubauer e do contador celular automatizado Countess™ (Invitrogen) utilizando os mesmos procedimento e cálculos descritos anteriormente.

Novamente o tubo foi centrifugado e as células ressuspendidas em R10 no volume de $1,0 \times 10^6$ células/mL e as células foram transferidas respectivamente para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificada.

4.5.3 Imunofenotipagem de superfície celular em células mononucleares do sangue periférico

Com o objetivo de caracterizar as células T *Natural Killer* – NKT do sangue periférico, as amostras colhidas foram processadas para realização

de imunofenotipagem de superfície celular através da técnica de citometria de fluxo.

Após as células serem transferidas respectivamente para uma placa de 96 poços com fundo em V (NUNC® Brand Products), previamente identificada; A placa seguiu para centrifugação a 250 xg por 5 minutos, para a realização da lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 170µL de Tampão MACS, composto por 498mL de tampão salina fosfatada 7,2 (GIBCO™) (PBS 1x), 2mL de EDTA [500mM], 2,5g de albumina de soro bovino (SIGMA®) (BSA). Após outra centrifugação, o sobrenadante foi desprezado.

Para iniciar a marcação das proteínas presentes na superfície das células, foram adicionados, 82,6µL de Tampão MACS, e os volumes de anticorpos monoclonais previamente titulados, 3,0µL de CD3 – Clorofila Peridina (PerCP), 2,5µL de Vβ11 – Ficoeritrina (PE) ou Isocianato de Fluoresceína (FITC), 2,0µL Vα24 – FITC 0,5µL CD4 – Pacific Blue™, 1,0µL CD8 – PerCPCy5.5, 1,0µL CD14 – PE Texas Red®, 1,0µL CD19 – PE Texas Red®, 3,0µL CCR5 – PE.Cy7, 3,0µL CD69 – APC.Cy7, 1,0µL marcador de viabilidade *Live/Dead* – AmCyan e 4,2µL de CD1d – Alofocianina (APC).

Após a adição dos reagentes, as células permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro a 4°C. os anticorpos conjugados com cromógenos específicos foram utilizados, de acordo com o painel descrito na **Tabela 2**.

Após o término da incubação a placa foi centrifugada a 250 xg por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 170µL de tampão MACS, seguindo novamente para centrifugação, por duas vezes. Finalizando, a técnica de imunofenotipagem de superfície celular, foram adicionados 100µL de paraformaldeído a 1% (PFA 1%), composto por 9mL de PBS (1x) e 1mL de paraformaldeído 10x (SIGMA®), visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais utilizados.

Tabela 2 - Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para realizar a marcação de superfície.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Marca
CD3	PerCP	* BD
CD4	Pacific Blue	* BD
CD8	PerCPCy™5.5	* BD
CD14	PE-Texas Red	** R & D
CD19	PE-Texas Red	** R & D
CD69	APC-Cy7	* BD
CCR5	PE-Cy7	* BD
Vβ11	FITC	*** Beckman Coulter
Vα24	PE	*** Beckman Coulter
CD1d	APC	**** NIH
Live/ dead	AmCyan	Tetramer Facility
		* BD

* BD (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

** R & D

*** Beckman Coulter (Immunotech, Marselha, França)

**** NIH Tetramer Facility (Emory University, Atlanta, Georgia, EUA)

As células foram transferidas, respectivamente para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob-refrigeração até o momento da leitura no citômetro de fluxo modelo LSR Fortessa (BD), disponível no LIM60, dotado de detectores capazes de adquirir e analisar eventos com até 13 cores.

Eventos adquiridos em citômetro de fluxo com dispersão frontal e lateral de luz característicos de linfócitos eram selecionados através da criação de uma janela de identificação (*gate*), sendo caracterizados como linfócitos T, a subpopulação CD3⁺. Em um segundo momento, era realizada a

categorização das subpopulações de linfócitos T que identificava a população de células T *Natural Killer* – NKT, caracterizada com o auxílio de marcadores identificados pelos anticorpos monoclonais Va24, Vβ11 e CD1d (**Figura 2**).

Figura 2 – Estratégia de definição da janela de identificação (*gate*) para mensuração de células NKT. Primeiramente foi feita uma janela de aquisição na região denominada de *time* caracterizando a não oscilação do laser. Na sequência foi feita uma janela de aquisição na região das células que passaram apenas uma vez em frente ao laser, denominados *singlets* determinado pelo tamanho em relação a altura (FSC-H) e em relação a área (FSC-A). Em seguida foi feita uma janela de aquisição na população de linfócitos totais seguido de uma janela de aquisição na população de células vivas denominadas *live dead* e posteriormente foi feita uma janela de aquisição na população denominada CD3+. A partir daí outras duas janelas de aquisição foram feitas para caracterizar as populações de células T *Natural Killer* (Va24/CD1d e Va24/Vβ11).

Posteriormente a identificação das células NKT, identificamos suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ e respectivamente, os marcadores de ativação e migração celular CD69⁺ e CCR5⁺ (**Figura 3**).

Figura 3 – Estratégia de análise para avaliar a ativação e migração das subpopulações de células NKT. A partir da população de células T *Natural Killer* (Vα24/CD1d e Vα24/Vβ11) foram avaliadas as subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ e dentro de cada população, foi feita uma janela de identificação para avaliar a expressão dos marcador de ativação CD69 e de migração CCR5.

4.5.4 Imunofenotipagem intracelular em células mononucleares do sangue periférico

Com o objetivo de caracterizar produção de citocinas pelas células T *Natural Killer* – NKT do sangue periférico, as amostras colhidas foram processadas para realização de imunofenotipagem intracelular através da técnica de citometria de fluxo.

Após realizar o procedimento de descongelamento das CMSP criopreservadas e ajuste da concentração celular conforme descrito anteriormente, as células foram transferidas respectivamente para uma placa de 48 poços (Corning Incorporated Costar®), previamente identificada e armazenada na incubadora 5% CO₂ e 37°C onde permaneceu durante 16 horas.

Após o período de incubação a placa foi retirada da estufa e foi acrescentado 500μL de meio de cultura R10 com DNASE somado 2,5μL do

estímulo α -Galactosilceramida Axxora no poço previamente identificado como estimulado. A placa voltou para incubadora 5% CO₂ e 37°C onde permaneceu durante duas horas.

Retiramos a placa da incubadora e acrescentamos 1,0µL de *Golgi Plug* (BD™) e voltamos a armazenar a placa na incubadora 5% CO₂ e 37°C durante seis horas.

Finalizado o tempo de incubação de 6 horas, as células foram transferidas respectivamente da placa para os tubos cônicos de 15 mL, que foram submetidos à centrifugação por 250 *xg* por 5 minutos para obtenção dos agregados celulares; Eles foram, então, transferidos respectivamente para outra placa de 96 poços com fundo em V (*NUNC® Brand Products*), previamente identificada. A placa de 96 poços seguiu para centrifugação a 250 *xg* por 5 minutos, para a realização da lavagem celular, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em 170 µL de Tampão MACS, composto por 498 mL de Tampão Salina Fosfatada 7,2 (*GIBCO™*) (*PBS 1x*), 2 mL de *EDTA* [500mM], 2,5 g de Albumina de Soro Bovino (*SIGMA®*) (*BSA*). Após outra centrifugação, o sobrenadante foi desprezado.

Para iniciar a marcação das proteínas presentes na superfície das células, foram adicionados, 82,6µL de Tampão MACS, e os volumes de anticorpos monoclonais previamente titulados, 3,0µL de CD3 – Clorofila Peridínica (PerCP), 2,5µL de Vβ11 – Ficoeritrina (PE) Isocianato de Fluoresceína (FITC), 2,0µL Vα24 – FITC 0,5µL CD4 – Pacific Blue™, 1,0µL CD8 – PerCP-Cy5.5, 1,0µL CD14 – PE Texas Red®, 1,0µL CD19 – PE Texas Red®, 3,0µL CCR5 – PE.Cy7, 3,0µL CD69 – APC.Cy7 e 1,0µL marcador de viabilidade celular *Live/Dead* – AmCyan.

Após a adição dos reagentes, as células permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro a 4°C, os anticorpos conjugados com cromógenos específicos foram utilizados, de acordo com o painel descrito na **Tabela 3**.

Após o término da incubação a placa foi centrifugada a 250 *xg* por 5 minutos, o sobrenadante foi desprezado e as células foram lavadas com 170

μL de Tampão *MACS*, seguindo novamente para centrifugação, por duas vezes. Finalizando, a técnica de imunofenotipagem de superfície celular, foram adicionados 100 μL de Paraformaldeído a 4% (*PFA* 4%), composto por 25 mL de *PBS* (1x), 2,5 g de Paraformaldeído (*SIGMA*®), permanecendo sob incubação por 15 minutos no escuro em temperatura ambiente.

Tabela 3 - Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para realizar a marcação de superfície celular.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Marca
CD3	PerCP	* BD
CD4	Pacific Blue™	* BD
CD8	PerCPCy™5.5	* BD
CD14	PE-Texas Red®	** R & D
CD19	PE-Texas Red®	** R & D
CD69	APC-Cy7	* BD
CCR5	PE-Cy7	* BD
Vβ11	FITC	*** Beckman Coulter
Vα24	PE	*** Beckman Coulter
Live/dead	AmCyan	* BD

* BD (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA)

** R & D

*** Beckman Coulter (Immunotech, Marselha, França)

Ao final da incubação, foram adicionados 100μL de Permeabilizante *PB* (BD™) e a placa seguiu para centrifugação a 250 *xg* por 5 minutos, o

sobrenadante foi desprezado e novamente foram adicionados 100µL de *PB* (BD™) permanecendo em incubação por 10 minutos, no escuro, em temperatura ambiente, com o objetivo de permeabilizar a célula para posterior marcação das citocinas intracelulares.

Ao término da incubação, foi novamente realizado o procedimento de lavagem celular com Tampão *MACS*, seguido de uma nova centrifugação, por duas vezes.

Após o término da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado para iniciar a marcação das proteínas intracelulares. Foram adicionados 90µL de Tampão *MACS*, e os volumes dos anticorpos monoclonais previamente titulados, 5,0µL IFN-γ – Aloficocianina (APC) 5,0µL de TNF-α – Alexa Fluor® 700 (**Figura 4**). Após a adição dos reagentes, as amostras permaneceram sob incubação por 30 minutos no escuro a 4°C.

As informações relevantes sobre os anticorpos monoclonais utilizados na marcação intracelular apresentam-se na **Tabela 4**.

Tabela 4 - Informações sobre os anticorpos monoclonais utilizados para realizar a marcação intracelular.

Anticorpo monoclonal	Fluorocromo	Marca
IFN-γ	APC	* BD
TNF-α	Alexa Fluor® 700	* BD

* BD: BD Biosciences, San Jose, CA.

Ao final da incubação, a placa foi centrifugada a 250 *xg* por 5 minutos, o sobrenadante desprezado e realizado o procedimento de lavagem com Tampão *MACS*, sendo este procedimento repetido por mais uma vez.

Ao final da centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 100µL de PFA 1%, visando promover a fixação dos anticorpos monoclonais utilizados.

As células foram transferidas, respectivamente para microtubos (Fisherbrand®, Houston, TX) previamente identificados e permaneceram armazenadas sob-refrigeração até o momento da leitura no Citômetro de Fluxo.

Figura 4 – Estratégia de análise para avaliar a produção de citocinas IFN- γ ⁺ e TNF- α ⁺ pela população de células NKT. A partir da população de linfócitos T CD3⁺ foi feita uma janela de identificação de células T *Natural Killer* (V α 24⁺ V β 11⁺), desta foi feita uma janela de identificação para avaliar a expressão dos marcadores de citocinas IFN- γ e TNF- α .

4.5.5 Preparação das beads para realizar o ajuste das voltagens do aparelho

Em cabine de segurança biológica nível 2, previamente esterilizada por 15 minutos através da utilização de UV, em um microtubo foram adicionados 800µL de Tampão MACS, duas gotas de *Negative Control* (FBS) (BD™) e duas gotas de *Anti-Mouse Ig, κ* (BD™), 100 µL deste

homogeneizado foi distribuído em outros 9 microtubos previamente identificados, com os nomes dos fluorocromos utilizados. Em cada um destes microtubos foram adicionados, individualmente, os anticorpos monoclonais correspondentes aos fluorocromos utilizados.

Ao início da leitura no Citômetro de Fluxo, foram primeiramente utilizadas as amostras não marcadas (NM), possibilitando a definição da localização correta da população de interesse através dos parâmetros de *Forward Scatter* (FSC) tamanho celular e *Side Scatter* (SSC), granularidade celular, além da definição do limite das células que emitem fluorescência das que não emitem nenhuma fluorescência, e posteriormente, as beads, que possibilitam a realização do melhor ajuste das voltagens de emissão de fluorescência ideal para cada fluorocromo, descritos na **Tabela 5**.

Tabela 5 - Informações sobre o comprimento de onda de excitação e de emissão dos fluorocromos conjugados aos anticorpos monoclonais utilizados.

Fluorocromo	Comprimento de Excitação	Comprimento de Emissão
FITC	488 nm *	520 nm *
PE	488 nm *	578 nm *
PerCP	488 nm *	678 nm *
PE-Texas Red®	488 nm *	620 nm *
PerCP/PE-Cy™5.5	488 nm *	695 nm *
PE.Cy7	488 nm *	785 nm *
APC	640 nm *	660 nm *
Alexa 700®	640 nm *	719 nm *
APC-Cy7	640 nm *	780 nm *
Pacific Blue™	405 nm *	452 nm *
AmCyan	405 nm *	491 nm *

* nm: nanômetro.

Realizado então o ajuste definitivo de cada voltagem, o aparelho tornou-se apto a adquirir as demais amostras, referentes a cada painel. Para a realização do estudo de cada painel foram adquiridos no gráfico inicial de FSC x SSC aproximadamente 1.000.000 de eventos de cada amostra, sendo cada evento correspondente a uma célula.

4.5.6 Expansão das células NKT

Com o objetivo de aumentar o número sabido baixo de células NKT, utilizamos a metodologia de expansão celular com estímulos de α -GalCer e IL-2. Estes estímulos foram utilizados nas CMSP.

Após realizar o procedimento de descongelamento das CMSP criopreservadas e ajuste da concentração celular conforme descrito anteriormente, as células foram transferidas respectivamente para um tubo cônico de 15mL devidamente identificado, acrescentamos 5mL de meio de cultura R10 suplementado com DNASE (SIGMA - ALDRICH) e também adicionamos 2,5 μ L do estímulo específico α -Galcer Axxora, homogenizamos e transferimos esta solução para garrafa de cultura celular de 25mL (Corning®) previamente identificada e armazenamos na incubadora 5% CO₂ e 37°C onde permaneceu durante 24 horas.

Após o período de incubação de 24 horas retiramos as células da incubadora e acrescentamos 10 μ L de IL-2 (Roche) e retornamos as garrafas para incubadora à 37°C e 5% CO₂.

No quinto dia de cultura celular pegamos um tubo cônico de 15mL devidamente identificado, acrescentamos 5mL de meio de cultura R10 suplementado com DNASE (SIGMA - ALDRICH) e adicionamos 2,5 μ L do estímulo específico α -Galcer Axxora juntamente com 10 μ L de IL-2, homogenizamos esta solução e adicionamos nas células em cultura retornando as garrafas para incubadora 5% CO₂ e 37°C.

No oitavo dia de cultura celular novamente pegamos um tubo cônico de 15mL devidamente identificado, acrescentamos 5mL de meio de cultura R10 suplementado com DNASE (SIGMA - ALDRICH) e adicionamos 2,5µL do estímulo específico α -Galcer Axxora juntamente com 10µL de IL-2, homogenizamos esta solução e adicionamos nas células em cultura retornando as garrafas para incubadora 5% CO₂ e 37°C.

No décimo segundo dia de cultura celular repetimos o procedimento, pegamos um tubo cônico de 15mL devidamente identificado, acrescentamos 5mL de meio de cultura R10 suplementado com DNASE (SIGMA - ALDRICH) e adicionamos 2,5µL do estímulo específico α -Galcer Axxora juntamente com 10µL de IL-2, homogenizamos esta solução e adicionamos nas células em cultura retornando as garrafas para incubadora 5% CO₂ e 37°C.

No décimo quarto dia retiramos as garrafas contendo as células em cultura e transferimos seu conteúdo para um tubo cônico de 15mL, lavamos a garrafa com 1mL de meio de cultura R10 suplementado com DNASE (SIGMA - ALDRICH) para obter o maior número de células possíveis, levamos os tubos cônicos à centrifugação por 250 *xg* por 5 minutos para obtenção dos *pellets* celulares; Eles foram, então, transferidos respectivamente para uma placa de 96 poços com fundo em V (*NUNC® Brand Products*), previamente identificada e foi realizada a imunofenotipagem de superfície celular e intracelular das células NKT através da técnica de citometria de fluxo (**Figura 5**).

Figura 5 – Estratégia de análise para avaliar a expansão células das células NKT e suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺. A partir da população de linfócitos T CD3⁺ foram avaliadas a população de células T *Natural Killer* (Va24/Vβ) e suas subpopulações CD4⁺ e CD8⁺.

4.5.7 Quantificação CD3/CD4/CD8 do sangue periférico

A contagem de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ foi realizada por citometria de fluxo utilizando-se a técnica de marcação de superfície celular de linfócitos com anticorpos monoclonais CD45, CD4, CD8 e CD3, conjugados aos fluorocromos Alofococianina (APC), Isoticianato de Fluoresceína (FITC), Ficoeritrina (PE), e proteína de Clorofila Peridinina (PerCP) respectivamente. Foram colocados 100 µL de sangue total e 20 µL do reagente *Multitest*TM (BD Biosciences, San Diego, CA, EUA), o qual contém concentrações iguais dos 4 anticorpos, após incubação de 15 minutos, as amostras foram lisadas por adição de 2 mL de solução BD FACS *Lysing* (1:10), com nova incubação por 15 minutos, as amostras foram lavadas com tampão MACS e fixadas com PFA 1% (Figura 6).

Figura 6 – Estratégia de definição da janela de identificação para mensuração da quantificação de linfócitos T CD3/CD4/CD8 do sangue periférico. Inicialmente foi feita uma janela de aquisição na região de leucócitos marcada com anti-CD45⁺. Na sequência foi feita outra janela de aquisição na região denominada CD3⁺ e por fim foi delimitada uma janela de aquisição de quadrantes para identificar as subpopulação de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, CD4⁻, CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ e CD4⁻CD8⁻, respectivamente.

4.5.8 Método de diagnóstico

Questionário de anamnese (**Anexo 1**) a fim de incluir voluntários saudáveis.

4.5.9 Análise de citometria

A análise dos dados adquiridos a partir de cada amostra foi realizada através do software *FlowJo* (Tree Star, Inc., Ashland, OR, EUA) versão 9.4, transformando a representação gráfica gerada a partir da captação da intensidade das cores, em porcentagens dos resultados finais, na subpopulação pré-selecionada, baseada nas suas propriedades físicas de dispersão frontal e lateral da luz.

Posteriormente estes valores foram transferidos para uma planilha de dados do programa *Microsoft Office Excel 2007* (*Microsoft Corporation*, EUA).

4.5.10 Análise estatística

Os resultados dos ensaios laboratoriais foram analisados descrevendo o comportamento das subpopulações de linfócitos T (células T *Natural Killer* – NKT, NKTCD4⁺, NKTCD4⁻, NKTCD8⁺, NKTCD8⁻ e as todas possíveis combinações booleanas com o marcador de ativação de linfócitos T - CD69 e marcador de migração celular - CCR5), assim como a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α , posteriormente analisados pelo programa estatístico através do software *GraphPad Prism* (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA) versão 5.

Os grupos foram comparados utilizando modelos não paramétricos, os dados são relatados como mediana (M) e intervalo interquartil (IQR). Comparações entre grupos foram realizadas usando *test t* e teste não-paramétrico *Mann-Whitney* para comparar um parâmetro entre dois grupos, o teste ANOVA não-paramétrico para comparar um parâmetro entre três grupos e o teste de Comparações Múltiplas de *Dunn's*.

A diferença estatística foi considerada significativa quando o valor de p observado foi menor que 0,05.

4.5.11 Aspectos éticos

A participação de voluntários neste projeto esteve condicionada a leitura, compreensão e assinatura de TCLE, tendo sido informados que poderiam retirar o consentimento para participar do estudo a qualquer momento, sem que os seus direitos a assistência médica e demais cuidados de saúde fossem prejudicados.

Os voluntários não foram submetidos a qualquer forma de intervenção experimental envolvendo drogas ou vacinas, havendo apenas os riscos inerentes à punção venosa, que raramente podem causar dor, hiperemia local ou um pequeno hematoma.

5. RESULTADOS

5.1 Dados demográficos

As amostras do presente estudo foram coletadas durante o período de abril de 2009 a novembro de 2011. Foram incluídos 92 indivíduos saudáveis, de ambos os gêneros, sendo 30 participantes procedentes de São Paulo (Brasil), 30 participantes procedentes de Estocolmo (Suécia) e 32 participantes de São Francisco (Estados Unidos) as características demográficas de todos os grupos estão descritas na **Tabela 6**.

Tabela 6 - Características demográficas dos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo, Estocolmo e São Francisco.

<i>Variável</i>	<i>São Paulo</i> <i>(n=30)</i>	<i>Estocolmo</i> <i>(n=30)</i>	<i>São Francisco</i> <i>(n=32)</i>
Idade, em anos (Mediana e interquartil 25%-75%)			
Feminino	22(21-29)	53 (38-63)	44 (40-54)
Masculino	25(21-32)	44 (42-54)	45 (36-65)
Gênero (%)			
Feminino	50	50	47
Masculino	50	50	53

5.2 Idade

Ao analisarmos a idade entre os grupos de São Paulo, São Francisco e Estocolmo (Figura 7) observamos que houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 22 (20-26)] que tinham menor idade quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 40 (20-47)] ($p < 0.001$) e quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 39 (17-45)] ($p < 0.001$); Entretanto, não houve diferença significativa ao compararmos os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 40 (20-47)] e Estocolmo [M: 39 (17-45)].

Figura 7: Expressão de idade. Gráfico representativo do valor absoluto da idade dos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo com menor idade quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.001$ ***); Menor idade nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo, ($p < 0.001$ ***); Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo; Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.3 Idade do gênero feminino

Ao analisarmos a idade do gênero feminino dos grupos de São Paulo, São Francisco e Estocolmo (Figura 8) observamos que houve diferença

significativa entre as mulheres saudáveis procedentes de São Paulo [M: 29 (22-35)] que tinham menor idade quando comparadas as mulheres saudáveis procedentes de São Francisco [M: 53 (38-63) ($p < 0.01$ ** e quando comparadas as mulheres saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 44 (40-54) ($p < 0.001$ ***). Entretanto, não houve diferença significativa ao comprarmos as mulheres saudáveis procedentes de São Francisco [M: 53 (38-63)] e Estocolmo [M: 44 (40-54)].

Figura 8: Expressão de idade do gênero feminino. Gráfico representativo do valor absoluto da idade das mulheres saudáveis procedentes de São Paulo com menor idade quando comparadas com mulheres saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.01$ **); Menor idade das mulheres saudáveis procedentes de São Paulo quando comparadas com as mulheres saudáveis procedentes de Estocolmo, ($p < 0.001$ ***); Não houve diferença significativa entre as mulheres saudáveis procedentes de São Francisco quando comparadas as mulheres saudáveis procedentes de Estocolmo; Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.4 Idade do gênero masculino

Ao analisarmos a idade do gênero masculino dos grupos de São Paulo, São Francisco e Estocolmo (Figura 9) observamos que houve diferença significativa entre os homens saudáveis procedentes de São Paulo [M: 25 (21-32)] que tinham menor idade quando comparados aos homens saudáveis

procedentes de São Francisco [M: 45 (36-65) ($p < 0.001$ e quando comparados aos homens saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 44 (42-54) ($p < 0.01$); Entretanto, não houve diferença significativa ao comprarmos os homens saudáveis procedentes de São Francisco [M: 45 (36-65)] e Estocolmo [M: 44 (42-54)].

Figura 9: Expressão de idade do gênero masculino. Gráfico representativo do valor absoluto da idade dos homens saudáveis procedentes de São Paulo com menor idade quando comparados com homens saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.001$ ***); Menor idade dos homens saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com homens saudáveis procedentes de Estocolmo, ($p < 0.01$ **); Não houve diferença significativa entre os homens saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com homens saudáveis procedentes de Estocolmo; Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.5 Linfócitos T CD3⁺

A expressão do marcador CD3 foi analisada em indivíduos saudáveis das três localidades São Paulo, Estocolmo e São Francisco. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 10) demonstra que houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 51 (42-58)] que expressaram mais CD3⁺ quando comparados

aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 37 (29-46)] ($p<0.05$). Houve diferença estatística entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 51 (42-58)] que expressaram menos $CD3^+$ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 66 (57-70)] ($p<0.01$). Também observamos que houve diferença estatística entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 37 (29-46)] que expressaram menos $CD3^+$ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 66 (57-70)] ($p<0.001$).

Figura 10: Expressão de linfócitos T $CD3^+$. Gráfico representativo do valor de porcentagem para o marcador $CD3^+$ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco ($p<0.01$ **); Menor expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo, ($p<0.05$ *); Menor expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo, ($p<0.001$ ***); Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.6 Linfócitos T $CD4^+$

A subpopulação de linfócitos T auxiliares é caracterizada por expressar a molécula CD4. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 11) demonstra que não houve diferença significativa na expressão de CD3⁺CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 39 (26-46)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 42 (30-59)]; e quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 28 (20-37)]. Entretanto, observamos que houve diferença significativa com maior expressão de CD3⁺CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 42 (30-59)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 28 (20-37)] ($p < 0.01$).

Figura 11: Expressão de linfócitos T CD3⁺CD4⁺. Gráfico representativo do valor de porcentagem para os marcadores CD3⁺CD4⁺ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco e procedentes de Estocolmo; Maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo, ($p < 0.01$ **); Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.7 Linfócitos T CD4⁺CD69⁺

A subpopulação de linfócitos T auxiliares CD4⁺ podem expressar diversas proteínas em sua superfície, que caracteriza diversas funções na resposta imunológica. Neste trabalho, iremos abordar o estado de ativação dos linfócitos T e células NKT. Nesta etapa do trabalho, utilizamos o marcador celular CD69 que está comumente expresso em linfócitos T ativados tanto em seu estado basal, como em infecção aguda. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 12) demonstra que não houve diferença significativa na expressão de CD3⁺CD4⁺CD69⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 45 (41-46)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 32 (17-57)]. Entretanto, observamos que houve diferença significativa com maior expressão de CD3⁺CD4⁺CD69⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 45 (41-46)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 10 (7-13)] ($p<0.001$). Também observamos que houve diferença significativa com maior expressão de CD3⁺CD4⁺CD69⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 32 (17-57)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 10 (7-13)] ($p<0.001$).

Figura 12: Expressão de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e de marcador de ativação celular $CD69^+$. Gráfico representativo do valor de porcentagem para os marcadores $CD3^+CD4^+CD69^+$ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco; Maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.0001$ ***); Maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.0001$ ***). Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.8 Linfócitos T $CD4^+CCR5^+$

Outra subpopulação de linfócitos T $CD4^+$ para avaliar o estado de migração desta subpopulação utilizamos o marcador celular $CCR5$. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 13) demonstra que houve diferença significativa com maior expressão de $CD3^+CD4^+CCR5^+$ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 18 (13-27)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 1.36 (0.69-2.42)] ($p < 0.001$). Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis

procedentes de São Paulo [M: 18 (13-27)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 14 (9-17)]; Houve diferença significativa com menor expressão de CD3⁺CD4⁺CCR5⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 1.36 (0.69-2.42)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 14 (9-17)] ($p < 0.001$);

Figura 13: Expressão de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CCR5⁺. Gráfico representativo do valor de porcentagem para os marcadores CD3⁺CD4⁺CCR5⁺ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando que houve diferença significativa com maior expressão de CD3⁺CD4⁺CCR5⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.001$ ***); Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo; Houve diferença significativa com menor expressão de CD3⁺CD4⁺CCR5⁺ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.001$ ***). Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.9 Linfócitos T CD8⁺

A subpopulação de linfócitos T citotóxicos é caracterizada por expressar a molécula CD8. A análise da expressão deste marcador em

porcentagem (Figura 14) demonstra que houve maior expressão de $CD3^+CD8^+$ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 45 (40-53)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 9 (6-17)] ($p<0.0001$). Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 45 (40-53)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 38 (30-43)]. Houve diferença significativa com menor expressão de $CD3^+CD8^+$ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 9 (6-17)] quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 38 (30-43)] ($p<0.001$).

Figura 14: Expressão de linfócitos T $CD3^+CD8^+$. Gráfico representativo do valor de porcentagem para os marcadores $CD3^+CD8^+$ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco ($p<0.0001$ ***); Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo; Houve diferença significativa com menor expressão de $CD3^+CD8^+$ em células mononucleares do sangue periférico nos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p<0.001$ ***). Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.10 Linfócitos T CD8⁺CD69⁺

A subpopulação de linfócitos T CD8, pode expressar o marcador de ativação celular CD69. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 15) demonstra que houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 30 (28-33)] que apresentaram menor expressão de CD3⁺CD8⁺CD69⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 45 (36-73)] ($p < 0.05$). Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 30 (28-33)] que apresentaram maior expressão de CD3⁺CD8⁺CD69⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 9 (8-14)] ($p < 0.001$). Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 45 (36-73)] que apresentaram maior expressão de CD3⁺CD8⁺CD69⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 9 (8-14)] ($p < 0.001$).

Figura 15: Expressão de linfócitos T CD3⁺CD8⁺ e de marcador de ativação celular CD69⁺. Gráfico representativo do valor de porcentagem para os marcadores CD3⁺CD8⁺CD69⁺ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando que houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo que apresentaram menor expressão de CD3⁺CD8⁺CD69⁺ quando comparados aos indivíduos

saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.05$ *); Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo que apresentaram maior expressão de CD3⁺CD8⁺CD69⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.001$ ***); Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco que apresentaram maior expressão de CD3⁺CD8⁺CD69⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.001$ ***). Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.11 Linfócitos T CD8⁺CCR5⁺

A subpopulação de linfócitos T CD8 foi identificada juntamente com o marcador de migração celular CCR5⁺. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 16) demonstra que houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 33 (22-41)] que apresentaram maior expressão de CD3⁺CD8⁺CCR5⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 2 (1-5)] ($p < 0.001$). Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 33 (22-41)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 24 (18-33)]. Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 2 (1-5)] que apresentaram menor expressão de CD3⁺CD8⁺CCR5⁺ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 24 (18-33)] ($p < 0.001$).

Figura 16: Expressão de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ e de marcador de migração celular $CCR5^+$. Gráfico representativo do valor de porcentagem para os marcadores $CD3^+CD8^+CCR5^+$ em células mononucleares do sangue periférico demonstrando maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados com indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.001$ ***). Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo; Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco que apresentaram menor expressão de $CD3^+CD8^+CCR5^+$ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.001$ ***). Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.12 Mensuração de células NKT em células mononucleares do sangue periférico (CMSP)

Para identificar as células NKT, nós marcamos as CMSP com anticorpos monoclonais contra o anti-CD3, anti-V β 11 e anti-V α 24 e CD1d, CD4, CD8, e analisamos por citometria de fluxo multiparamétrica; Entretanto, não demonstraremos os valores de CD1d porque na qualificação foi observado que não houve diferença entre os marcadores, portanto, não utilizamos no restante das amostras. As células NKT foram identificadas como $CD3^+$ e co-expressão de V α 24/V β 11 (Figura 17). Devido à variabilidade das freqüências de células NKT e limitações de CMSP disponíveis, os dados

que foram incluídos neste estudo limitaram-se a um número maior ou igual a 30 eventos coletados dentro do gate de células NKT.

Observamos ao analisarmos os marcadores celulares $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ em Log 10 (Figura 17) que esses apresentaram diferença significativa sendo mais expressa nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 0.1685 (0.048-0.608)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 0.0231 (0.0122-0.0512)] ($p < 0.001$) e quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 0.0139 (0.0050-0.0206)] ($p < 0.001$); Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco [M: 0.0231 (0.0122-0.0512)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 0.0139 (0.0050-0.0206)].

Figura 17: Expressão de células T Natural Killer $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ em células mononucleares do sangue periférico. Gráfico representativo do valor de Log 10 para os marcadores $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ em células NKT demonstrando maior expressão nos indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco ($p < 0.001$ ***); Houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo com maior expressão de $V\alpha 24^+V\beta 11^+$ quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo ($p < 0.001$ ***); Não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Francisco quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo. Comparações entre grupos foram realizadas usando os testes de Anova teste não-paramétrico e teste *Dunn's Multiple Comparison*.

5.13 Expressão da subpopulação $CD4^+$ de células NKT $V\alpha24^+/V\beta11^+$

Ao observarmos a subpopulação de células NKT $CD4^+$ no grupo de São Francisco verificamos que este não expressou quantidade suficiente de eventos logo, analisamos apenas os grupos de São Paulo e Estocolmo cuja análise da expressão dos marcadores $CD4^+V\alpha24^+/V\beta11^+$ em porcentagem, demonstrou que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 18 (11-29)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M:17 (17-29)].

5.14 Expressão da subpopulação $CD8^+$ de células NKT $V\alpha24^+/V\beta11^+$

Ao observarmos a subpopulação de células NKT $CD8^+$ no grupo de São Francisco verificamos que este não expressou quantidade suficiente de eventos logo, analisamos apenas os grupos de São Paulo e Estocolmo cuja análise da expressão dos marcadores $CD8^+V\alpha24^+/V\beta11^+$ em porcentagem, demonstrou que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 16 (15-26)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M:20 (14-24)].

5.15 Expressão da subpopulação $CD4^-CD8^-$ de células NKT $V\alpha24^+/V\beta11^+$

Ao observarmos a subpopulação de células NKT $CD4^-CD8^-$ no grupo de São Francisco verificamos que este não expressou quantidade suficiente de eventos logo, analisamos apenas os grupos de São Paulo e Estocolmo cuja análise da expressão dos marcadores $CD4^-CD8^- V\alpha24^+/V\beta11^+$ em porcentagem, demonstrou que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 52 (47-62)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M:49 (21-65)].

5.16 Expressão da subpopulação CD4⁺CD8⁺ de células NKT Vα24⁺/Vβ11⁺

Ao observarmos a subpopulação de células NKT CD4⁺CD8⁺ no grupo de São Francisco verificamos que este não expressou quantidade suficiente de eventos logo, analisamos apenas os grupos de São Paulo e Estocolmo cuja análise da expressão dos marcadores CD4⁺CD8⁺ Vα24⁺/Vβ11⁺ em porcentagem, demonstrou que não houve diferença significativa entre os indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo [M: 4 (1-5)] quando comparados aos indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo [M: 9 (0-24)].

5.17 Expansão de células NKT

5.17.1 Células vivas pré-expansão e pós-expansão

Devido ao reduzido número de eventos obtidos na imunofenotipagem das células NKT para avaliarmos o perfil fenotípico de suas subpopulações foi necessário realizarmos a expansão celular em amostras de indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo. Ao analisarmos a porcentagem de células vivas pré-expansão e pós-expansão observamos que houve diferença significativa com maior número de células vivas pré-expansão [M:99 (93-99)] quando comparadas a quantidade de células vivas pós-expansão [M:59 (44-66)] ($p<0001$).

Figura 18: Expressão de células vivas pré-expansão e pós-expansão. Gráfico representativo do valor de porcentagem para avaliar a viabilidade celular demonstrando que houve diferença significativa com maior quantidade de células vivas pré-expansão quando comparadas as células pós-expansão ($p < 0.0001$ ***); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

5.17.2 Linfócitos T CD3⁺ pré-expansão e pós-expansão

A expressão do marcador de linfócitos T CD3⁺ foi analisada pré-expansão e pós-expansão celular em amostras de indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo. A análise da expressão deste marcador em porcentagem (Figura 19), demonstra que houve diferença significativa entre a quantidade de linfócitos T CD3⁺ que expressou menos linfócitos T CD3⁺ pré-expansão [M:56 (40-66)] quando comparadas a quantidade de linfócitos T CD3⁺ pós-expansão [M:85 (77-88)] ($p < 0.0001$).

Figura 19: Expressão de linfócitos T CD3⁺ pré-expansão e pós-expansão. Gráfico representativo do valor de porcentagem demonstrando que houve diferença significativa com menor quantidade de linfócitos T CD3⁺ pré-expansão quando comparadas as células pós-expansão ($p < 0.0001$ ***); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

5.17.3 Células CD14⁺/ CD19⁺ pré-expansão e pós-expansão

Também avaliamos a expressão dos marcadores celulares CD14 característico de monócitos e CD19 característico de linfócitos B pré e pós-expansão celular. A análise destes marcadores celulares em porcentagem (Figura 20), demonstra que houve diferença significativa com maior expressão de células CD14⁺/ CD19⁺ pré-expansão [M:21 (17-23)] quando comparadas as células CD14⁺/ CD19⁺ pós-expansão [M:0.7 (0.1-2.1)] ($p < 0.0001$).

Figura 20: Expressão de células CD14⁺/CD19⁺ pré-expansão e pós-expansão. Gráfico representativo do valor de porcentagem demonstrando que houve diferença significativa com maior quantidade de células CD14⁺/CD19⁺ pré-expansão quando comparadas as células CD14⁺/CD19⁺ pós-expansão ($p < 0.0001$ ***); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

5.17.4 Células NKT pré-expansão e pós-expansão

Observamos ao analisarmos as células NKT em porcentagem (Figura 21) que essas apresentaram diferença significativa sendo menos expressas no experimento pré-expansão [M: 0.05 (0.02-0.33)] quando comparadas as células NKT pós-expansão [M: 10.3 (1.86-33.2)] ($p < 0.0001$).

Figura 21: Expressão de células NKT pré-expansão e pós-expansão. Gráfico representativo do valor de Log 10 demonstrando que houve diferença significativa com menor quantidade de células NKT pré-expansão quando comparadas as células NKT pós-expansão ($p < 0.0001$ ***); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

5.17.5 Células NKT CD4⁺ pré-expansão e pós-expansão

Após a expansão celular, analisamos as subpopulações de células NKT. Observamos ao analisarmos a subpopulação CD4⁺ de células NKT em porcentagem (Figura 22) que essas células apresentaram diferença significativa sendo menos expressas na subpopulação NKT CD4⁺ pré-expansão [M: 23 (14-46)] quando comparadas as células NKT CD4⁺ pós-expansão [M: 66 (35-86)] ($p < 0.002$).

Figura 22: Expressão de células NKT CD4⁺ pré-expansão e pós-expansão. Gráfico representativo do valor de porcentagem demonstrando que houve diferença significativa com menor quantidade de células NKTCD4⁺ pré-expansão quando comparadas as células NKTCD4⁺ pós-expansão ($p < 0.002$ **); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

5.17.6 Células NKT CD8⁺ pré-expansão e pós-expansão

Analizamos a subpopulação de células NKT CD8⁺ pré e pós-expansão e não observamos diferença significativa entre a subpopulação NKT CD8⁺ pré-expansão [M: 15 (6-28)] e a subpopulação NKT CD8⁺ pós-expansão [M:12 (6-18)].

5.18 Citocinas

O próximo passo foi realizarmos ensaios intracelulares para avaliar o perfil funcional das células NKT verificando a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α .

5.18.1 Mensuração da produção da citocina IFN- γ pelas células NKT

As células NKT foram analisadas após serem estimuladas com α -galactosilceramida (α -GalCer) e também não estimuladas. Observamos ao analisarmos a produção da citocina IFN- γ pelas células NKT em porcentagem (Figura 23) que essas células apresentaram diferença significativa expressando menor quantidade da citocina IFN- γ pelas células NKT não estimuladas [M: 0.79 (0.34-2.05)] quando comparadas células NKT estimuladas com α -GalCer [M:4.02 (1.93-7.69)] ($p<0.0036$).

Figura 23: Mensuração da produção da citocina IFN- γ pelas células NKT. Gráfico representativo do valor de porcentagem demonstrando que houve diferença significativa com menor quantidade de IFN- γ produzido pelas células NKT não estimuladas quando comparadas as células NKT estimuladas com α -GalCer ($p<0.0036$ **); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

5.18.2 Mensuração da produção da citocina TNF- α pelas células NKT

Observamos ao analisarmos a produção da citocina TNF- α pelas células NKT em porcentagem (Figura 24) que essas células apresentaram diferença significativa expressando menor quantidade da citocina TNF- α pelas células NKT não estimuladas [M: 0.28 (0.00-0.96)] quando comparadas células NKT estimuladas com α -GalCer [M:3.31 (0.26-5.23)] ($p<0.0061$).

Figura 24: Mensuração da produção da citocina TNF- α pelas células NKT. Gráfico representativo do valor de porcentagem demonstrando que houve diferença significativa com menor quantidade de TNF- α produzido pelas células NKT não estimuladas quando comparadas as células NKT estimuladas com α -GalCer ($p < 0.0061$ **); Comparações entre grupos foram realizadas usando t test *Mann-Whitney* teste não-paramétrico.

RESUMO DOS RESULTADOS

As **Tabelas 7 a 9** trazem um resumo das diferenças encontradas em todo o estudo, comparando amostras de pessoas dos três centros participantes.

Tabela 7: Resumo dos resultados da marcação de superfície celular.

	São Paulo X São Francisco	São Paulo X Estocolmo	São Francisco X Estocolmo
CD3⁺	P<0.05	P<0.001	P<0.0001
CD4⁺	Não significativo	Não significativo	P<0.0062
CD4⁺CD69⁺	Não significativo	P<0.001	P<0.001
CD4⁺CCR5⁺	P<0.001	Não significativo	P<0.001
CD8⁺	P<0.001	P<0.001	Não significativo
CD8⁺CD69⁺	P<0.05	P<0.001	P<0.001
CD8⁺CCR5⁺	P<0.001	Não significativo	P<0.001
NKT	P<0.001	P<0.001	Não significativo
NKT CD4⁺	Sem eventos	Não significativo	Sem eventos
NKT CD4⁺CD69⁺	Sem eventos	Sem eventos	Sem eventos
NKT CD4⁺CCR5⁺	Sem eventos	Sem eventos	Sem eventos
NKT CD8⁺	Sem eventos	Não significativo	Sem eventos
NKT CD8⁺CD69⁺	Sem eventos	Sem eventos	Sem eventos
NKT CD8⁺CCR5⁺	Sem eventos	Sem eventos	Sem eventos

Tabela 8: Resumo dos resultados da expansão celular.

	Pré-expansão X Pós-expansão
Células vivas	P<0.0001
CD3⁺	P<0.0001
CD14⁺/CD19⁺	P<0.0001
NKT	P<0.0001
NKTCD4⁺	P<0.0020
NKTCD8⁺	Não significativo

Tabela 9: Resumo dos resultados da marcação intracelular.

	Células não estimuladas X Células estimuladas com α-GalCer
NKT IFN-γ	P<0.0036
NKT TNF-α	P<0.0061

6 DISCUSSÃO

As células T *Natural Killer* (NKT) representam um raro subtipo de linfócitos T e são consideradas como parte do sistema imune inato (Porcelli, 1993; Dellabona, 1993; Dellabona, 1994; Bendelac, 1995; Exley, 1997; Godfrey, 2000; Sandberg, 2003; Godfrey, 2004; Kronenberg, 2005). Estas células são caracterizadas por expressar rearranjo do TCR com cadeia alfa invariante V α (V α 14J α 18 em camundongos e V α 24J α 18 em humanos) e repertório V β limitado (V β 8.2, 7 ou 2 em camundongo e V β 11 em humanos) sendo a grande maioria V β 11 (Koseki, 1991; Lantz, 1994; Dellabona, 1994; Lee, 2002; Prussin, 1997; Tanaguchi, 2003). Também expressam marcadores de células NK o que as coloca na interface entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (D'Andrea, 2000; Gumperz, 2002; Takahashi, 2002; Bendelac; Kronenberg, 2005, Bendelac, 2007; Liu, 2008; Matsuda, 2008).

Estudos em modelos murinos têm demonstrado papéis críticos das células NKT na prevenção e reversão do crescimento de tumor, na prevenção de doenças autoimunes e na imunidade contra diversos patógenos microbianos (Cui, 1997; Falcone, 2007; Behar, 2007). Deficiências numéricas e funcionais das células NKT têm sido reportadas em humanos com diversas doenças como câncer de próstata, malignidade hepática e carcinoma de cólon (Tahir, 2001; Kenna, 2003; Molling, 2005) incluindo infecções bacterianas do trato respiratório e gastrointestinal (Pohl-Koppe, 1998; Skold, 2003; Bendelac, 2007), autoimunidade como Diabetes do tipo 1, artrite reumatóide, lupus eritematoso sistêmico e esclerose múltipla (Godfrey, 2000; Wilson, 2003; Hammond, 2003; Miyake, 2007) e imunidade antitumor (Bendelac, 1997; Park, 2000; Smyth, 2002; Tahir, 2001).

A frequência de células NKT em relação aos linfócitos T convencionais varia em relação aos tecidos assim como a proporção da subpopulação CD4 e CD8 e essas observações sugerem que estas células isoladas não são funcionalmente idênticas (Hammond, 1999).

A frequência dos linfócitos T convencionais é influenciada por fatores étnicos (Jiang, 2004; Blum, 2007), mas não há dados sobre o efeito da diversidade étnica e fatores ambientais sobre as células NKT em humanos (Fereidouni, 2009). Todavia, alterações genéticas tais como alterações das proteínas SAP e SLAM afetam diretamente a diferenciação, o desenvolvimento e a função das células NKT (Gadue, 2002; Chung, 2005; Nichols, 2005; Matsuda, 2006; Pasquier, 2005).

Nosso estudo demonstrou que a expressão do marcador CD3⁺ foi variável entre os três grupos estudados neste trabalho. Observamos que indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo tem maior quantidade de células CD3⁺ quando comparados com os grupos de São Paulo e São Francisco. Não podemos definir se esta maior porcentagem na periferia pode estar relacionada com maior função, pois não realizamos ensaios funcionais para linfócitos T. Entretanto, nossos dados confirmam estudos de outros países que apoiam a presença de variações tanto em número absoluto quanto em porcentagem de linfócitos T e suas subpopulações (Lee, 1996; Tsegaye, 1999; Al Qouzi, 2002; Uppal, 2003).

A hipótese de que os valores das subpopulações de linfócitos T CD4 e CD8 em indivíduos saudáveis podem ser afetados por raça, localização geográfica, gênero e atividade física têm sido demonstrados anteriormente (Miyawaki, 1984; Maiani, 1996; Tsegaye, 1999).

Ao compararmos a expressão da subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ nosso estudo demonstrou que apenas o grupo de São Francisco tem maior quantidade desta subpopulação celular em relação a Estocolmo. Segundo estudo publicado por Jiang et al., em 2004 indivíduos saudáveis procedentes da China apresentaram quantidade inferior de linfócitos T CD4⁺ quando comparados ao que foi relatado por caucasianos (Lembranchu, 1991) e é compatível com achados na Arábia Saudita e em Singapura (Lee, 1996; Shahabuddin, 1998); Este achado é importante porque a contagem de linfócitos T CD3⁺CD4⁺ é utilizada na prática clínica para determinar

prognóstico e decidir se deve fazer uso de terapia profilática diante de infecções oportunistas em pacientes portadores de HIV (Jiang, 2004).

Foi possível observarmos em nosso estudo que o grupo de São Francisco expressou menor quantidade da subpopulação de linfócitos T $CD3^+CD8^+$ em comparação aos grupos de São Paulo e Estocolmo. O mesmo ocorreu no trabalho de Jiang et al., de 2004 que relatou que os indivíduos chineses expressaram ligeira queda no número de LT $CD3^+CD8^+$ em relação ao relatado por caucasianos (Lebranchu, 1991).

Um desafio para o estudo das células NKT é a baixa frequência, muitas vezes menor de 0.1% em indivíduos saudáveis (Lee, 2002), e muitas vezes indetectável como reportados por Carvalho et al., 2010 cujo trabalho demonstrou diminuição no número de células NKT em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável quando comparados a indivíduos saudáveis e, também conforme dados demonstrados no trabalho publicado em 2009 onde Carvalho et al., observaram que a frequência de células NKT entre duas coortes de pacientes com HTLV de São Paulo e São Francisco apresentou número reduzido de células NKT em pacientes com HTLV quando comparados com indivíduos saudáveis.

Existe uma ampla variação no número e no fenótipo das células NKT de indivíduos saudáveis (Skol, 2003; Akbari, 2006), isso pode ser atribuído a variáveis tais como idade (DelaRosa, 2002; Molling, 2005; Jing, 2007) e gênero (Sandberg, 2003).

Existem poucos estudos sobre a frequência de células NKT em indivíduos saudáveis. No estudo realizado por DelaRosa 2002, a porcentagem média de células $V\alpha 24$ em adultos jovens saudáveis foi cerca de 0.3%. Em 2001, Tahir et al., demonstrou que a frequência de células NKT definida $V\alpha 24/6\beta 11$ foi 0.11% em indivíduos saudáveis No estudo realizado por Molling et al., em 2005 a média de células NKT $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ foi cerca de 0.09%. . Em 2007, Montoya et al., descreveu que a média da frequência de células $iNKT/6\beta 11$ de indivíduos saudáveis foi de 0.17%.

Baev et al., 2004 ao avaliar a frequência de células NKT em amostras de sangue de cordão, sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis e timo de crianças de 0 a 5 anos de idade que sofreram cirurgia cardíaca corretiva demonstrou que a média da frequência das células NKT no sangue periférico de indivíduos adultos saudáveis era 0.14%.

Um estudo realizado por Kukreja et al., 2002 usando $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ para identificar as células NKT, demonstrou alta frequência dessas células no sangue periférico de indivíduos saudáveis procedentes de Nova York de até 0.5% até então, esta é a mais alta frequência de células NKT já relatada.

Fereidouni et al., 2009 demonstrou alta frequência de células NKT no sangue periférico da coorte de indivíduos iranianos saudáveis (0.14 – 1.78%).

Nosso estudo demonstrou que o grupo de São Paulo possui maior quantidade de células NKT $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ quando comparados aos grupos de São Francisco e Estocolmo. Curiosamente, Sandberg et al., 2003 ao avaliar a frequência das células NKT $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ encontrou que indivíduos saudáveis procedentes de Estocolmo, apresentam maior frequência de células NKT em mulheres do que em homens com mediana de 0.05%. Interessantemente o elevado número destas células foi muito mais comum em mulheres do que em homens, e a mediana de células NKT circulantes em mulheres eram quase o dobro daquelas encontradas em homens (Sandberg, 2004);

Todavia não observamos diferença entre os gêneros nos três grupos participantes do nosso estudo assim como, no estudo de Fereidouni et al., 2009 ao avaliar a frequência de células NKT na coorte de indivíduos iranianos saudáveis observou que os homens mostraram uma tendência a ter um maior número de células NKT em relação as mulheres mas, não observou diferença significativa entre homens e mulheres. Estes dados contradizem o estudo de Molling et al., 2005 onde foi demonstrado haver diferença significativa entre homens e mulheres com predomínio do gênero feminino das células NKT (Jing, 2007; Montoya, 2007; Marsh, 2009; Bienemann, 2011).

Tabela 10: tabela comparativa da frequência em porcentagem das células NKT.

Referências	Vα24/Vβ11	Vα24/6β11	Vα24/CD1d	Significância estatística
Bibliográficas				(valor p)
Tahir, 2001		0.11		p<0.05
DelaRosa, 2002			0.3	p<0.05
Kukreja, 2002	0.5			p<0.001
Sandberg, 2003	0.05			P<0.01
Baev, 2004			0.14	p<0.001
Molling, 2005	0.009			p<0.001
Montoya, 2007		0.17		p<0.001
Fereidouni, 2009	0.14			p<0.05
Santos, 2012	0.16			p<0.001

Apesar de alguns estudos descreverem alguns marcadores de células NKT como, $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$, $V\alpha 24^+/6\beta 11^+$ e $V\alpha 24^+/CD1d^+$ (Bendelac, 1995; Kronenberg, 2002; Tahir, 2001; DelaRosa, 2002; Sandberg, 2003; Molling, 2005; Montoya, 2007) neste estudo não houve diferença significativa entre os marcadores utilizados ($V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ e $V\alpha 24^+/CD1d^+$).

As células NKT estão presentes na maioria dos tecidos onde os linfócitos T são encontrados (Bix, 1995; Bendelac, 1995; Bendelac, 1997) e sua origem e desenvolvimento ainda é um ponto de controversa. Alguns grupos de pesquisa argumentam que essas células podem se desenvolver na ausência do timo (Ohteki, 1992) provavelmente no fígado ou medula óssea (Makino, 1993; Sato, 1999), enquanto outros têm mostrado a ausência de NKT em modelos murinos sem timo, esses dados apoiam a idéia de que as células NKT são timo-dependente (Bendelac, 1995; Hammond, 1998; Kronenberg, 2000).

A distribuição das subpopulações de células NKT $CD4^+$, DN e $CD8^+$ têm sido documentada em estudos de fígado de indivíduos saudáveis e pacientes com cirrose biliar primária ou metástase de câncer de cólon (Kita, 2002; Kenna, 2003). Bricard et al., 2009 demonstrou em seu estudo que a frequência da subpopulação de células NKT $CD4^+$ em pacientes com metástase de melanoma da ulva foi elevada quando comparada com a frequência reportada em fígados de indivíduos saudáveis. A perda seletiva de células NKT $CD4^+$ e consequente desvio do compartimento de células NKT em indivíduos infectados pelo HIV pode contribuir para autoimunidade, assim como, prejudicar a imunidade contra tumor (Sandberg, 2002).

Embora as células NKT geralmente sejam descritas como um subtipo único de linfócitos T, elas podem ser divididas segundo seu fenótipo em subpopulações de $CD4^+CD8^-$ e $CD4^-CD8^-$ (duplo negativo – DN) (Lee, 2002; Crowe, 2005), e em humanos também existe a subpopulação $CD4^-CD8^+$ que não é expressa em camundongos (Kim, 2002; Gumperz, 2002). Não se sabe porque a molécula CD8 é expressa em humanos uma vez que ela não é necessária para se ligar ao CD1d em camundongos (Engel, 2010).

Para avaliarmos a frequência das subpopulações de células NKT CD4⁺ e CD8⁺ foram necessários primeiramente descartarmos o grupo de São Francisco devido ao baixo número de eventos obtidos na janela de identificação de células NKT. Analisamos a subpopulação de células NKT CD4⁺ e CD8⁺ apenas dos grupos de São Paulo e Estocolmo e nosso estudo demonstrou que não houve diferença entre eles para ambas subpopulações; Contradizendo o estudo de Carvalho et al., 2010 que observou elevada expressão de células NKTCD4⁺ e baixa expressão de NKT CD8⁺ em pacientes com Imunodeficiência Comum Variável (ICV) quando comparados a indivíduos saudáveis assim como, o estudo de Sandberg et al., 2004 onde o autor demonstra que no sangue periférico de adultos saudáveis, cerca de 50% de células NKT são CD4⁺, com baixa, ou nenhuma expressão de CD8⁺ (Sandberg, 2004).

O próximo passo do nosso estudo foi avaliarmos as subpopulações de células NKT CD4⁺CD8⁻ e também a subpopulação de células NKT CD4⁺CD8⁺ e nosso estudo demonstrou que não houve diferença entre os grupos de São Paulo e de Estocolmo em ambas subpopulações.

A existência de timócitos duplo positivos (CD4⁺/CD8⁺) é muito rara e controversa (Pellici, 2002; Gapin, 2001; Gadue, 2002). Segundo Godfrey et al., 2000 e Kronenberg et al., 2002 a expressão de CD1d em timócitos CD4⁺/CD8⁺ é necessária para o desenvolvimento das células NKT no timo. Baev et al., 2004 demonstrou que as células NKT com fenótipo duplo positivo CD4⁺/CD8⁺ compreendem cerca de 0.005% dos timócitos humanos e é 100 vezes menos frequentes do que em camundongos cuja frequência varia de 0.3% a 0.5%.

Células NKT CD4⁺ são mais comumente encontradas no sangue periférico de adultos saudáveis e não são encontradas em timo de feto (Sandberg, 2004).

Células NKT CD4⁻CD8⁻ (duplo negativo – DN) apresentam algumas diferenças funcionais com células CD4⁺ que são mais frequentes em

humanos que em camundongos (Gumperz., 2002; Lee, 2002; Crowe, 2005), e costumam ser mais do perfil Th1 (Bendelac, 2007).

Avaliamos a expressão do marcador CD69 e também do receptor de quimiocina CCR5 em nosso estudo a fim de identificar status de ativação e migração celular, respectivamente em linfócitos T CD3⁺ e em células NKT Vα24⁺/Vβ11⁺.

Foi possível observar em nosso estudo que a subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CD69⁺ foi mais expressa em São Paulo e em São Francisco do que em Estocolmo. Entretanto, nosso estudo não demonstrou diferença entre São Paulo e São Francisco.

Na sequência nosso estudo demonstrou que a subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD8⁺CD69⁺ foi mais expressa no grupo de São Francisco que nos grupos de São Paulo e Estocolmo porém, São Paulo expressou mais células CD3⁺CD8⁺CD69⁺ que Estocolmo.

CD69 é um marcador de ativação precoce de linfócitos T e células NKT (Hamann, 1993; Kakimi, 2000; Ishihara, 2000; Mallevaey, 2007). A localização de células NKT pré-ativadas pode garantir a detecção eficiente de antígenos ou patógenos por via sanguínea e promover rápida indução de resposta mediada por células *Natural Killer* (NK) (Eberl, 2000).

Ao avaliarmos a subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD4⁺CCR5⁺, nosso estudo demonstrou que São Paulo expressou mais células CD3⁺CD4⁺CCR5⁺ que São Francisco e apresentou uma tendência em ter mais dessas células em São Paulo que em Estocolmo.

Em relação à subpopulação de linfócitos T CD3⁺CD8⁺CCR5⁺ nosso estudo demonstrou que São Paulo expressou maior quantidade de células CD3⁺CD8⁺CCR5⁺ que São Francisco e uma tendência de ter mais dessa população celular que Estocolmo. Harner et al., 2011 demonstrou em seu estudo que o percentual mediano do receptor de quimiocina CCR5 no sangue de cordão umbilical foi menor quando comparado com sangue periférico de indivíduos saudáveis.

Analisar a expressão de antígenos de superfície celular das células NKT como CD25, CD56, CD62L, CD69 e CD161, e receptores de quimiocinas como CCR5 têm sido importante para análise do desenvolvimento e funcionalidade das subpopulações de células NKT em indivíduos saudáveis (Erbel, 1999; Gumperz, 2002; Lee, 2002; Kenna, 2003).

As subpopulações de células NKT expressam diferentes receptores de migração e quimiocinas (Kim et al., 2002; Thomas et al., 2003). A subpopulação de células NKT CD4⁺ preferencialmente recircula entre os linfonodos, enquanto as NKT CD4⁻ migram para a periferia (Sandberg, 2002).

Indivíduos saudáveis possuem baixa expressão de marcadores de ativação (CD25, CD38, CD69 e HLA-DR) sugerindo que as células NKT do sangue periférico são fisiologicamente programadas para migrar da periferia para o tecido inflamado, onde elas se tornam ativadas (Montoya, 2007).

De acordo com nossos dados acreditamos que os grupos de São Francisco e Estocolmo expressaram menor quantidade de CD69 do que São Paulo devido influências descritas pela Teoria da Higiene proposta no começo dos anos 90 onde o aumento da higiene, o uso difundido de antibióticos, de água potável purificada e as imunizações por vacinas podem ter privado o sistema imune em desenvolvimento, de estímulos ambientais moldados pela evolução, para manter a imunidade adaptativa longe das respostas Th2. Em síntese, ocorre uma redução nas taxas de estimulação microbiana na infância (Romagnani, 1994; Romagnani, 2000). Além do meio ambiente, a população de São Paulo também está inserida num contexto de Doenças Tropicais que levam a ativação celular com maior expressão de CD69 e o mesmo não ocorre com os outros dois grupos estudados.

Entretanto, em nosso estudo não foi possível analisarmos a expressão do marcador de ativação celular CD69 e do receptor de quimiocina CCR5 característico de migração celular nas subpopulações de células NKT CD4 e NKT CD8 por não termos obtido quantidade suficiente de eventos nos grupos de São Francisco e Estocolmo. Tornando inviável comparar nossos dados com os dados publicados por Carvalho et al., 2010 que observou que

pacientes com ICV apresentam uma frequência mais elevada de CCR5, CD69 e CXCR6 quando comparados com indivíduos saudáveis. Sugerindo que estes indivíduos possuam um padrão de células NKT migratória e de ativação.

Devido ao número reduzido de eventos obtidos na imunofenotipagem das células NKT, para avaliarmos o perfil fenotípico de suas subpopulações foi necessário realizarmos ensaios de expansão celular com as amostras provenientes de São Paulo utilizando IL-2 e α -galactosilceramida estímulo específico para células NKT. Não foi viável utilizar as amostras de São Francisco e Estocolmo, pois obtivemos poucas células viáveis dos criotubos enviados para o Laboratório de Investigação Médica - 60.

É importante descrever que as amostras de São Francisco são provenientes do processamento de células mononucleares do sangue periférico realizado em 2007 e que ficaram armazenadas em nitrogênio líquido até o momento do transporte. A respeito das amostras de Estocolmo destacamos que no momento do transporte houve falha na reposição de gelo seco o que fez com que as mesmas chegassem ao laboratório descongeladas levando a inviabilidade de uso.

Primeiramente nosso estudo demonstrou que a porcentagem de células vivas pré-expansão foi maior do que pós-expansão dado este já esperado por tratar-se de uma cultura celular de 14 dias onde no decorrer dos dias as células passam por todo estresse que envolve um ensaio *in vitro*.

Em relação aos linfócitos T CD3⁺ nosso estudo demonstrou que as amostras pré-expansão expressaram menos linfócitos T CD3⁺ que as amostras pós-expansão provavelmente, porque utilizamos a citocina IL-2 que ajuda na proliferação de linfócitos T CD3⁺ mas não de CD14⁺ e CD19⁺. Este fato foi real em nossos ensaios de expansão, pois, nas células pré-expansão tínhamos mediana de 21% de células CD14⁺ e CD19⁺ enquanto que nas células pós-expansão essa frequência diminuiu para 0.77%. Estes dados demonstram a eficácia da técnica e acreditamos que a mesma pode ser utilizada em ensaios vacinais com adjuvantes como, por exemplo, no controle

da magnitude e especificidade da resposta imune. No entanto, pesquisas adicionais são necessárias para verificar a eficácia *in vitro*.

Nosso estudo demonstrou que a frequência de células NKT pré-expansão foi menor que das células NKT pós-expansão conforme já reportado no estudo de 2011 por YU et al. onde o grupo comparou três ensaios de cultura de células NKT e observou que houve aumento das células NKT após serem estimuladas com estímulo específico α -GalCer. Também foi descrito no trabalho de Reiné et al., 2001 que houve aumento de células NKT após expansão celular utilizando estímulo de α -GalCer.

Ao avaliarmos as subpopulações de células NKT nosso estudo demonstrou que a subpopulação de células NKT $CD4^+$ pré-expansão foi menor que a pós-expansão. Já em relação a subpopulação de células NKT $CD8^+$ não houve diferença significativa.

Por fim o próximo passo foi realizarmos ensaios intracelulares para avaliar o perfil funcional das células NKT $V\alpha 24^+/V\beta 11^+$ verificando a produção das citocinas IFN- γ e TNF- α .

As células NKT apresentam um fenótipo de memória ativada na periferia e pode rapidamente secretar grande quantidade de citocinas após estímulo antigênico (Thedrez, 2007). Todas as subpopulações de células NKT humanas, ou seja, $CD4^+$, DN e $CD8^+$ produzem citocinas Th1 (INF- γ e TNF- α). A produção de citocinas Th2 (IL-4, IL-10 e IL-13) se limita a subpopulação $CD4^+$, e a NKT DN produz pouca ou nenhuma IL-4 (Gumperz, 2002; Lee, 2002; Takahashi, 2002). Esta diferença no perfil de citocinas proporciona um possível mecanismo de resposta imunorreguladora das células NKT com um recrutamento diferenciado de $CD4^+$ e $CD4^-$ podendo afetar significativamente a direção de uma resposta imunológica (Kim, 2002).

Nosso estudo demonstrou que a produção da citocina IFN- γ pelas células NKT foi menor nas células não estimuladas em comparação as células estimuladas com α -GalCer. Estudo realizado com modelos murinos demonstrou que o tratamento de camundongos *knockout* com INF- γ

provocou um padrão parcial de inibição do CD69 (Carnaud, 1999). Não são todos os estudos realizados em murinos que podem ser reproduzidos nos humanos. Acreditamos que este padrão de CD69 e INF- γ nos indivíduos de São Paulo é uma característica da população brasileira.

O mesmo ocorreu ao avaliarmos a produção da citocina TNF- α pelas células NKT, nosso estudo demonstrou que as células NKT não estimuladas produziram menor quantidade de citocina TNF- α quando comparadas as células estimuladas com α -GalCer.

Infelizmente por falta de amostras não conseguimos definir se esta maior expressão de marcadores de ativação está relacionada com a microbiota intestinal, ou com o microambiente, ou com o clima tropical que gera claramente doenças tropicais ou alguma alteração genética.

As funções das subpopulações das células NKT do sangue periférico humano ainda não são bem compreendidas, no entanto, parecem ser diferentes no seu perfil de expressão gênica, produção de citocinas e capacidade de ativar células vizinhas (Lin, 2004; Lin, 2006; Yuling, 2009).

São necessários mais estudos genéticos para podermos verificar qual seria um fator ou fatores que influenciam este aumento de células NKT e marcadores de ativação na população de São Paulo. Acreditamos que estudos mais profundos nesta área podem ajudar estudos futuros em doenças para utilização de células NKT como o uso da imunoterapia.

7 CONCLUSÕES

- A. Fomos capazes de demonstrar que indivíduos saudáveis procedentes de São Paulo, não foram os que apresentaram maiores valores de linfócitos T CD3. No entanto, foram os que apresentaram valores significantes de células NKT $V\alpha 24^+V\beta 11^+$. Não sabemos ao certo se esta diferença é fundamentada em algum fator genético, ambiental, alimentar.
- B. Por motivos técnicos não foi possível estabelecer as expressões do marcador de ativação (CD69) e de migração (CCR5) nas células NKT. Concluimos que para obtermos quantidade de células NKT suficientes é necessário utilizar células mononucleares do sangue periférico fresco, por preservar mais as células NKT.
- C. Estabelecemos apenas no grupo de São Paulo a capacidade funcional das células NKT, com capacidade de expressar IFN- γ e TNF- α e de expansão, sob estímulo específico para as células NKT (alfagalctosilceramida). Demonstrando a capacidade funcional destas células, expandindo seu uso na imunoterapia.
- D. Por final, acreditamos que vários fatores podem alterar a quantidade das células NKT na periferia e mais estudos devem ser endereçados para esclarecer melhor estes fatos.

8 ANEXOS

8.1 Anexo 1 – Questionário de Anamnese

AVALIAÇÃO CLÍNICA LABORATORIAL E QUESTIONÁRIO DE CRITÉRIOS DE SELEÇÃO

1. NOME: _____
2. ENDEREÇO: _____
3. TELEFONE/ EMAIL: _____
4. SEXO:
☐ FEMININO
☐ MASCULINO
5. NATURALIDADE: _____
6. RAÇA/ AFILIAÇÃO ÉTICA:
☐ BRANCO
☐ NEGRO
☐ ÍNDIO
☐ ASIÁTICO
7. ESCOLARIDADE:
☐ SEM INSTRUÇÃO FORMAL
☐ NÍVEL FUNDAMENTAL
☐ NÍVEL MÉDIO
☐ NÍVEL SUPERIOR
8. ATIVIDADE PROFISSIONAL: _____
9. DATA DE NASCIMENTO: ____/ ____/ ____ IDADE: ____ ANOS
10. GRUPO CONTROLE:
☐ SÃO PAULO

- ☐ ESTOCOLMO
- ☐ SÃO FRANCISCO

11. *VOCÊ TEM ASMA?*

- ☐ SIM
- ☐ NÃO
- ☐ NÃO SEI

CASO A RESPOSTA SEJA SIM, QUANDO FOI A ÚLTIMA CRISE? _____

12. *VOCÊ TEM BRONQUITE?*

- ☐ SIM
- ☐ NÃO
- ☐ NÃO SEI

CASO A RESPOSTA SEJA SIM, QUANDO FOI A ÚLTIMA CRISE? _____

13. *VOCÊ TEM ALGUM PROBLEMA DE SAÚDE? QUAL?*

- ☐ SIM _____
- ☐ NÃO
- ☐ NÃO SEI

14. *VOCÊ FAZ USO DE ALGUM MEDICAMENTO DE ROTINA? QUAL?*

- ☐ SIM _____
- ☐ NÃO
- ☐ NÃO SEI

15. *VOCÊ TOMOU A VACINA CONTRA TUBERCULOSE – BCG? QUANDO?*

- ☐ SIM _____
- ☐ NÃO
- ☐ NÃO SEI

16. *VOCÊ JÁ TEVE ALGUMA VERMINOSE? QUAL? QUANTAS VEZES?*

- ☐ SIM _____

☐ NÃO

☐ NÃO SEI

17. *VOCÊ TEVE ALGUMA DOENÇA INFECCIOSA? QUAL? QUANDO?*

☐ SIM _____

☐ NÃO

☐ NÃO SEI

18. *IMUNOFENOTIPAGEM DE SUPERFÍCIE CELULAR COM SANGUE TOTAL:*

CD45⁺: _____ CD3⁺: _____

CD4⁺: _____ CD8⁺: _____

19. *OBSERVAÇÕES:*

8.2 Anexo 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO OU RESPONSÁVEL LEGAL:

NOME DO PACIENTE:

DOCUMENTO DE IDENTIDADE N.º:

SEXO:

DATA NASC:

ENDEREÇO:

N.º

APTO:

BAIRRO:

CIDADE:

CEP:

TELEFONE:

2 – Responsável legal: _____

Natureza (grau de parentesco, tutor, curador, etc.) _____

Documento de identidade: _____ Sexo: M ☐ F ☐

Data Nascimento: _____

Endereço: _____ N _____ Apto: _____

Bairro: _____ Cidade: _____

CEP: _____ Telefone: DDD () _____

II – DADOS SOBRE A PESQUISA CLÍNICA

Título: “Caracterização das células T *natural killer* de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos de diferentes continentes.”

PESQUISADOR: Dr. Esper Georges Kallas

CARGO/FUNÇÃO: PESQUISADOR

INSC. CONS. REGIONAL N.º: CRM/SP 67395

UNIDADE DO HCFMUSP: Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60)

AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como consequência imediata ou tardia do estudo)

☐ SEM RISCO ☒ RISCO MÍNIMO X ☐ RISCO MÉDIO ☐ RISCO MAIOR

DURAÇÃO DA PESQUISA: 3 anos

1 Desenho do Estudo e Objetivos

O principal objetivo deste estudo é identificar a frequência e as funções das células NKT nos grupos de indivíduos saudáveis diferentes continentes.

As células T *Natural Killer* (NKT) são linfócitos T especializados e com características funcionais únicas. A frequência em que as células NKT encontram-se distribuídas no sangue parece ser diferente entre os indivíduos saudáveis de diferentes continentes. Investigar o perfil de diferentes substâncias presentes nestas células e suas funções diante das respostas contra agentes estranhos é de extrema importância, uma vez que, estas células influenciam diretamente em vários tipos de doenças. A variação no número de células NKT é observada de acordo com relatos que demonstram haver diferença entre os indivíduos saudáveis em comparação àqueles que apresentam qualquer tipo de patologia. Portanto, é importante verificar as diversas propriedades particulares destas células para confirmar o seu potencial imunogênico. Para isso, estamos convidando os seguintes grupos de voluntários a participar deste estudo:

- Indivíduos com idade entre 18 e 65 anos;
- Pessoas que não apresentam nenhuma doença de base e são considerados indivíduos saudáveis.

2. Procedimentos da pesquisa

Após ter sido esclarecido sobre o estudo, você poderá decidir se deseja ou não participar. Se decidir participar, você será solicitado a assinar o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido** ou colocar suas impressões digitais em frente a uma testemunha de sua confiança. Uma cópia deste documento lhe será fornecida. Sua participação consistirá de duas visitas semestrais onde serão realizados testes laboratoriais realizados com 90ml de sangue (equivalente a um terço de um copo de requeijão) coletados por uma agulha esterilizada descartável que será introduzida na veia no braço (procedimento rotineiro).

3. Relação dos procedimentos

Assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, coleta de sangue por punção de veia periférica do antebraço de 90 ml de sangue através de agulha descartável e tubos a vácuo.

4. Riscos e desconfortos esperados

Os riscos relacionados com sua participação são mínimos. Algumas pessoas referem dor no local da punção venosa e sensação de desmaio e raramente ocorrem complicações como formação de hematomas ou infecções locais.

5. Vantagens na participação deste estudo

Não existe nenhum benefício direto a você por participar neste estudo, mas as informações obtidas de sua participação poderão beneficiar no futuro outras pessoas dependendo das conclusões do estudo.

Você não terá despesas pessoais incluindo exames e consultas. Despesas adicionais serão absorvidas pelo orçamento da pesquisa. Não haverá compensação financeira.

6. Procedimentos alternativos e/ou experimentais

Você não será submetido a nenhum procedimento experimental neste estudo. Como não se trata de estudo relacionado a possíveis tratamentos, não existem procedimentos alternativos a serem descritos.

7. Garantia de acesso aos pesquisadores

Você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores do estudo são Bianca Almeida Natali dos Santos e Dr. Esper Georges Kallás, que podem ser encontrados na Rua Dr. Arnaldo, 455 3 andar, SP. Tel: 30618314 e 30618315. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225-5º andar, tel: 30696442 ramais 16, 17, 18 ou 20, FAX 3069 6442 ramal 26 São Paulo - SP e-mail: cappesq@hcnet.usp.br

8. Voluntariedade

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

9. Direito de Confidencialidade

A confidencialidade das informações obtidas nesse estudo será garantida e os dados obtidos serão analisados em conjunto com os de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação do voluntário. Sua participação neste estudo é confidencial e sigilosa. A menos que seja exigido por lei, somente a equipe de estudo, Comitês de Ética em Pesquisa e Investigadores das agências regulatórias governamentais poderão ter acesso direto aos registros médicos para verificar as informações do estudo. O material e dado coletados durante este projeto só será utilizado para esta pesquisa.

10. Direito de ser mantido atualizado quanto aos resultados da pesquisa

Os dados obtidos com a realização deste estudo estarão à disposição dos voluntários sem que o sigilo de cada participante seja prejudicado.

11. Despesas e Compensações

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa. Em caso de dano pessoal com nexo causal comprovado, o participante tem direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

12. Compromisso do pesquisador

Materiais e dados obtidos serão utilizados somente para estudo e publicações científicas.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu discuti com o Dr. Esper Georges Kallas ou Bianca Almeida Natali dos Santos sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros pra mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos pertinentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do voluntário /representante legal

Data

Assinatura da testemunha

Data

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário ou representante legal para a participação neste estudo:

Prof. Dr. Esper Georges Kallás

Data

Pesquisador responsável

8.3 Anexo 3 – Aprovação CAPPesq

APROVAÇÃO

O Presidente da Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 08/02/2010, **APROVOU ad-referendum versão 1.0 de 19.05.09** do Protocolo de Pesquisa nº **0784/09**, intitulado: "**CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO EM INDIVÍDUOS DE DIFERENTES CONTINENTES**", apresentado pelo **CLÍNICA MÉDICA**, inclusive Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme parecer anexo.

Tendo em vista o protocolo pertencer à área temática "pesquisa com cooperação estrangeira" o pesquisador deverá aguardar a aprovação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa-CONEP, para iniciar a pesquisa.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar a CAPPesq, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: **PROF. DR. ESPER GEORGES KALLÁS**

Pesquisador (a) Executante: **BIANCA ALMEIDA NATALI DOS SANTOS**

CAPPesq, 08 de fevereiro de 2010.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente da Comissão de Ética para Análise
de Projetos de Pesquisa

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo – SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br
matc

CIÊNCIA

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 23/02/2011, **TOMOU CIÊNCIA** do(s) documento(s) abaixo mencionado(s) no Protocolo de Pesquisa nº **0784/09**, intitulado: **"CARACTERIZAÇÃO DAS CÉLULAS T NATURAL KILLER DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO EM INDIVÍDUOS DE DIFERENTES CONTINENTES"** apresentado pelo Departamento de CLÍNICA MÉDICA.

• **Atendimento dos itens 1 a 6 parecer CONEP Nº 253/10**

Pesquisador (a) Responsável: **Esper Georges Kallás**

CAPPesq, 25 de Fevereiro de 2011

PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO
Coordenador
Comissão de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

8.4 Anexo 4 – Aprovação CONEP

1573/10

CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER N.º 253/2010

Registro CONEP 15866 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Registro no CEP – 0784/09

Processo nº 25000.044699/2010-21

Projeto de Pesquisa: *“Caracterização das células T natural killer de células mononucleares de sangue periférico em indivíduos de diferentes continentes”*. Protocolo Versão 1.0 de 19/05/2009;

Pesquisador Responsável: Dr. Esper Georges Kallas

Instituição: HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (**ÚNICO CENTRO BRASILEIRO**)

CEP de origem: HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Área Temática Especial: Pesquisa com cooperação estrangeira

Patrocinador: Não informado na Folha de Rosto.

Sumário geral do protocolo

A investigação do perfil fenotípico e funcional das células T Natural Killer (NKT) nas respostas imunológicas é foco de intensa investigação devido à influência que exercem em vários tipos de doenças. São um grupo distinto de células T, que foram originalmente descritas como linfócitos T que expressavam, ao mesmo tempo, o receptor de células T (TCR) e, marcadores de células NK após ativação, incluindo NK1. 1 (CD161 nos humanos, marcador específico na maturação de células NKT V α 24), DX5 ou CD56 (5, 6, 9, 16, 26). Recentemente essas células foram definidas como linfócitos que apresentam TCR com cadeia alfa invariante, em humanos V α 24J α 28 e em camundongos V α 14J α 18. Essas células NKT invariáveis representam os linfócitos capazes de fazer interação entre

O número absoluto de células NKT V α 24+ no sangue periférico diminui em uma ampla variedade de doenças auto-imunes, como na esclerose múltipla, artrite reumatóide, esclerose sistêmica, síndrome de Sjogren, lúpus eritematoso sistêmico, hepatite auto-imune, doença de Crohn, colite ulcerosa, psoríase, lúpus eritematoso cutâneo e dermatoses bolhosas. Indivíduos controles saudáveis apresentam cerca de 1450 células NKT/ml no sangue periférico e é possível constatar que a idade (25 a 80 anos) e o gênero não interferem de maneira significativa no número de células NKT destes indivíduos. Da mesma forma, não há relação observada com a duração da doença auto-imune (dados não demonstrados), implicando que os defeitos na população de células NKT V α 24+V β 11+ precede ou coincide com o aparecimento deste tipo de doença.

Pacientes com câncer apresentam diminuição considerável no número de células NKT V α 24+V β 11+ quando comparados a indivíduos saudáveis. Há evidências de aumento de células NKT no lavado brônquico alveolar de pacientes com asma, que recrutam estas células capazes de produzir rapidamente citocinas tipo Th2 (IL-4 e IL-13), provocando o desenvolvimento de hipersensibilidade das vias aéreas. As células NKT parecem também ter um papel nas infecções causadas por micobactérias.

A citometria de fluxo é uma tecnologia moderna, que possibilita a análise simultânea de múltiplas características de uma célula ou partícula em meio líquido. A

a pesquisa para a qual está sendo convidado, fornecendo a ele (a) todos os esclarecimentos necessários para decidir livremente se quer participar ou não. Solicita-se, portanto, a reformulação do TCLE tendo como referência o capítulo IV da Resolução CNS 196/96: em linguagem clara e acessível, descrevendo claramente a justificativa, os objetivos, os procedimentos, os desconfortos e riscos possíveis, os benefícios esperados, os métodos alternativos existentes, a forma de acompanhamento e assistência bem como seus responsáveis, a garantia de sigilo, as formas de ressarcimento de despesas decorrentes da participação na pesquisa, formas de indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa. Ainda, especificar que o material utilizado será descartado após o estudo, sendo de uso restrito a esta pesquisa.

4. Com relação a seleção dos participantes do estudo, o protocolo não apresenta o modo de chamada dos indivíduos e nem como será feita a comprovação de ser saudável. Os critérios de inclusão referem-se somente a idade não mencionando a condição saudável. Serão realizados exames? Solicita-se esclarecimento deste item.
5. Relativo ao item de análise dos dados é descrito que serão utilizados métodos não paramétricos para comparação entre os resultados obtidos nas diferentes populações dos países participantes, porém não detalha quais testes e para que medidas. Solicita-se adequação.
6. Em relação ao benefício para os participantes do estudo, não se encontram no protocolo referências a devolução de dados de interesse para os mesmos, caso sejam encontrados, nem procedimentos para o atendimento desta população em caso de descoberta do indivíduo ser não saudável, durante e a triagem. Solicita-se esclarecimento.
7. No plano de aplicação financeira do estudo encontram-se despesas que não fazem parte do material já disponível no laboratório (conforme declaração do pesquisador), porém não é indicada a fonte que financiará estes custos (material de consumo, viagens, etc). Ainda, este plano não representa o orçamento detalhado do estudo. Solicita-se adequação do orçamento e a indicação da fonte financiadora.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento das questões acima e **encaminhar à CONEP as recomendações** cumpridas antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação à CONEP.**

Brasília, 02 de junho de 2010.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS

RECEBIDO
DATA 15/06/10
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CNS/MS

8.5 Anexo 5 – Comprovante de doação das células mononucleares do sangue periférico das amostras provenientes de São Francisco

Regional Ethical Review Board in
Stockholm
Box 289
SE-171 77 STOCKHOLM
Sweden
146 8 52480000

2007-07-18

IRB: 2007/772-32 (420/02 previously)

Project title in Swedish: In vitro studier av immunitet mot infektionssjukdomar i människa.

Project title in English: In vitro studies of immunity to infectious diseases in humans

The research projects IRB 420/02 received ethical approval on December 2nd, 2002.

According to Swedish law, approved research projects should not undergo yearly ethical reviews unless there has been a change to the project. There has been an amendment introduced to the above mentioned investigational project (2007/772-32), which was approved on July 9, 2007. This means that the project, by law, is still approved.

I hereby confirm that the research projects IRB 2007/772-32 (420/02 previously) is currently under a valid ethical approval.

On behalf of the Regional Ethical Review Board (a governmental body)
Stockholm, July 18, 2007

Scientific Secretary
Anders Björkman

Research Ethical Review Board in Stockholm
P.O.Box 289
SE-171 77 Stockholm
Sweden

8.6 Anexo 6 – Comprovante de doação das células mononucleares do sangue periférico das amostras provenientes de São Francisco

STANFORD BLOOD CENTER, Palo Alto, CA 94304
SALVAGED PRODUCTS CARTON PACKING FORM

Shipped from: STANFORD BLOOD CENTER
3373 HILLVIEW AVE
PALO ALTO CA 94304

Ship to: UCSFON
UCSF/NIXON
1001 POTRERO AVE
BUILDING 3, ROOM 603
SAN FRANCISCO CA 94110

Boxed on 02/10/2011 Carton Id: UX000169 contains RESID-LEUK
Shipment Id: 49305 Bill Of Lading:

No	Unit #	Blood Type	Collection Date	Volume (ml)	Exp Date
1.	W070511000207 -St 132	A+	02/10/2011	10.000	02/12/2011
2.	W070511000289 -St 133	O+	02/10/2011	10.000	02/12/2011

Stan 132 male, 1948
Stan 133 male 1950

"RESEARCH ONLY
"RELEASED UNTESTED"

No. of bags 2 for a total weight of .020 liters.
pected and boxed by: SENR

Authorized Signature _____ Date _____

DATE: 02/10/2011 18:40 PAGE : 1 OF 1

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abbas A. K., A. H. Lichtman, and S Pillai (2008). "Celular and Molecular Immunology." *Ed Elsevier*, 6th Ed:267-320.
2. Akbari O., Stock P., Meyer E., Kronenberg M., Sidobre S., Nakayama T., Taniguchi M., Grusby M.J., DeKruyff R.H., Umetsu D.T. (2003). "Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity". *Nat Med*, 9:582-588.
3. Akbari O., Faul J.L., Hoyte E.G., Berry J., Wahlstrom J., Kronenberg M., DeKruyff R.H., and Umetsu D.T. (2006). "CD4⁺ invariant T-cell-receptor + natural killer T cells in bronchial asthma." *N Engl J Med* 354(11):1117-29.
4. Arrenberg P., Halder R., Kumar V. (2009). "Cross-regulation between distinct natural killer T cell subsets influences immune response to self and foreign antigens." *J Cell Physiol* 218:246–250.
5. Baev D.V., Peng X.H., Song L., Barnhart J.R., Crooks G.M., IWeinberg K.I., and Metelitsa L.S. (2004). "Distinct homeostatic requirements of CD4⁻ and CD4⁺ subsets of V α 24-invariant natural killer T cells in humans." *Blood* 104: 4150 – 4156.
6. Beckman E.M., Porcelli S.A., Morita C.T., Behar S.M., Furlong S.T., and Brenner M.B.. (1994). "Recognition of a lipid antigen by CD1-restricted alpha beta⁺ T cells". *Nature* 372r691.
7. Behar S.M., Dascher C.C., Grusby M.J., Wang C.R., Brenner M.B. (1999). "Susceptibility of mice deficient in CD1D or TAP1 to infection with Mycobacterium tuberculosis." *J. Exp. Med.* 189:1973–80
8. Bendelac, A. (1995). "Mouse NK1⁺ T cells." *Curr. Opin. Immunol.* 7: 367–374.
9. Bendelac A. (1995). "Positive selection of mouse NK1⁺ T cells by CD1-expressing cortical thymocytes." *J. Exp. Med.* 182: 2091–2096.
10. Bendelac A., Rivera M.N., Park S.H. and Roark J.H. (1997). "Mouse CD1-specific NK1 T cells-development, specificity, and function." *Annu. Rev. Immunol.* 15: 535–562.
11. Bendelac, A., Savage P.B., and Teyton L. (2007). "The biology of NKT cells." *Annu. Rev. Immunol.* 25: 297–336.
12. Benlagha K., Weiss A., Beavis A., Teyton L., Bendelac A. (2000). "In vivo identification of glycolipid antigen-specific T cells using fluorescent CD1d tetramers." *J. Exp. Med.* 191, 1895 ± 1904.
13. Berzins S.P., Kyparissoudis K., Pellicci D.G., Hammond K.J., Sidobre S., Baxter A., Smyth M.J., Kronenberg M., Godfrey D.I. (2004). "Systemic NKT cell deficiency in NOD mice is not detected in peripheral blood: implications for human studies." *Immunol Cell Biol* 82:247-252.
14. Berzins S.P., Cochrane A.D., Pellicci D.G., Smyth M.J. & Godfrey D.I. (2005) "Limited correlation between human thymus and blood NKT cell content revealed by an ontogeny study of paired tissue

- samples." *Eur J Immunol*, **35**, 1399.
15. Bix M. and Locksley R.M. (1995). "Natural T cells: cells that co-express NKRP-1 and TCR." *J. Immunol.* 155: 1020–1022.
 16. Brigl M., Brenner M.B. (2004). "CD1: antigen presentation and T cell function." *Annu Rev Immunol* 22:817-90.
 17. Brossay L., Chioda M., Burdin N., Koezuka Y., Casorati G., et al. (1998). "CD1d-mediated recognition of an α -galactosylceramide by natural killer T cells is highly conserved through mammalian evolution." *J. Exp. Med.* 188:1521–28.
 18. Cardell S., Tangri S., Chan M., Kronenberg C., Benoist and D. Mathis. (1995). "CD1-restricted CD4⁺ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice." *J. Exp. Med.* 182:993.
 19. Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S.H., Beavis A., Koezuka Y., and Bendelac A. (1999). "Cutting edge: Cross-talk between cells of the innate immune system: NKT cells rapidly activate NK cells." *J. Immunol.* 163: 4647–4650.
 20. Carvalho K.I., Melo K.M., Bruno F.R., Snyder-Cappione J.E., Nixon D.F., Costa-Carvalho B.T., Kallas E.G. (2010). "Skewed distribution of circulating activated natural killer T (NKT) cells in patients with common variable immunodeficiency disorders (CVID)." *PLoS One*. Sep 9;5(9). pii: e12652
 21. Chang H.K., Butcher E.C., and Johnston B. (2002). "Distinct subsets of human V α 24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression." *Trends Immunology* 23(11):516-19.
 22. Chen N., McCarthy C., Drakesmith H., Li D., Cerundolo V., McMichael A.J., et al. (2006). "HIV-1 down-regulates the expression of CD1d via Nef." *Eur J Immunol* 36:278–286.
 23. Chen X., Wang X., Besra G.S., and Gumperz J.E. (2007). "Modulation of CD1d-restricted NKT cell responses by CD4." *J Leukoc Biol* 82(6):1455-65.
 24. Chiu Y.H., Jayawardena J., Weiss A., Lee D., Park S.H., et.al. (1999). "Distinct subsets of CD1d-restricted T cells recognize self-antigens loaded in different cellular compartments." *J. Exp. Med.* 189:103–10.
 25. Carnaud C., Lee D., Donnars O., Park S.H., Beavis A., Koezuka Y., Bendelac A. (1999). "Cutting Edge: Cross-Talk Between Cells of the Innate Immune System: NKT Cells Rapidly Activate NK Cells." *J Immunol* 163;4647-4650.
 26. Coffman, R.L. (2006). "Origins of the T (H) 1- T (H) 2 model: a personal perspective." *Nat Immunol* 7(6):539-41.
 27. Crowe N.Y., Uldrich A.P., Kyriassoudis K., Hammond K.J., Hayakawa Y., Sidobre S., Keating R., Kronenberg M., Smyth M.J. & Godfrey D.I. (2003) Glycolipid antigen drives rapid expansion and sustained cytokine production by NK T cells. *J Immunol*, **171**, 4020.
 28. Crowe N.Y., et al. (2005). "Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo." *J. Exp. Med.* 202, 1279–1288.
 29. Crowe N.Y., Coquet J.M., Berzins S.P., Kyriassoudis K., Keating

- R., et al. (2005). "Differential antitumor immunity mediated by NKT cell subsets in vivo." *J. Exp. Med.* 202:1279–88.
30. Das R., Sant'Angelo D.B., Nichols K.E. (2010). "Transcriptional control of invariant NKT cell development." *Immunol Rev.* 238(1):195-215.
 31. Dellabona P., Padovan E., Casorati G., Brockhaus M., Lanzavecchia A. (1994). "An invariant Valpha24 JalphaQ/V beta11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4–8- T cells." *J Exp Med.*180:1171-1176.
 32. DelaRosa O., Tarazona R., Casado J.G., Alonso C., Ostos B., Pena J., Solana R. (2002). "Valpha24 NKT cells are decreased in elderly humans." *Exp Gerontol* 37:213–7.
 33. Diana J., Lehuen A. (2009). "NKT cells: friend or foe during viral infections?" *Eur J Immunol.* 39(12):3283-91.
 34. Eberl G., Lees R., Smiley S.T., Taniguchi M., Grusby M.J. and MacDonald H.R. (1999). "Tissue-specific segregation of CD1d-dependent and CD1d-independent NKT cells." *J. Immunol.* 162: 6410–6419.
 35. Eberl G., MacDonald R. (2000). "Selective induction of NK cell proliferation and cytotoxicity by activated NKT cells." *Eur. J. Immunol.* 985–992.
 36. Emoto M., Emoto Y., Buchwalow I.B. and Kaufmann S.H.E. (1999). "Induction of IFN-gamma-producing CD4⁺ natural killer T cells by Mycobacterium bovis bacillus Calmette Guerin." *Eur J Immunol* 29(2):650-9.
 37. Engel I., et al. (2010). "Co-receptor choice by V alpha14i NKT cells is driven by Th-POK expression rather than avoidance of CD8-mediated negative selection." *J Exp Med* 207:1015–1029.
 38. Fischer K., Scotet E., Niemeyer M., Koebernick H., Zerrahn J., Mailliet S., Hurwitz R., Kursar M., Bonneville M., Kaufmann S.H., and Schaible U.E. (2004). "Mycobacterial phosphatidylinositol mannoside is a natural antigen for CD1d-restricted T cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101:10685–10690.
 39. Fleuridor R., Wilson B., Hou R., et al. (2003). "CD1d-restricted natural killer T cells are potent targets for human immunodeficiency virus infection." *Immunology.*108:3-9.
 40. Fulcher D.A., Avery D.T., Fewings N.L., Berglund L.J., Wong S., et al. (2009) "Invariant natural killer (iNK) T cell deficiency in patients with common variable immunodeficiency." *Clin Exp Immunol* 157: 365–369.
 41. Fuss I.J., et al. (2004) "Nonclassical CD1d-restricted NK T cells that produce IL-13 characterize an atypical Th2 response in ulcerative colitis." *J Clin Invest* 113:1490–1497.
 42. Gadue, P. and Stein P.L. (2002). "NKT cell precursors exhibit differential cytokine regulation and require Itk for efficient maturation." *J Immunol* 169(5): 2397-406.
 43. Gapin L., Matsuda J.L., Surth C.D., and Kronenberg M. (2001). "NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d." *Nat. Immunol.* 2:971–978.

44. Godfrey D.I., Hammond K.J.L., Poulton L.D., Smyth M.J., and Baxter A.G. (2000). "NKT cells: facts, functions and fallacies." *Immunol Today* 21(11):573-83.
45. Godfrey D.I., MacDonald H.R., Kronenberg M., Smyth M.J., Van Kaer L. (2004). "NKT cells: what's in a name?" *Nat Rev Immunol* 4:231– 237.
46. Godfrey, D. I. and Kronenberg M. (2004). "Going both ways: immune regulation via CD1d-dependent NKT cells." *J Clin Invest* 114(10):1379-88.
47. Godfrey D.I., Berzins S.P. (2007). "Control points in NKT-cell development." *Nat Rev Immunol* 7:505–518.
48. Godfrey D.I., Stankovic S., Baxter A.G. (2010). "Raising the NKT cell family." *Nat Immunol* 11:197–206.
49. Gumperz J.E., Miyake S., Yamamura T., Brenner M.B. (2002). "Functionally distinct subsets of CD1d-restricted natural killer T cells revealed by CD1d tetramer staining." *J. Exp. Med.* 195:625–36.
50. Hamann, J., Fiebig H., and Strauss M. (1993). "Expression cloning of the early activation antigen CD69, a type II integral membrane protein with a C-type lectin domain." *J. Immunol* 150:4920–4927.
51. Hammond K., Cain W., van Driel I. and Godfrey D. (1998). "Three day neonatal thymectomy selectively depletes NK1.1+ T cells." *Int. Immunol.* 10: 1491–1499.
52. Hammond K.J., Pelikan S.B., Crowe N.Y., Randle-Barrett E., Nakayama T., Taniguchi M., Smyth M.J., van Driel I.R., Scollay R., Baxter A.G. & Godfrey D.I. (1999). "NKT cells are phenotypically and functionally diverse." *Eur J Immuno* 29, 3768.
53. Harner S., Noessner E., Nadas K., Leumann-Runge A., Schiemann M., et al. (2011) "Cord Blood Va24-Vb11+ Natural Killer T Cells Display a Th2-Chemokine Receptor Profile and Cytokine Responses." *PLoS ONE* 6(1): e15714.
54. Hayakawa Y., Godfrey D.I., Smyth M.J. (2004) "Alpha-galactosylceramide: potential immunomodulatory activity and future application." *Curr Med Chem.* Jan;11(2):241-52. Review.
55. Ho L.P., Urban B.C., Thickett D.R., Davies R.J., McMichael A.J. (2005). "Deficiency of a subset of T-cells with immunoregulatory properties in sarcoidosis." *Lancet.* 19-25;365(9464):1062-72.
56. Horai R., et al. (2007). "Requirements for selection of conventional and innate T lymphocyte lineages." *Immunity* 27:775–785.
57. Illes Z., Kondo T., Newcombe J., Oka N., Tabira T., and Yamamura T. (2000) "Differential expression of NK T cell Va24JaQ invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy." *J Immunol* 164:4375-81.
58. Ishihara S., Nieda M., Kitayama J., Osada T., Yabe T., Kikuchi A., Koezuka Y., Porcelli S., Tadokoro K., Nagawa H., and Juji T. (2000). "alpha-glycosylceramides enhance the antitumor cytotoxicity of hepatic lymphocytes obtained from cancer patients by activating CD3+CD56+ NK cells in vitro." *J. Immunol.* 165:1659.

59. Jahng A., Maricic I., Aguilera C., Cardell S., Halder R.C., Kumar V. (2004). "Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide." *J Exp Med* 199:947–957.
60. Jin S. Im^a., Kang T.J., Lee S.B., et al. (2008). "Alteration of the relative levels of iNKT cell subsets is associated with chronic mycobacterial infections." *Clinical Immunology* 127:214-24.
61. Jin N., C. Roark L., Miyahara N., Taube C., Aydinug M.K., Wands J.M., Huang Y., Hahn Y.S., Gelfand E.W., O'Brien R.L., Born W.K. (2009). "Allergic airway hyperresponsiveness-enhancing gammadelta T cells develop in normal untreated mice and fail to produce IL-4/13, unlike Th2 and NKT cells." *J Immunol* 182(4):2002-10.
62. Kakimi K., Guidotti L., Koezuka Y., and Chisari F. (2000). "NKT cell activation inhibits hepatitis B virus replication in vivo." *J. Exp. Med.* 192:921.
63. Kenna T., Mason L.G., et al. (2003). "NKT cells from normal and tumor-bearing human livers are phenotypically and functionally distinct from murine NKT cells." *J Immunol* 171(4):1775-9.
64. Kim C.H., Johnston B. & Butcher E.C. (2002). "Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among Va24+Vb11+ NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity." *Blood* 100, 11–16.
65. Kim C.H., Butcher E.C., and Johnston B. (2002). "Distinct subsets of human V α 24-invariant NKT cells: cytokine responses and chemokine receptor expression." *Trends Immunol.* 23: 516 –519.
66. Kinjo Y., Wu D., Kim G., Xing G.W., Poles M.A., Ho d.D., et al. (2005). "Recognition of bacterial glycosphingolipids by natural killer T cells." *Nature* 434(7032):520-5.
67. Kita H., Naidenko O.V., Kronenberg M., Ansari A.A., Rogers P., He X.S., Koning F., Mikayama T., Van de Water J., Coppel R.L., et al. (2002). "Quantitation and phenotypic analysis of natural killer T cells in primary biliary cirrhosis using a human mid tetramer." *Gastroenterology* 123: 1031–1043.
68. Kobayashi S., Kaneko Y., Seino K., Yamada Y., Motohashi S., Koike J., Sugaya K., Kuriyama T., Asano S., Tsuda T., Wakao H., Harada M., Kojo S., Nakayama T., Taniguchi M., (2004) "Impaired IFN-gamma production of Valpha24 NKT cells in non-remitting sarcoidosis." *Int Immunol* Feb;16(2):215-22.
69. Kojo S., Adachi Y., Keino H., Taniguchi M., Sumida T. (2001). "Dysfunction of T cell receptor AV24AJ18+, BV11+ double-negative regulatory natural killer T cells in autoimmune diseases." *Arthritis Rheum.* 44:1127–38.
70. Kronenberg M., and Gapin L. (2002). "The unconventional lifestyle of NKT cells." *Nat Rev Immunol* 2(8):557-68.
71. Kukreja A., et al. (2002). "Multiple immunoregulatory defects in type-1 diabetes." *J. Clin. Invest* 109:131–140.
72. Lantz O., and Bendalac, A. (1994). "An invariant T cell receptor chain is used by a unique subset of MHC class I specific CD4+ and

- CD4⁺ T cells in mice and humans." *J. Exp. Med* 180: 1097–1106.
73. Lee P.T., Benlagha K., Teyton L., and Bendelac A. (2002). "Distinct functional lineages of human V-24 natural killer T cells." *J. Exp. Med.* 195: 637–641.
 74. Lehuen A., Lantz O., Beaudoin L., Laloux V., Carnaud C., Bendelac A., Bach J.F., Monteiro R.C. (1998) "Overexpression of natural killer T cells protects Valpha14- Jalpha281 transgenic nonobese diabetic mice against diabetes." *J Exp Med* 188:1831–1839.
 75. Lin H., Nieda M., Nicol A.J. (2004). "Differential pro- liferative response of NKT cell subpopulations to in vitro stimulation in presence of different cytokines." *Eur J Immunol* 34:2664–2671.
 76. Lin H., Nieda M., Rozenkov V., Nicol A.J. (2006). "Analysis of the effect of different NKT cell subpopulations on the activation of CD4 and CD8 T cells, NK cells, and B cells." *Exp Hematol* 34:289–295.
 77. Lin H., Nieda M., Hutton J.F., Rozenkov V., Nicol A.J. (2006). "Comparative gene expression analysis of NKT cell subpopulations." *J Leukoc Biol* 80:164–173.
 78. Li W., Sofi M.H., Rietdijk S., Wang N., Terhorst C., Chang C.H. (2007). "The SLAM-associated protein signaling pathway is required for development of CD4⁺ T cells selected by homotypic thymocyte interaction." *Immunity* 27:763–774.
 79. Liu Y., Teige I., Birnir B., Issazadeh-Navikas S. (2006). "Neuron mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE." *Nat Med* 12(5):518–525.
 80. Maeda, T., Keino H., Asahara H., Tanaguchi M., Nishioka K., and Sumida T. (1999). "Decrease TCR AV24AJ18 double-negative T cells in rheumatoid
 81. Mallevaey et al., (2007). "Invariant and Noninvariant Natural Killer T Cells Exert Opposite Regulatory Functions on the Immune Response during Murine Schistosomiasis." *Infection and immunity* p. 2171–2180 Vol. 75, 9567/07.
 82. Matsuda J.L., Naidenko O.V., et al. (2000). "Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers." *J Exp Med* 192(5):741-54.
 83. Mattner J., Debord K.L., Ismail N., Goff R.D., Cantu C., Zhou D., et al. (2005). "Exogenous and endogenous glycolipid antigens activate NKT cells during microbial infections." *Nature* 434:525-9.
 84. Marsh R.A., et al. (2009). "Patients with X-linked lymphoproliferative disease due to BIRC4 mutation have normal invariant natural killer T-cell populations." *Clin Immunol* 132:116–123.
 85. Metelitsa L.S., Naidenko O.V., et al., (2001). "Human NKT cells mediate antitumor cytotoxicity directly by recognizing target cell CD1d with bound ligand or indirectly by producing IL-2 to activate NK cells." *J Immunol* 167(6): 3114-22.
 86. Moll M., Snyder-Cappione J., Spotts G., Hecth F.M., Sandberg J.K., and Nixon D.F. (2006). "Expansion of CD1d-restricted NKTcells in patients with primary HIV-1 infection treated with

- interleukin-2." *Blood* 107:3081-3.
87. Molling J.W., Kolgen W., et al. (2005) "Peripheral blood IFN- γ secreting V α 24⁺V β 11⁺ NKT cell numbers are decreased in cancer patients independent of tumor type or tumor load." *Int. J. Cancer* 116:87-93.
 88. Montoya C.J., Pollard D., Martinson J., Kumari K., Wasserfall C., Mulder C.B., Rugeles M.T., Atkinson M.A., Landay A.L., and Wilson S.B. (2007). "Characterization of human invariant natural killer T subsets in health and disease using a novel invariant natural killer T cell-clonotypic monoclonal antibody, 6B11." *Immunology* 122: 1–14.
 89. Moody D.B., Zajonc D.M. and Wilson I.A., (2005). "Anatomy of CD1-lipid antigen complexes." *Nat Rev Immunol* 5: 387-400.
 90. Morita M., Motoki K., Akimoto K., Natori T., Sakai T., Sawa E., Yamaji K., Koezuka Y., Kobayashi E., Fukushima H., (1995). "Structure–activity relationship of alpha-galactosylceramides against B16-bearing mice." *J. Med. Chem* 38, 2176.
 91. Motahashi S., Kobayashi S., et al. (2002). " Preserved IFN-gamma production of circulating Valpha24 NKT cells in primary lung cancer patients."
 92. Motsinger A., Haas D.W., Stanic A.K., Van Kaer L., Joyce S. & Unutmaz D. (2002). "CD1d-restricted human natural killer T cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus 1 infection." *J Exp Med*, 195, 869.
 93. Murdoch D.M., Venter W.D.F., Rie A.V. and Feldman C. (2007). "Immune reconstitution inflammatory syndrome (IRIS): review of common infectious manifestations and treatment options." *AIDS Res Ther* 4:9.
 94. Ohteki T., Okuyama R., Seki S., Abo T., Sugiura K., Kusumi A., Ohmori T., Watanabe H. and Kumagai K. (1992). "Age-dependent increase of extrathymic T cells in the liver and their appearance in the periphery of older mice." *J. Immunol* 149:1562–1570.
 95. Ohteki T., and MacDonald H.R. (1994). "Major histocompatibility complex class I related molecules control the development of CD4-8- and CD4+8+ subsets of natural killer 1.1+Tcell receptor-alpha/beta+ cells in the liver of mice." *J Exp Med* 180(2):699-704.
 96. Pellicci D.G., Hammond K.J., Uldrich A.P., Baxter A.G., Smyth M.J., and Godfrey D.I. (2002). "A natural killer T (NKT) cell developmental pathway involving a thymus-dependent NK1.1(-)CD4(-) CD1d-dependent precursor stage." *J. Exp. Med* 195:835–844.
 97. Porcelli S., Yockey C. E., Brenner M. B., and Balk S.P. (1993). "Analysis of T cell antigen receptor (TCR) expression by human peripheral blood CD4/8 $\square$ alpha/beta T cells demonstrates preferential use of several V beta genes and an invariant TCR alpha chain." *J. Exp. Med.* 178:1–16.
 98. Porcelli S.A. (1995). "The CD1 family: a third lineage of antigen presenting molecules." *Adv. Immunol.* 59:1.
 99. Prussin C., Foster B. (1997). "TCR V alpha 24 and V beta 11

- coexpression defines a human NK1 T cell analog containing a unique Th0 subpopulation.” *J Immunol.*159:5862-5870.
100. Rolf J., Bertman E., Stenstrom M., Smith E.M.S., Mansson R., Stenstad H., Yamagata T., Agace W., Sigvardsson M., and Cardell S.L. (2008). “Molecular profiling reveals distinct, functional attributes of CD1d-restricted natural killer (NK) T cell subsets”. *Mol Immunol* 45(9):2607-20.
 101. Sandberg J.K., Fast N.M., Palacios E.H., Fennelly G., Dobroszycki J., Palumbo P., et al. (2002). “Selective loss of innate CD4(R) V alpha 24 natural killer T cells in human immunodeficiency virus infection.” *J Virol* 76:7528–7534.
 102. Sandberg J. K., Bhardwaj N., and Nixon D.F. (2003). “Dominant effector memory characteristics, capacity for dynamic adaptive expansion, and sex bias in the innate Valpha24 NKT cell compartment.” *Eur J Immunol* 33:588-96.
 103. Sandberg J.K., Stoddart C.A., Brilot F., Jordan K.A. & Nixon D.F. (2004) “Development of innate CD4+ alpha-chain variable gene segment 24 (Valpha24) natural killer T cells in the early human fetal thymus is regulated by IL-7.” *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7058.
 104. Salio M., Cerundolo V. (2009). “Linking inflammation to **natural killer** T cell activation.” *PLoS Biol.* 7(10).
 105. Sato H., Nakayama T., Tanaka Y., Yamashita Y., Shibata Y., Kondo E., Saito Y. and Taniguchi M. (1999) “Induction of differentiation of pre-NKT cells to mature V 14 NKT cells by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 7439–7444.
 106. Sumida T., Sakamoto A., Murata H., Makino Y., Takahashi H., Yoshida S., Nishioka K., Iwamoto I. and Taniguchi M. (1995). “Selective reduction of T cells bearing invariant V alpha 24J alpha Q antigen receptor in patients with systemic sclerosis.” *J. Exp. Med.* 182: 1163–1168.
 107. Tahir S.M., Cheng O., et al. (2001). “Loss of IFN-gamma production by invariant NKT cells in advanced cancer.” *J Immunol* 167(7):4046-50.
 108. Takahashi T., Chiba S., Nieda M., Azuma T., Ishihara S., Shibata Y., Juji T., and Hirai H. (2002). “Cutting edge: analysis of human V α 24 β CD8 β NK T cells activated by alpha-galactosylceramide-pulsed monocyte-derived dendritic cells.” *J. Immunol.* 168: 3140–3144.
 109. Taniguchi M., Harada M., et al. (2003). “The regulatory role of Valpha14 NKT cells in innate and acquired immune response.” *Annu Rev Immunol* 21:483-513.
 110. Thedrez A., de Lalla C., Allain S., Zaccagnino L., Sidobre S., Garavaglia C., Borsellino G., Dellabona P., Bonneville M., Scotet E. & Casorati G. (2007) “CD4 engagement by CD1d potentiates activation of CD4+ invariant NKT cells.” *Blood*, 110, 251.
 111. Thomas S.Y., Hou R.H., Boyson J.E., Means T.K., Hess C., Olson P.D., Strominger J.L., Brenner M.B., Gumperz J.E., Wilson S.B., and Luster A.D. (2003). “CD1d-restricted NKT cells express a

- chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells." *J. Immunol.* 171:2571–2580.
112. Treiner E., Lantz O. (2006). "CD1d- and MR1- restricted invariant T cells: of mice and men." *Curr Opin Immunol* 18: 519–526.
 113. Tilloy F., Di Santo J.P., Bendelac A., Lantz O. (1999). "Thymic dependence of invariant V alpha 14 natural killer-T cell development." *Eur J Immunol.* 29:3313-3318.
 114. Unutmaz D. (2003). "NKT cells and HIV infection." *Microbes Infect*, 5, 1041.
 115. van der Vliet H.J., von Blomberg B.M., Hazenberg M.D., Nishi N., Otto S.A., van Benthem B.H., Prins M., Claessen F.A., van den Eertwegh A.J., Giaccone G., Miedema F., Scheper R.J. & Pinedo H.M. (2002). "Selective decrease in circulating V alpha 24+V beta 11+ NKT cells during HIV type 1 infection." *J Immunol*, 168, 1490.
 116. Vliet H.J.J.V.D., Blomberg B.M.E.V., et al. (2001). "Rapid communication circulating Vα24⁺Vβ11⁺ NKT cell numbers are decreased in a wide variety of diseases that are characterized by autoreactive tissue damage." *Clinical Immunology* 100(2):144-48.
 117. Van Kaer L. (2007). "NKT cells: T lymphocytes with innate effector functions." *Curr Opin Immunol*, 19, 354.
 118. Verykokakis M., Boos M.D., Bendelac A., Kee B.L. (2010). "SAP Protein-Dependent Natural Killer T-like Cells Regulate the Development of CD8⁺ T Cells with Innate Lymphocyte Characteristics." *Immunity* 33:1–13.
 119. Zhou, D., Mattner, J., Cantu, C., III, Schrantz, N., Yin, N., Gao, Y., Sagiv, Y., Hudspeth, K., Wu, Y. P., Yamashita, T., et al. (2004). "Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells." *Science* 306, 1786–1789.
 120. Yuling H., et al. (2009). "EBV-induced human CD8⁺ NKT cells suppress tumorigenesis by EBV- associated malignancies." *Cancer Res.* 69:7935–7944.
 121. Wu D.Y., Segal N.H., Sidobre S., Kronenberg M. & Chapman P. B. (2003). "Cross-presentation of disialoganglioside GD3 to natural killer T cells." *J. Exp. Med.* 198, 173–181.
 122. Yuling H., et al. (2009). "EBV-induced human CD8⁺ NKT cells suppress tumorigenesis by EBV- associated malignancies." *Cancer Res.* 69:7935–7944.
 123. Wang J. H., Meijers R., et al. (2001). "Crystal structure of the human CD4 N-terminal two-domain fragment complexed to a class II MCH molecule." *Proc Natl Acad Sci U S A* 98(19):1.
 124. Weinreich M.A., Odumade O.A., Jameson S.C., Hogquist K.A. (2010). "T cells expressing the transcription factor PLZF regulate the development of memory-like CD8⁺ T cells." *Nat Immunol* 11:709–716.
 125. Wu D., Xing G.W., Poles M.A., Horowitz A., Kinjo Y., et al. (2005). "Bacterial glycolipids and analogs as antigens for CD1d-restricted NKT cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:1351– 56.