

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**SUSCEPTIBILIDADE À GASTRITE AUTOIMUNE PÓS-TIMECTOMIA
NEONATAL É DETERMINADA PELA PRESENÇA DE
CÉLULAS T EFETORAS E NÃO PELA DEPLEÇÃO
DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS**

JULIA FARACHE PINTO

Rio de Janeiro
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**SUSCEPTIBILIDADE À GASTRITE AUTOIMUNE PÓS-TIMECTOMIA
NEONATAL É DETERMINADA PELA PRESENÇA DE
CÉLULAS T EFETORAS E NÃO PELA DEPLEÇÃO
DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DISSERTAÇÃO DESENVOLVIDA NA
DIVISÃO DE MEDICINA EXPERIMENTAL DA
COORDENAÇÃO DE PESQUISA DO INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER**

**ORIENTADOR: ADRIANA BONOMO
CO-ORIENTADOR: JOÃO PAULO MONTEIRO**

**INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF. PAULO DE GÓES
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
2007**

JULIA FARACHE PINTO

**SUSCEPTIBILIDADE À GASTRITE AUTOIMUNE PÓS-TIMECTOMIA
NEONATAL É DETERMINADA PELA PRESENÇA DE
CÉLULAS T EFETORAS E NÃO PELA DEPLEÇÃO
DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia e Imunologia, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Adriana Bonomo
Co-orientador: João Paulo Monteiro

RIO DE JANEIRO
JULHO/2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Farache, Julia

Susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia neonatal é determinada pela presença de células T efectoras e não pela depleção de células T regulatórias/ Julia Farache. Rio de Janeiro: UFRJ/CCS/IMPPG/2007

XVI, 119 f.

Orientador: Adriana Bonomo

Co-orientador: João Paulo Monteiro

Dissertação (mestrado) – UFRJ/IMPPG, Programa de Pós-graduação em Microbiologia e Imunologia, 2007.

1. Timectomia neonatal 2. Linfócitos T 3. Autoimunidade. 4. Imunologia – Tese. I. Bonomo, Adriana II. Monteiro, JP III. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, IMPPG. IV. Susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia neonatal é determinada pela presença de células T efectoras e não pela depleção de células T regulatórias.

Folha de aprovação

**SUSCEPTIBILIDADE À GASTRITE AUTOIMUNE PÓS-TIMECTOMIA NEONATAL É
DETERMINADA PELA PRESENÇA DE CÉLULAS T EFETORAS
E NÃO PELA DEPLEÇÃO DE CÉLULAS T REGULATÓRIAS**

Julia Farache Pinto

Rio de Janeiro, 21 de Junho de 2007.

Dra. Adriana Bonomo, Orientadora, Professora Adjunta, UFRJ
(Membro da banca)

Dr. Alberto Nóbrega, Professor Adjunto, UFRJ
(Membro da banca)

Dra. Ana Maria Caetano de Faria, Professora Adjunta, UFMG
(Membro da banca)

Dr. Julio Scharfstein, Professor Titular, UFRJ
(Membro da banca)

Dr. Marcelo Bozza, Professor Adjunto, UFRJ
(Revisor)

Dra. Lígia Peçanha, Professora Adjunta, UFRJ
(Suplente)

Dra. Rita Fucs, Professora Adjunta, UFF
(Suplente)

À minha mãe Ivone Farache (in memoriam)

Agradecimentos

Ao meu pai Nilson pelo amor, apoio e confiança. Obrigada por me dar asas e me permitir voar!!

À minha querida irmã Janini. Obrigada por estar comigo a cada vitória e a cada derrota. Independente de qualquer coisa, nós já somos vencedoras!!

Aos meus tios Lidya e Alberto por toda preocupação, carinho e amor. Obrigada por serem tão presentes e essenciais na minha vida.

À minha orientadora Adriana Bonomo por ter me dado a oportunidade de ser sua aluna e de participar de um grupo tão maravilhoso que é os bonomianos. Obrigada por tornar a imunologia algo tão apaixonante. Acho que eu consegui captar a sua mensagem!

Ao Dr. Marcello Barcinski por todo apoio e confiança. Obrigada por ter estado sempre disposto a ouvir as minhas dúvidas e a me guiar da melhor forma possível. Espero um dia poder mostrar que toda a confiança e credibilidade depositadas em mim não foram em vão.

Ao Dr. Martin Bonamino e a Dra. Etel Gimba pela orientação na parte de biologia molecular.

Ao Zilton Vasconcelos por ter me iniciado, de forma tão divertida, no mundo dos camundongos e dos transplantes. Obrigada por atender meus telefonemas loucos, em pleno domingo, com idéias de novos experimentos, e por ter sido capaz de “viajar” em cada um deles comigo.

Ao meu grande amigo João Paulo. Há pessoas que não aparecem na nossa vida por acaso, e você é uma delas. Foi a sua certeza que me fez chegar até aqui. Obrigada por me “resgatar” da indústria para ciência, por ter sido meu companheiro de bancada, por “tentar” me transformar em uma pessoa organizada, por me educar e por ter tornado todo esse trabalho possível. Parabéns por ser uma pessoa tão brilhante! E como eu sempre falo: quando eu crescer eu quero ser igual a você!!!

À ala masculina do grupo: Rômulo Areal (meu cabeçudo predileto!!), Rômulinho, Ramon (êita parceria boa!!), João Luiz e Flávio. Obrigada pelos momentos de descontração, pelas ajudas “experimentais” e por tornarem o nosso ambiente de trabalho tão agradável.

À ala feminina do grupo: Aline, Poliana, Sheila e Rafaela. Obrigada por fazerem parte da minha vida. O que será de mim sem vocês???? Amigas, vocês são especiais e insubstituíveis. Torço muito pelo sucesso de cada uma de vocês.

À Ana Paula pela grande ajuda na parte final dos experimentos. Com certeza foi uma grande aquisição para o grupo, não só no sentido profissional

(indiscutível), mas também no sentido pessoal. Obrigada por todo o apoio nos meus momentos de desespero “experimental”.

Aos amigos da Medex e da Biologia Celular, Gustavo, Douglas (meu companheiro de Real-Time), Luíze, Bruno Robbs, Giuliana, Bianca, Léo, Nina, Bruna, Luciana Boffoni, etc etc etc etc etc. Obrigada pelas conversas, pelos reagentes, pelas risadas, pelos lanches, etc etc etc etc.

À Sueli e Thaís pela grande eficiência na resolução das questões burocráticas.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação Ary Frauzino (FAF/INCA) pela ajuda financeira deste trabalho.

Finalmente, por não acreditar que tudo na vida é obra do acaso, agradeço à D's por guiar o meu caminho.

“É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ...”

Martin Luther King

RESUMO

Gastrite autoimune experimental (AIG) é uma doença autoimune órgão específica mediada por célula T CD4⁺, induzida por timectomia em camundongos de 3 dias (3dTx). A susceptibilidade à AIG é altamente variável entre as diferentes linhagens, sendo classicamente atribuída a perda das células Treg CD4⁺Foxp3⁺. Entretanto, um estudo recente mostrou a presença das Treg nos órgãos linfóides de neonatos com 3 dias. Porém, algumas questões ainda não foram esclarecidas: a susceptibilidade e resistência estão correlacionadas ao número de células Treg exportadas do timo até o terceiro dia de vida? Além disso, em camundongos adultos timectomizados, a frequência de Treg prediz a ocorrência da doença? Essas questões foram analisadas no presente estudo.

Para isso, células do baço e linfonodos de camundongos com 3 dias de vida, susceptíveis (BALB/c, A/J, C3H/He) ou resistentes (DBA/2, C57Bl/6, B10.A) à AIG foram coradas com anti-CD25 e anti-FoxP3, e analisadas por citometria de fluxo. Além disso, verificou-se a presença de células T CD4⁺FoxP3⁺ nos mesmos órgãos dos animais adultos 3dTx, correlacionando a frequência de Tregs com a evidência histológica da gastrite. Os resultados mostram que a frequência de Tregs nos camundongos neonatos não foi diferente entre as linhagens susceptíveis e resistentes. Essas análises também foram feitas nos animais adultos 3dTx, que mostram ter a mesma frequência de Treg quando comparados aos animais controles Sham. Esses resultados foram confirmados nas 6 linhagens analisadas nesse estudo. Não foi encontrada relação entre a frequência de Treg e o escore de gastrite. Ao contrário, o escore de gastrite mostrou ter uma correlação positiva com a frequência de células T ativadas nos gástricos.

A susceptibilidade à AIG não está relacionada a presença ou ausência de Tregs nos animais timectomizados. Ao contrário, a susceptibilidade à doença autoimune parece ser determinada pela frequência de células T ativadas e pela relação entre essas células e as células Tregs. Além disso, demonstrou-se a correlação entre a expressão constitutiva de $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ gástrica no timo e a variação na susceptibilidade à AIG observada nos animais BALB/c. Esses dados sugerem que o nível de expressão do autoantígeno no timo tem implicações na seleção do repertório autorreativo na gastrite autoimune.

ABSTRACT

Experimental autoimmune gastritis (AIG) is a CD4 T cell-mediated organ-specific autoimmune disease that is induced by thymectomy of 3 day-old mice (3dTx). The susceptibility to AIG is highly variable among different strains and it has been believed that AIG is caused by the lack of regulatory CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ T cells (Treg). Despite this, a recent study has reported the presence of Treg in peripheral lymphoid organs of 3 day-old mice. However, some questions remain unclear: is susceptibility or resistance correlated with the number of Treg exported from the thymus until the third day of life? In addition, in adult 3dTx mice, the frequency of Treg predicts the occurrence of disease? We addressed these questions in the present study.

For this purpose, spleen and lymph nodes cells from 3 day-old mice, susceptible (BALB/c, A/J, C3H/He) or resistant (DBA/2, C57Bl6, B10.A) to AIG were stained with anti-CD25 and anti-Foxp3 and analyzed by flow cytometry. In addition, we looked for the presence of CD4⁺Foxp3⁺ in the same organs of 3dTx adult mice and correlated the number of Tregs with histological evidence of AIG. Our results showed that the frequency of Tregs in 3 day-old mice were not different between resistant and susceptible mice. We repeated our analyses in adult 3dTx mice and found that 3dTx and sham mice show the same relative number of Treg cells. These results were confirmed in the six strain studied. In addition, we failed to find a relationship between Treg number and AIG score. In contrast to this, AIG score showed a positive correlation with the number of activated T cells in the gastric lymph nodes.

Susceptibility to AIG is not related to the presence or absence of Tregs in thymectomized mice. In contrast, susceptibility to autoimmune disease seems to be guided by the frequency of activated T cells and by the relationship between these and the Tregs. In addition, we show a correlation between constitutive expression of $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ gastric in the thymus and susceptibility variation to AIG observed in BALB/c mice. Our findings suggest that the expression level of thymic autoantigen has implication for selection of the autoreactive T-cell repertoire in autoimmune gastritis

A. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURA 1** Desenvolvimento das células T no timo
- FIGURA 2** Diversos tecidos são representados no timo através da expressão promíscua de genes
- FIGURA 3** Todas as linhagens de camundongos analisadas possuem células Treg na periferia
- FIGURA 4** A frequência de células T regulatórias nos animais 3dTx adultos não difere entre linhagens susceptíveis e resistentes à gastrite
- FIGURA 5** As células T regulatórias estão presentes nos animais BALB/c 3dTx adultos
- FIGURA 6** Parâmetros utilizados na avaliação de Gastrite Autoimune
- FIGURA 7** Nas linhagens susceptíveis o escore de gastrite não apresenta correlação com a frequência de células T regulatórias
- FIGURA 8** Os linfonodos gástricos dos animais 3dTx possuem frequência normal de Tregs.
- FIGURA 9** Detecção e caracterização fenotípicas das células T regulatória em camundongos
- FIGURA 10** Análise da população de células Treg presentes nos linfonodos e baço nas diferentes linhagens de camundongos com 3 dias de vida
- FIGURA 11** Comparação entre as frequências das células T regulatórias CD4⁺FoxP3⁺ dos camundongos neonatos susceptíveis e resistentes
- FIGURA 12** Camundongos BALB/c 3dTx apresentam aumento na frequência das células ativadas e diminuição da relação Treg:Teff^{ativada} nos linfonodos gástricos
- FIGURA 13** A susceptibilidade à gastrite se correlaciona positivamente com frequência de células T efectoras ativadas nos linfonodos gástricos, mas não com a frequência de células T regulatórias
- FIGURA 14** Somente as linhagens susceptíveis à gastrite apresentam aumento na frequência de células T ativadas CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻.
- FIGURA 14** O desenvolvimento de gastrite autoimune requer a presença de um repertório de células T efectoras gastritogênicas
- Figura16** Curvas de quantificação de fluorescência e dissociação para os genes da cadeia β da H⁺/K⁺ ATPase e GAPDH
- FIGURA 17** Expressão da cadeia β da H⁺/K⁺ ATPase no timo e incidência de gastrite na linhagem BALB/c

B. LISTA DE ABREVIATURAS

AIG **Gastrite autoimune**

qRT-PCR	PCR com transcrição reversa em tempo real
SCID	Imunodeficiência severa combinada
RNA	Ácido Ribonucléico
SFB	Soro Fetal Bovino
SP	Uni-positivos
TCR	Receptor de célula T
TEC	Célula epitelial tímica
TGF-β	Fator de crescimento tumoral beta
Treg	Células T regulatórias
TSA	Antígenos tecido-específicos
3dTx	Timectomia ao terceiro dia de vida

SUMÁRIO

I	INTRODUÇÃO	2
1.	Tolerância	2
1.1	Ontogenia da células T	3
1.2	Importância da deleção clonal como mecanismo de tolerância	5
1.3	Ampliação do universo antigênico expresso no timo e seu impacto na tolerância central	8
1.4	Mecanismos associados à tolerância induzida por Aire	12
2.	Células T regulatórias	16
2.1	Renascimento no modelo de timectomia neonatal	16
2.2	Caracterização das Tregs	18
2.3	Ontogenia das células T regulatórias	23
2.4	Mecanismos efetores da supressão pela célula T regulatória	26
3.	Autoimunidade pós-timectomia neonatal	27
3.1	Influência das Células T regulatórias	27
3.2	Análise genética: susceptibilidade x resistência	29
4.	Gastrite Autoimune como modelo de estudo	31
4.1	Características gerais	31
4.2	Expressão tímica promíscua de autoantígenos gástricos e indução de tolerância	33
II.	OBJETIVOS	36
III.	MATERIAL E MÉTODOS	37
IV.	RESULTADOS	54
1.	As linhagens susceptíveis e resistentes à doença autoimune pós-3dTx não diferem quanto à frequência de células Treg CD4 ⁺ FoxP3 ⁺	54
2.	Camundongos adultos 3dTx possuem células Treg com fenótipo e potência supressora comparável às células dos camundongos não- timectomizados	58
3.	O desenvolvimento de gastrite autoimune pós-timectomia não está relacionada à deficiência no compartimento de células T regulatórias	60
4.	A frequência de células T regulatórias no momento da timectomia não explica a resistência e susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia	64
5.	A timectomia neonatal resulta no enriquecimento do repertório de linfócitos T em células efectoras ativadas autorreativas	67
6.	O desenvolvimento de gastrite autoimune pós-timectomia neonatal requer a presença de um repertório de células T efectoras autorreativas	71
7.	A cadeia β da H ⁺ /K ⁺ ATPase é expressa no timo	72

8.	O padrão de expressão intratímica da cadeia β da H^+/K^+ ATPase condiciona o desenvolvimento de gastrite autoimune pós-3dTx	74
V.	DISCUSSÃO	77
VI.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	97

I. INTRODUÇÃO

1. Tolerância

O estabelecimento de tolerância aos autoantígenos é uma propriedade fundamental do sistema imunológico. Ao mesmo tempo em que conseguimos gerar uma resposta imune rápida e eficiente aos patógenos, somos capazes também de prevenir uma autorreatividade patogênica, ou seja, uma resposta danosa aos antígenos presentes no nosso próprio corpo. Os mecanismos celulares e moleculares que tornam o sistema imunológico capaz de preservar o organismo de respostas imunes dirigidas aos autoantígenos vêm sendo intensamente estudados. Dentre eles, destaca-se a seleção negativa de clones de células T que reconhecem com alta afinidade e avidéz complexos MHC + peptídeo (MHCp) no timo (Tolerância Central). Apesar da deleção clonal intratímica ser um dos principais responsáveis pela indução de tolerância ao *próprio*, este mecanismo não é suficiente para garantir a eliminação de todas as células T potencialmente patogênicas. As evidências que mostram a presença de células T autorreativas potencialmente patogênicas na periferia de indivíduos normais são crescentes (Katz JD *et al.*, 1993; Steinman L, 1996).

Uma questão pertinente é a seguinte: se temos células capazes de causar doenças autoimunes, porque não desenvolvemos autoimunidade freqüentemente? Na periferia, as células T autorreativas são constantemente controladas por uma série de mecanismos, denominados conjuntamente Tolerância Periférica. Esses mecanismos são responsáveis por evitar que essas células, ao entrarem em contato com autoantígenos, sejam ativadas e

causem danos ao hospedeiro. A tolerância na periferia pode ser obtida através de diferentes mecanismos como: i. deleção periférica, ii. anergia, iii. ignorância imunológica e iv. ação das células T regulatórias (Treg). A partir do momento em que esses mecanismos são perdidos, as células autorreativas podem ser ativadas na periferia pelos seus respectivos autoantígenos desencadeando autoimunidade (Walker LSK & Abbas KA, 2002). Os fatores exatos que levam à predisposição ao aparecimento das doenças autoimunes ainda não foram completamente elucidados, porém acredita-se que tanto fatores genéticos quanto ambientais estejam envolvidos nesse processo (Shevach EM, 2000; Marrack P *et al.*, 2001).

1.1. Ontogenia da célula T

A geração dos linfócitos T ocorre a partir da migração de progenitores linfóides comuns ("*Common Lymphoid Progenitors*"), derivados das células-tronco hematopoéticas, da medula óssea para o timo, onde eles se comprometem com a linhagem de células T e completam sua maturação passando por vários estágios bem definidos. No timo, as células T em desenvolvimento (ou timócitos) ficam em contato íntimo com uma rede de células epiteliais conhecida como estroma tímico, que proporciona um microambiente ímpar para o desenvolvimento dessas células através da produção de citocinas e interações celulares que estimulam a sua proliferação e maturação (Anderson G *et al.*, 1996).

O timo é constituído basicamente por duas regiões anatomicamente distintas: a cortical, mais externa, rica em timócitos imaturos e a medular, mais

interna, rica em timócitos maduros (Gill J *et al.*, 2003). Ao longo do seu processo de maturação e diferenciação, esses timócitos interagem com uma série de células presentes no microambiente tímico, que tem extrema importância nos eventos de seleção de repertório e indução de tolerância, sendo elas células dendríticas, macrófagos, células B, células epiteliais corticais e medulares - cTEC e mTEC.

A migração das células precursoras através desses microambientes no timo é crítico para a percepção de diferentes sinais que governam a geração das células T maduras. A diferenciação do timócito é caracterizada pela expressão temporal coordenada de diferentes moléculas de superfície, incluindo CD4, CD8, CD44 e CD25 (Takahama Y, 2006).

A população de timócitos no estágio mais precoce de maturação no timo não expressa nenhum marcador de células T maduras ($CD3^-CD4^-CD8^-$), sendo denominadas células “duplo-negativas” (DN), que ainda podem ser classificadas como DN1, DN2, DN3 e DN4 de acordo com a presença ou ausência dos marcadores CD44 e CD25. No estágio DN3 ($CD3^-CD4^-CD8^-CD25^+CD44^-$), as células precursoras podem dar origem a duas linhagens de células T: a população minoritária de células $T\gamma:\delta$ e a linhagem majoritária de células $T\alpha:\beta$ (Takahama Y, 2006). No córtex tímico, essas células sofrem primeiramente o rearranjo dos genes da cadeia β do receptor da célula T (TCR), passando a expressá-la na superfície celular juntamente com o pré-TCR α , constituindo o complexo pré-TCR. A expressão bem-sucedida do pré-TCR é necessária para a continuidade do desenvolvimento linfocitário, havendo morte celular em caso de rearranjo mal-sucedido (Dudley EC *et al.*, 1994). No próximo estágio de maturação, as células passam a ser $CD25^-$ (DN4),

proliferam e diferenciam, passando a expressar CD4 e CD8, sendo chamadas agora de “duplo-positivas” (Figura 1). Nessa fase também ocorre o rearranjo do *locus* da cadeia α e, conseqüentemente, aparecimento do TCR $\alpha\beta$ e CD3 na sua superfície. Essas células agora estão prontas para sofrer os eventos subseqüentes de seleção tímica, que irão determinar o repertório de células T que será gerado (von Boehmer H *et al.*, 2003).

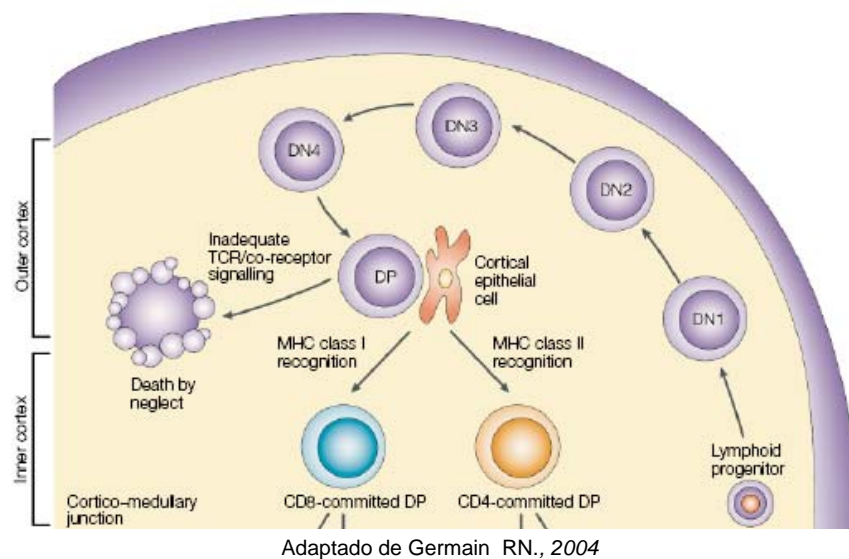


Figura 1. Desenvolvimento das células T no timo. Os progenitores linfóides chegam no timo, iniciando seu processo de diferenciação. Os timócitos DN se subdividem em 4 estágios de desenvolvimento baseados na expressão de marcadores de superfície. A expressão bem sucedida do pré-TCR leva à proliferação e transição para o estado DP, quando os linfócitos sofrerão os processos de seleção.

1.2. Importância da deleção clonal como mecanismo de tolerância

Para completar sua maturação no timo, as células T em desenvolvimento (duplo-positivas) devem ser capazes de reconhecer com baixa afinidade/avidéz, via TCR, complexos pMHC que são expressos pelas células estromais, como cTEC e células dendríticas, presentes no córtex (Robey E & Fowlkes BJ, 1994). Dessa forma, gera-se um repertório de células T restritas pelo MHC presente no ambiente tímico (“restrição ao MHC *próprio*”), sendo

estas células capazes de reconhecer complexos pMHC *próprio* presentes nos tecidos periféricos. Esse processo é conhecido como seleção positiva (Hogquist KA *et al.*, 1994). As células que falham na seleção positiva, não recebem sinais para prosseguir no seu processo de maturação e morrem por falta de estímulo ("*death by neglect*"). De fato, a maioria dos timócitos (aproximadamente 90%) morre por apoptose por não apresentar um TCR capaz de reconhecer pMHC *próprio* suficiente afinidade/ avidéz (Van Meerwijk JP *et al.*, 1997, Surh CD & Sprent J, 1994). Ao contrário, as células T que sobreviverem a esse processo de seleção positiva recebem sinais de sobrevivência e diferenciação, passando a expressar exclusivamente CD4 ou CD8 (unipositivas) (Hogquist KA *et al.*, 1994).

No entanto, os linfócitos cujo TCR reconhece com alta afinidade/avidéz os complexos MHCp sofrem apoptose, sendo eliminados por um processo conhecido como seleção negativa ou deleção clonal (Ed Palmer, 2003). A deleção das células potencialmente autorreativas foi primeiramente demonstrado por Marrack & Kappler. Através de experimentos em camundongos que expressavam um superantígeno endógeno, os autores demonstraram haver eliminação das células V β 17 cujo TCR reconhece com alta afinidade e avidéz os superantígenos presentes no timo (clones autorreativos). A análise da expressão do TCR no timo desses animais revelou ainda que a deleção clonal ocorreu durante o desenvolvimento do timócito, uma vez que a expressão dos receptores autorreativos estava presente no pool de timócitos imaturos e ausente na população de timócitos maduros presente na região medular (Kappler JW *et al.*, 1987).

Um ponto importante é que, ao contrário do que parece, os eventos de

seleção positiva e negativa não são necessariamente seqüenciais, ou seja, o timócito em desenvolvimento não precisa sofrer seleção positiva no córtex para somente depois, num estágio mais maduro passar pelo processo de seleção negativa na medula. Estudos em camundongos duplo transgênicos, envolvendo o acompanhamento dos timócitos através do uso de tetrâmeros pMHC, indicam que a seleção negativa pode ocorrer tanto antes quanto depois da seleção positiva, em todos os estágios de desenvolvimento do timócito (DN, DP e SP) (Baldwin KK *et al.*, 1999; Ed Palmer, 2003). Sendo assim, os processos de seleção seriam independentes e não seqüenciais, ocorrendo ao mesmo tempo no microambiente tímico. Porém, como a maioria das células apresentadoras (APC) que possuem os requisitos necessários para deleção e que expressam uma ampla variedade de autoantígenos, residem na região medular, a seleção negativa tende a ser localizada nessa região.

O processo de deleção clonal é iniciado por interações entre moléculas de superfície celular presentes nas APC do estroma tímico e o timócito em processo de diferenciação, o que acarreta a ativação de vias bioquímicas distintas daquelas presentes na seleção positiva, e que culmina na apoptose do timócito. Moléculas efetoras-chaves presentes nesse processo incluem os membros da família Bcl-2 (Bim, Bax e Bak) e o receptor nuclear Nur77, que está envolvido na ativação da transcrição de genes pró-apoptóticos (Venanzi ES *et al.*, 2004; Siggs OM *et al.*, 2006). Os mecanismos precisos responsáveis pela ativação dessas proteínas e, conseqüentemente, ativação da cascata de apoptose, ainda estão começando a ser esclarecidos e parecem envolver o remodelamento da cromatina, permitindo a transcrição dos mediadores apoptóticos (Venanzi ES *et al.*, 2004; Siggs OM *et al.*, 2006).

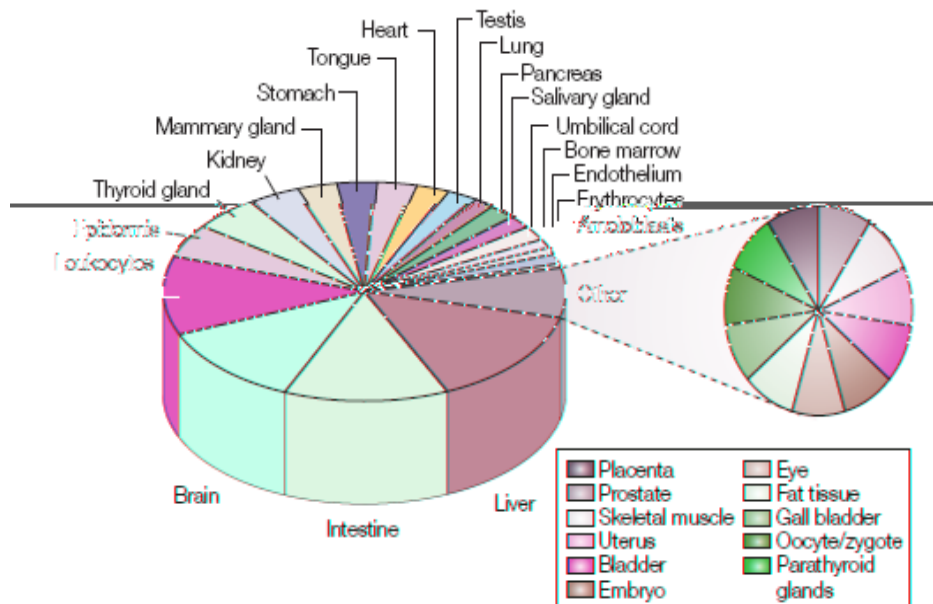
A deleção dos timócitos potencialmente patogênicos pelo processo de seleção negativa é importante para manutenção da tolerância a autoantígenos ubíquos, já que resposta dessas células a proteínas do próprio organismo resultaria em dano tecidual e autoimunidade (Kappler JW *et al.*, 1987; Kisielow P *et al.*, 1988).

A tolerância a autoantígenos, ou seja, ausência de resposta frente ao autoantígeno, gerada pela deleção de clones autorreativos no timo é denominada Tolerância Central (Schwartz R, 1999). Entretanto, a Tolerância Central não é um mecanismo suficiente para garantir a tolerância a todos os autoantígenos existentes, uma vez que a deleção clonal só é possível para aqueles pMHC que estão representados no universo antigênico tímico. Assim, células T com potencial autorreativo cujo TCR reconhece pMHC tecido-específicos que não são expressos no ambiente tímico ou ainda aquelas que reconhecem com baixa afinidade/avidéz os MHCp, conseguem escapar da seleção negativa e vão para periferia (Bonomo A & Matzinger P, 1993; Bouneaud C. *et al.*, 2000). Essas células autorreativas serão controladas por mecanismos periféricos de tolerância, como veremos mais adiante.

1.3. Ampliação do universo antigênico expresso no timo e seu impacto na tolerância central

Partindo da premissa de que os linfócitos T só seriam tolerizados no timo para os autoantígenos de expressão ubíqua e antígenos circulantes no sangue que alcançam o timo, e que são captados pelas APC tímicas, como explicar o grau de tolerância visto para antígenos periféricos que não estariam presentes

no timo? (Schwartz R, 1999). Nesse contexto, o timo teria um papel secundário na tolerância, deixando escapar uma ampla variedade de células T autorreativas, que seriam controladas somente por mecanismos periféricos de tolerância. Porém, nos últimos anos essa visão simplista da dicotomia Tolerância Periférica x Central, sofreu profundas modificações. A importância do timo na tolerância central ficou ainda mais clara após a descrição da presença de transcritos de RNA, que codificavam para proteínas cuja expressão acreditava-se estar restrita aos tecidos periféricos (Sospedra ME *et al.*, 1998; Kyewski B & Derbinski J, 2004) (Figura 2). Proteínas características de uma variedade de tecidos – como por exemplo, pâncreas, fígado, olhos e sistema nervoso – estão incluídos nessa lista e muitos dos antígenos ectopicamente expressos (insulina, tireoglobulina, proteína de mielina básica e antígeno S-retinal) estão associados a doenças auto-imunes órgão-específicas (diabetes tipo I, tireoidite de Hashimoto, esclerose múltipla e uveíte autoimune, respectivamente). Dados na literatura sugerem ainda uma correlação entre os níveis de expressão dos antígenos no timo e a susceptibilidade a doenças autoimunes, tanto em humanos quanto em camundongos (Pugliese A *et al.*, 1997; Egwuagu CE *et al.*, 1997; Klein L *et al.*, 2000; Cantó E *et al.*, 2003; Taubert R *et al.*, 2007).



Adaptado de Kyewski B & Derbinski J., 2004

Figura 2. Diversos tecidos estão representados no timo através da expressão promiscua de genes.

A expressão de antígenos tecido-específicos (TSA) no timo, também conhecida como expressão promiscua ou ectópica, parece ser uma propriedade inerente às células epiteliais tímicas (TECs), em particular às células epiteliais tímicas medulares (mTECs) (Derbinski J *et al.*, 2001; Gotter J *et al.*, 2004). Essas células parecem expressar genes representativos de quase todos, senão todos, tecidos periféricos. A expressão dos TSA também foi detectada nas cTEC e nas DC tímicas, porém tanto o número de genes expressos quanto o nível de expressão foram bem mais baixos, diferindo tanto quantitativamente quanto qualitativamente quando comparados às mTEC. Uma análise detalhada do perfil de expressão dos TSA no timo foi feita recentemente por Kyewski e colaboradores (Derbinski J *et al.*, 2005). Através da técnica de microarranjos de DNA (DNA *microarrays*), esse grupo identificou a presença de 4 diferentes grupos de genes: (1) genes expressos em níveis comparáveis em cTEC e mTEC e em baixos níveis, quando presentes, em

células hematopoéticas; (2) genes que são expressos somente nas mTECs, independentemente do seu estágio de maturação; (3) genes expressos somente nas mTEC com fenótipo maduro (MHC classe II^{high} CD80^{high}) e cuja expressão é dependente de Aire; (4) genes que são induzidos nessas mesmas células (CD80^{high}), porém a expressão é independente de Aire.

O gene *aire*, identificado e caracterizado por dois grupos independentes, é expresso nas mTEC, tanto de camundongos quanto de humanos (Su MA & Anderson MS, 2004). Mutações no gene *aire* são responsáveis por uma doença autoimune rara em humanos, conhecida como Síndrome de Poliendocrinopatia Autoimune tipo I (APS1 ou APECED) (Peterson P *et al.*, 1998). A proteína codificada pelo gene *aire*, similarmente a família de fatores de transcrição Sp100, possui um sinal de localização nuclear e vários domínios de ligação ao DNA e interação com outras proteínas, sugerindo seu papel como um modulador da transcrição (Su MA. & Anderson MS., 2004; Peterson P *et al.*, 1998; Bjorses P *et al.*, 1998). Além disso, Aire também demonstrou ter uma atividade de ubiquitina-ligase E3 *in vitro*, sugerindo um possível papel em vários efeitos associados à transferência de ubiquitinas a proteínas, o que inclui degradação proteossômica, diminuição da expressão de receptores de superfície celular e atividades independentes de proteólise (Uchida D *et al.*, 2004).

Baseando-se na propriedade funcional de Aire como fator transcricional e o fato dos pacientes com APS-1 apresentarem autoimunidade órgão-específica múltipla, acometendo órgãos (retina, adrenais, tireóide, paratireóides, glândulas salivares, estômago e ovários) cujos antígenos são na maior parte expressos nas mTEC humanas, levantou-se a possibilidade de que Aire poderia ter uma

função no controle da expressão promíscua dos genes no timo (Klein L & Kyewski B, 2000). De fato, o importante papel do fator de transcrição *aire* na expressão ectópica de TSA, conseqüentemente, na indução de tolerância intratímica foi elegantemente demonstrado através da geração de um camundongo deficiente em Aire (Anderson MS *et al.*, 2002). Esses animais desenvolveram um quadro de autoimunidade que se mostrou ser dependente da ausência de Aire nas células estromais do timo, uma vez que a expressão de Aire no epitélio tímico, e não nas células hematopoiéticas tímicas, foi capaz de induzir tolerância. Os autores também demonstraram que as mTEC do camundongo AIRE^{-/-} apresentam uma redução na expressão ectópica de vários genes codificadores de antígenos periféricos, levando ao quadro de autoimunidade descrito acima.

1.4. Mecanismos associados à tolerância induzida por Aire

Os mecanismos celulares pelo qual *aire* atua na geração de tolerância das células T ainda é muito discutido. Uma possibilidade lógica seria a sua influência na seleção negativa – as mTEC expressando *aire* iriam apresentar uma maior diversidade de complexos pMHC *próprio* na superfície, o que iria ocasionar deleção clonal dos timócitos autorreativos. De fato, a evidência direta do efeito de Aire na seleção tímica foi observada em um modelo de camundongo que expressava tanto um TCR específico para HEL (antígeno de lisozima de ovo) quanto uma forma desse antígeno ligada à membrana das células tímicas, sob o controle do promotor de insulina. De acordo com os resultados obtidos, na ausência de Aire as células T HEL-específicas não são

deletadas no timo, sendo, portanto, detectadas na periferia. Ao contrário, camundongos que expressam Aire selecionam negativamente essas células devido à expressão ectópica do antígeno HEL, controlada pelo promotor da insulina no timo (Liston A *et al.*, 2003). Entretanto, como somente uma pequena fração (~1%) das mTEC expressa uma determinada proteína tecido-específica e o fato de que nem todos os TSA parecem estar sob controle do Aire, há dúvidas se este fenômeno seria suficiente para induzir, em condições fisiológicas, a deleção das células T (Derbinski J *et al.*, 2001).

Dados gerados a partir de camundongos duplo transgênicos que expressam HEL sob o promotor

o que poderia estar comprometido nos animais deficientes para Aire. No entanto essa hipótese não se mostrou verdadeira, uma vez que animais deficientes para Aire não apresentaram redução nem no número de células regulatórias (Anderson MS *et al.*, 2002), nem no nível de expressão de FoxP3 dessas células, assim como não apresentaram comprometimento da atividade supressora dessas células, tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Anderson MS *et al.*, 2005). Provavelmente, devido ao fato de muitos antígenos de expressão ectópica não estarem sob controle de Aire no timo, a geração de células T regulatórias policlonais acaba sendo possível. Entretanto, quando a análise da seleção positiva das Treg é feita através de um modelo com mTEC Aire⁺, o papel desse fator de transcrição torna-se claro (Aschenbrenner K *et al.*, 2007). Através de uma série de elegantes experimentos com quimeras irradiadas, os autores demonstraram que somente quando o antígeno era expresso nas mTEC havia geração de células T regulatórias. Isto não acontecia com DC tímicas. Entretanto, quando comparada às outras APC tímicas, as DC parecem ser potencialmente importantes na indução da tolerância central das células T CD4⁺ através do fenômeno de apresentação cruzada de antígenos derivados das mTEC, o que não significa que tanto as mTEC quanto as cTEC possam também contribuir para o processo de deleção clonal (Gallegos AM & Bevan MJ., 2004 ; Watanabe N *et al.*, 2005; Aschenbrenner K *et al.*, 2007). A evidência do papel das mTEC na geração das Tregs vai de encontro com dados da literatura que descrevem a região medular como o principal sítio de localização das células T FoxP3⁺ no timo (Fontenot JD *et al.*, 2005b).

Como dito anteriormente, o mecanismo de seleção negativa não é suficiente para controlar completamente a geração de clones autorreativos,

especialmente aqueles que reconhecem autoantígenos que não são expressos no microambiente tímico ou ainda aqueles que possuem TCR de baixa afinidade para autoantígenos, escapando da deleção (Bouneaud C *et al.*, 2000; Zehn D & Bevan MJ, 2006). A presença de células T autorreativas potencialmente patogênicas na periferia pode ser evidenciada através da imunização com autoantígenos específicos emulsificados em adjuvante completo de Freund (Billiau A & Matthys P, 2001; Katz JD *et al.*, 1993; Steinman L, 1996), por repetida estimulação com esses antígenos *in vitro* (Wekerle H *et al.*, 1996), ou ainda através do modelo de timectomia neonatal (Sakaguchi S *et al.*, 1982; Shevach EM, 2000). Sendo assim, a eliminação das células T autorreativas no timo é apenas uma parte da história.

Na periferia, essas células são controladas por uma série de mecanismos responsáveis por torná-las não-responsivas aos autoantígenos. Como exemplo, podemos citar a deleção periférica, que ocorre através da indução da apoptose, também conhecida como *AICD* (*activation - induced cell death*), em resposta ao estímulo continuado via TCR. Estudos sugerem um papel importante da sinalização via Fas-FasL nesse processo (Singer GG & Abbas AK, 1994). Alternativamente, o encontro da célula T com o autoantígeno na periferia pode levar a uma inativação funcional desta célula, também conhecido como anergia – fenômeno resultante da ligação do TCR na ausência de co-estímulo (B7-1 e B7-2) e da ligação do CTLA-4 (Cytotoxic T-lymphocyte-associated antigen 4) (Jenkins MK & Schwartz RH, 1987; Perez VL *et al.*, 1997). Além disso, a resposta da célula T pode ser ausente simplesmente pelo fato do antígeno não poder estar associado à moléculas de MHC (Barcinski M *et al.*, 1977), ou ainda estar seqüestrado em lugares não acessíveis ao sistema

linfático ou sanguíneo, não sendo capaz de entrar em contato com as células do sistema imune, levando ao fenômeno conhecido como tolerância por ignorância (Alferink J *et al.*, 1998; Zinkernagel RM, 1996). Um outro mecanismo de indução de tolerância na periferia é através da ação das células T regulatórias, que será detalhado mais adiante.

2. Células T regulatórias

2.1. Renascimento no modelo de timectomia neonatal

A existência de uma população de linfócitos com capacidade supressora, ou seja, capaz de inibir a ativação/resposta de outras células T, foi primeiramente descrita na década de 70 (Gershon RK & Kondo K, 1970). Acreditava-se que as células T supressoras exerciam suas funções biológicas através da síntese de fatores solúveis antígeno-específicos. Entretanto, devido ao insucesso na caracterização desses fatores e a ausência de marcadores específicos que pudesse diferenciá-las, os estudos sobre a supressão mediada por células T foram deixados de lado pelos pesquisadores.

No início da década de 80, a hipótese sobre existência das células T supressoras foi novamente posta em evidência. Os experimentos que reafirmaram a existência e deram suporte à importância das células T supressoras partiram de estudos envolvendo indução de autoimunidade órgão-específica através da timectomia neonatal.

O modelo de timectomia neonatal e o seu papel na indução de doença autoimune órgão-específica foi inicialmente demonstrado por Nishizuka &

Sakakura em 1969. Os autores observaram que a timectomia, quando feita no 3º dia de vida do camundongo, tornava a fêmea infértil devido ao desenvolvimento de ooforite. A atrofia do ovário não ocorria quando a timectomia era feita no dia 1 ou dia 7 de vida. Além disso, o desenvolvimento da doença era prevenido por um enxerto tímico no dia 7, não tendo efeito protetor se realizado posteriormente (dia 40) (Nishizuka Y & Sakakura T, 1969). Em 1976 os mesmos autores concluíram que a síndrome induzida pela timectomia no terceiro dia era autoimunidade órgão-específica (Kojima A *et al.*, 1976; Kojima A *et al.*, 1980). Desde então, vários trabalhos foram gerados associando a timectomia neonatal ao desenvolvimento de uma ampla variedade de doenças autoimunes órgão-específicas em camundongos, havendo diferenças na susceptibilidade à doença entre as diferentes linhagens (Kojima A & Prehn RT, 1981; Gleeson Paul *et al.*, 1996).

De acordo com os autores, os camundongos timectomizados entre o 2º e 4º dias de vida desenvolviam doença autoimune órgão-específica espontaneamente na fase adulta, incluindo gastrite, tireoidite e ooforite (Sakaguchi S, 2001) devido à depleção de uma subpopulação de células T com capacidade supressora, uma vez que a transferência de células T CD4+ esplênicas ou tímócitos de camundongos adultos normais prevenia a indução da doença autoimune (Sakaguchi S *et al.*, 1982). Mais tarde, tanto as células T efetoras quanto as regulatórias foram melhor caracterizadas, mostrando ser ambas CD4⁺ CD8⁻ (Smith H *et al.*, 1991).

2.2. Caracterização das células Treg

Um importante passo no estudo das células T regulatórias foi a identificação de marcadores que possibilitaram diferenciar essa subpopulação das demais células T CD4⁺. Sakaguchi e cols foram os primeiros a sugerir que as células T regulatórias poderiam ser separadas das células efetoras, com base na expressão relativa do antígeno Lyt-1 (CD5) (Sakaguchi S *et al.*, 1982). Alguns anos mais tarde, Powrie e Mason contribuíram para a caracterização das Tregs, demonstrando que células T CD4⁺CD45RB^{high} induziam *IBD* (*Inflammatory Bowel Disease*) quando inoculadas em animais imunodeficientes, enquanto os animais que recebiam células T CD4⁺CD45RB^{low} ou uma mistura das duas subpopulações, não desenvolviam lesões intestinais (Powrie F & Mason DW, 1990). Logo, os primeiros marcadores de superfície haviam sido identificados – as células Treg demonstravam-se ser CD5^{high} CD45^{low}. Entretanto, mesmo estando presente na superfície das Treg, esses marcadores não eram específicos, estando também presente na superfície de células T CD4⁺ ativadas não-regulatórias (Sakaguchi S *et al.*, 2004).

Um grande avanço na sua caracterização veio na década de 90, com a demonstração de Sakaguchi e cols de que as células supressoras estavam exclusivamente presentes em uma pequena população de células T CD4⁺ (cerca de 5 a 10% das CD4⁺) que expressava constitutivamente o marcador de superfície CD25 (ou cadeia α do receptor de IL-2). Essas células mostraram-se anérgicas - uma vez que não proliferam frente a estimulação via TCR *in vitro* e não produzem IL-2 - e capazes de suprimir a proliferação de células T CD25⁻

in vitro e *in vivo* (Sakaguchi S *et al.*, 1995).

Além do CD25, outros marcadores têm sido utilizados para identificar as células Treg , entre eles CTLA-4, CD62L, CD69, GITR (TNFRSF18) e o já citado baixo nível de CD45RB (Shevach EM, 2002; Sakaguchi S *et al.*, 1995). Entretanto, essas moléculas de superfície celular, inclui

para FoxP3 quanto controle selvagem. Somente as células oriundas do camundongo controle, cujas células expressam normalmente FoxP3, foram capazes de gerar células regulatórias. Além disso, a expressão forçada de FoxP3 em células T virgens resultou na aquisição de um fenótipo característico das Tregs ($CD25^{high}$, $CTLA-4^{high}$ e $GITR^{low}$), sendo inclusive capazes de prevenir o desenvolvimento de síndromes autoimunes quando co-transferidas com células T efectoras ($CD4^+CD25^-$) para animais linfopênicos (Hori S *et al.*, 2003; Fontenot JD *et al.*, 2003). Esses resultados implicam que a implementação de um programa funcional FoxP3-dependente nas células T regulatórias segue uma via de diferenciação distinta daquelas que direcionam para fenótipos Th1, Th2 ou células de memória.

Um novo avanço no entendimento da biologia das Tregs veio com a construção de um camundongo transgênico que expressa GFP como gene repórter para FoxP3 ($FoxP3^{GFP}$), o que possibilitou a análise da expressão de FoxP3 em nível de célula única (*single cell*) (Fontenot JD *et al.*, 2005a). De acordo com o trabalho, 96% das células que expressam FoxP3 são $CD4^+$ e 60-88% expressam altos níveis de CD25, dependendo da localização anatômica no timo. Além da detecção das células T $CD25^{high}FoxP3^+CD4^+$, uma outra população de Treg, até então desconhecida, foi identificada- $FoxP3^+CD4^+CD25^-$ ou $FoxP3^+CD4^+CD25^{low}$. Essas células possuem capacidade supressora similar às células $CD25^{high}FoxP3^+CD4^+$. Com isso, FoxP3 aparece como o marcador mais característico das Tregs, delegando ao CD25 um papel secundário.

O padrão de expressão do FoxP3 entre os timócitos é muito similar ao padrão visto nos órgãos linfóides periféricos. Nos camundongos $FoxP3^{GFP}$,

85% dos timócitos FoxP3⁺ são CD4⁺ SP (*single positive*), 4% são CD8⁺ SP e aproximadamente 11% são duplo-positivos (DP). Além disso, as células FoxP3⁺ parecem estar localizadas principalmente na medula tímica. Os estudos relacionados à fase de maturação (SP ou DP) e aos estímulos necessários para indução do FoxP3 no timo e, conseqüentemente, da

expressar o FoxP3 mutado) mostraram-se ainda incapazes de suprimir uma resposta de célula T, tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Esses dados indicam que muitos timócitos, na ausência de FoxP3 e na presença de um estímulo chave, ainda desconhecido, são capazes de se diferenciar para um fenótipo muito similar aos da Treg, sendo exportados par

promotoras consenso, quanto indiretamente, pela modulação da expressão de outros reguladores (fatores de transcrição). Ao contrário do que se imaginava, FoxP3 mostrou ser capaz de aumentar ou diminuir a expressão de uma série de genes específicos, não agindo somente como um repressor transcricional (Zheng Y & Rudensky A, 2007a).

2.3. Ontogenia das células T regulatórias

As células T regulatórias podem ser divididas em dois grupos distintos baseados na sua origem e nos mecanismos de supressão. As células Treg que se desenvolvem e adquirem seu fenótipo supressor no timo, migrando posteriormente para periferia, são chamadas de Treg “naturais”. A maioria das células Treg “naturais” expressa constitutivamente CD25 e seu desenvolvimento e função está associada ao fator de transcrição FoxP3. Toda discussão desse trabalho vai considerar somente esse grupo de Treg, ou seja, células T regulatórias geradas no timo. O outro grupo é conhecido como Treg “induzida”. Essas células, ao contrário das Treg “naturais”, são induzidas na periferia, na presença do antígeno e de determinadas citocinas no meio. Dentro desse grupo estão as células T regulatórias produtoras de IL-10 (Tr1) e as produtoras de TGF β (Tr3) (Sakaguchi S, 2004).

Alguns estudos relatam a possível conversão na periferia das células T CD4⁺ naïve ou ativadas para um fenótipo regulatório FoxP3⁺. Esse fenômeno aconteceria através da estimulação das células T convencionais com baixas doses de antígeno, na ausência de uma APC profissional (Apostolou I & Von Boehmer H., 2004), ou através da estimulação do TCR na presença de TGF- β

(Chen W *et al.*, 2003). Se o processo de conversão na periferia contribui fisiologicamente de fato para população de Tregs FoxP3⁺, ainda não está claro. A análise da diversidade do TCR mostra que as Treg tímicas possuem um repertório de TCR diverso e muito mais similar ao repertório encontrado nas Tregs presentes na periferia do que aquele encontrado nas células T não-regulatórias. Esses dados indicam o timo como o principal gerador de Tregs, tendo a conversão periférica, se existente, apenas um papel secundário (Hsieh CS *et al.*, 2006; Pacholczyk R *et al.*, 2006).

A seleção tímica das Tregs parece fugir ao padrão convencional. Ao contrário das células T CD4⁺ efectoras, a diferenciação das Tregs é induzida pelo reconhecimento de complexos pMHC agonistas no timo, situação essa que normalmente provocaria a deleção das células T (Jordan MS *et al.*, 2001). Estudos envolvendo camundongos duplo-transgênicos que apresentam tanto TCR transgênico quanto o seu respectivo antígeno no timo, propuseram que a presença do peptídeo agonista de alta afinidade seria capaz de dirigir a diferenciação das células T CD4⁺ para o fenótipo regulatório CD25⁺, já que havia um aumento significativo no percentual dessas células. Se peptídeo de alta afinidade fosse substituído por peptídeos de baixa afinidade, as células Tregs não eram geradas, demonstrando a importância da presença do antígeno de alta afinidade na sua seleção positiva (Jordan MS *et al.*, 2001; Apostolou I *et al.*, 2002).

Com base nos dados descritos, ainda não está claro se a célula T no timo já está comprometida com o fenótipo regulatório numa fase inicial da maturação, sendo selecionada positivamente na presença do antígeno cognato (sobrevivência seletiva) e não deletada como no caso das efectoras, ou se o

fenótipo regulatório é apenas induzido quando a célula T encontra o antígeno de alta avididade/afinidade (indução instrutiva). O antígeno cognato, por sua vez, parece ser essencial na indução do gene FoxP3 nas células Tregs, bem como na aquisição do seu fenótipo regulatório, já que camundongos transgênicos/RAG^{-/-} que não expressam o antígeno cognato, não possuem células T FoxP3⁺ (Apostolou I *et al.*, 2002; Fontenot JD *et al.*, 2005a).

Recentemente, Mathis e cols mostraram que a presença do antígeno agonista no timo, ao contrário do que foi descrito anteriormente, não é capaz de direcionar a diferenciação dos timócitos em desenvolvimento para a via de Treg. Utilizando como modelo camundongos TCR-transgênicos em que a expressão transgênica do antígeno agonista no timo é controlada por um repressor induzido por tetraciclina, os autores puderam analisar a diferenciação das Tregs em resposta a quantidades crescentes do antígeno. Enquanto a maioria das células T foi deletada quando exposta a concentrações crescentes do antígeno, a população de células T regulatórias, em número absoluto, permanece inalterada, aumentando somente em número relativo, o que dá uma falsa impressão de diferenciação induzida (Van Santen HM *et al.*, 2004). Assim, apesar da presença do antígeno ser determinante para geração das células T regulatórias, a sua concentração parece não influenciar na quantidade de células T regulatórias que é gerada.

O fato da célula T regulatória ser gerada no timo somente na presença do peptídeo cognato sugere que, assim como as células T com potencial autoimune, as células Treg possuem TCR com habilidade para o reconhecimento do autoantígeno, sendo, portanto, autorreativas. De fato, células T não regulatórias quando transduzidas com TCR derivados de células

Treg rapidamente expandem suas populações *in vivo* e induzem doença autoimune em camundongos linfopênicos (Hsieh CS *et al.*, 2004).

2.4. Mecanismos efetores da supressão pela célula T regulatória

Os mecanismos propostos para a função inibitória das células Treg se baseiam em experimentos feitos *in vitro* e *in vivo*. Análises *in vitro* demonstraram que a supressão da proliferação e produção de citocinas só ocorre quando as duas populações (supressora e respondedora) são co-cultivadas na presença de um estímulo via TCR, sendo abolida pela adição de IL-2 exógena e anti-CD28 na cultura (Takahashi T *et al.*, 1998; Thornton AM & Shevach EM, 2000). Além disso, a supressão mostrou-se dependente de contato celular, uma vez que não ocorria quando as células Treg e as células respondedoras são separadas por uma membrana semi-permeável (Takahashi T *et al.*, 1998; Thornton AM & Shevach EM, 1998). Além disso, também são independentes da secreção IL-10 e TGF- β , já que células supressoras oriundas de camundongos deficientes para essas duas citocinas são capazes de *in vitro* suprimir eficientemente (Shevach EM, 2002). Moléculas de superfície como CTLA-4 e GITR, que são superexpressas nas Tregs, parecem ter um papel importante na supressão dependente de contato, porém o mecanismo pelo qual elas atuam, se é diretamente na APC, na célula T respondedora ou em ambos, ainda precisa ser melhor elucidado (Shevach EM, 2002). Ao contrário dos resultados obtidos *in vitro*, uma série de experimentos reporta a importância das citocinas IL-10 e TGF- β nos modelos de supressão *in vivo* (Shevach EM, 2002; Von Boehmer H, 2005). Apesar dos inúmeros trabalhos

relacionados aos mecanismos de supressão, ainda não foi possível definir qualquer um deles como sendo o principal.

O comportamento das células Treg *in vivo* também parece ser bem diferente dos dados obtidos a partir dos experimentos *in vitro*, onde elas se mostraram anérgicas (sem capacidade proliferativa) frente ao estímulo via TCR (Sakaguchi S, 1995). As células Treg possuem uma alta capacidade proliferativa *in vivo*, frente ao antígeno específico, se acumulando nos linfonodos drenantes. Uma vez ativadas pelo seu ligante agonista, as células T regulatórias são capazes de suprimir efetivamente uma resposta imune policlonal (Fisson S *et al.*, 2003; Klein L *et al.*, 2003; Von Boehmer H., 2005). Em modelos utilizando camundongos linfopênicos, as células Treg também mostraram ser capazes de proliferar intensamente, provavelmente em resposta aos autoantígenos, o que vai de encontro com o fato dessas células possuírem naturalmente um TCR autorreativo (Jordan MS. *et al.*, 2001; Fisson S *et al.*, 2003, Hsieh CS *et al.*, 2004).

3. Autoimunidade pós-timectomia neonatal

3.1. Influência das Células T regulatórias

Como dito anteriormente, a identificação do marcador CD25 por Sakaguchi facilitou muito o estudo das Tregs. Em 1996, o mesmo autor demonstrou que a população de células $CD4^+CD25^+$ era afetada em camundongos timectomizados no período neonatal (Asano, M *et al.*, 1996). De acordo com o trabalho, as células regulatórias $CD4^+CD25^+$ só seriam exportadas do timo para

periferia a partir do terceiro dia de vida do camundongo. Sendo assim, a timectomia feita no 3° dia teria como consequência a depleção das células regulatórias na periferia do camundongo neonato, favorecendo assim a expansão de clones autorreativos, que escaparam da seleção negativa no timo. Desde então, assumiu-se o dogma de que a timectomia neonatal induz autoimunidade devido à depleção de uma subpopulação de células T com função regulatória.

Entretanto, Bandeira e cols recentemente mostraram que camundongos BALB/c de 3 dias já apresentam um número significativo de células CD4⁺CD25⁺ tanto no timo quanto na periferia e que essas células expressam FoxP3, um marcador específico das Tregs (Dujardin HC *et al.*, 2004). Através da técnica de PCR em tempo real, os autores também demonstraram que os camundongos adultos timectomizados (3dTx) possuem células T CD4⁺CD25⁺ esplênicas que expressam altas quantidades de FoxP3 (Dujardin HC *et al.*, 2004).

Apesar desses dados mostrarem a presença das Tregs nos animais timectomizados, a perda do compartimento regulatório ainda é visto como o principal fator responsável pelo desenvolvimento de autoimunidade pós-timectomia neonatal. Alguns outros fatores, como a exportação precoce de clones imaturos potencialmente autorreativos, durante o período neonatal, também pode estar associado ao desencadeamento de autoimunidade (Bonomo A *et al.*, 1994; Bonomo A *et al.*, 1995).

3.2. Análise genética: susceptibilidade x resistência

Um importante fato relacionado ao modelo de timectomia é que nem todas as linhagens de camundongos são susceptíveis à indução de doença autoimune pós-timectomia. Além disso, dentro das linhagens susceptíveis, a frequência de uma doença autoimune órgão-específica em particular, depende do *background* genético do camundongo, visto que, mesmo havendo uma ampla variedade de manifestações patológicas, cada linhagem apresenta um padrão de órgão alvo que será acometido (Kojima A & Prehn RT, 1981). Por exemplo, os camundongos BALB/c, A/J são susceptíveis, podendo apresentar gastrite e ooforite autoimune, com variações na incidência, já os C3H/He apresentam gastrite e tireoidite e a linhagem 129 apresenta prostatite. Outras linhagens como C57BL/6, DBA/2 e B10.A, são resistentes, não desenvolvendo nenhuma doença autoimune pós-timectomia neonatal (Tabela1).

Uma análise detalhada da incidência de ooforite, orquite, tireoidite, gastrite e adenite glandular coagulante em 21 linhagens de camundongos neonatais timectomizados, foi feita em 1981 por Kojima e Prehn. Nesse estudo, os autores buscaram demonstrar uma possível associação das doenças com certos haplótipos de MHC, usando linhagens H-2 congênicas, linhagens resistentes e linhagens recombinantes *inbred*. De acordo com a análise genética feita pelos autores, a susceptibilidade à doença não está relacionada ao haplótipo de MHC, exceto para o caso de adenite glandular coagulante. Como exemplo, podemos citar as linhagens BALB/c – altamente susceptível à gastrite autoimune, e DBA/2 - resistente à gastrite autoimune. Ambas linhagens apresentam o haplótipo H-2^d, entretanto, diferem na susceptibilidade à doença.

A busca por possíveis genes de susceptibilidade à gastrite autoimune nos camundongos da linhagem susceptível BALB/cCrSlc resultou na identificação de 2 regiões genéticas distintas localizadas na porção distal do cromossomo 4, denominadas *Gasa1* e *Gasa 2* (Silveira PA *et al.*, 1999). O mapeamento genético dessas regiões foi feito através da análise comparativa na progênie (F2) resultante do cruzamento entre BALB/cCrSlc (susceptível) e C57BL/6 (resistente). Posteriormente, uma análise mais detalhada possibilitou a identificação de mais dois genes: *Gasa 3* e *Gasa 4*, que possivelmente estariam relacionados à susceptibilidade (Silveira PA *et al.*, 2001). Entretanto, a comparação entre a linhagem susceptível BALB/c e outra linhagem resistente (DBA/2) não resultou na identificação desses mesmos genes, sugerindo que outros fatores estariam relacionados ao padrão de susceptibilidade observado (Mori, Y *et al.*, 1991).

Assim, apesar de se acreditar na influência de fatores genéticos, os motivos exatos pelos quais algumas linhagens são susceptíveis e outras são resistentes, ainda não foram esclarecidos, bem como os motivos que influenciam o padrão de órgãos afetados pela autoimunidade (Kojima A & Prehn RT, 1981).

De forma similar à patologia observada no modelo de timectomia neonatal, camundongos *Aire*^{-/-} de linhagens diferentes, assim como pacientes com APS1 (Síndrome de Poliendocrinopatia Autoimune tipo I) devido à mutações em *aire*, apresentam uma ampla variedade no tipo de manifestação autoimune desenvolvida, com diferentes níveis de incidência (Ramsey C *et al.*, 2002; Anderson MS *et al.*, 2002; Liston a *et al.*, 2003). Cada paciente em geral apresenta uma diferente constelação de órgãos afetados e anticorpos de

diferentes especificidades (Perheentupa J., 1996; Betterle C *et al.*, 1998). Um estudo feito através do cruzamento de camundongos Aire -/- com diferentes *backgrounds* genéticos, tentou buscar uma explicação sobre a diversidade observada no padrão e na severidade do órgão afetado (Jiang W *et al.*, 2005). Novamente não foi encontrada nenhuma associação direta com o haplótipo de MHC na maioria das doenças analisadas (exceto diabetes e pancreatite), principalmente no caso da gastrite autoimune. De acordo com os autores, o *background* genético parece condicionar as manifestações vistas nos animais com mutação em *aire*, sugerindo que o polimorfismo genético, tanto em humanos quanto em camundongos, provavelmente define o padrão de doença e o grau de severidade observado (Jiang W *et al.*, 2005).

Linhagens	H-2	Freqüência da doença
BALB/c	d	gastrite (60-80%)
C3H/He	k	gastrite (50-70%)
AJ	a	ooforite (70-90%) gastrite (20-45%)
DBA/2	d	resistente
B10.A	a	resistente
C57Bl6	b	resistente

Tabela 1- Freqüência de doença autoimune pós-3dTx nas diferentes linhagens de camundongos que serão analisadas nesse estudo (Kojima A & Prehn RT., 1981).

4. Gastrite Autoimune como modelo de estudo

4.1. Características gerais

A timectomia neonatal (3dTx) nos camundongos susceptíveis, como BALB/c, assim como resulta em uma doença autoimune gástrica similar a que ocorre nos humanos, sendo caracterizada por um infiltrado inflamatório crônico,

com linfócitos T CD4⁺ e macrófagos na submucosa gástrica, acompanhado pela perda das células parietais zimogênicas e presença de autoanticorpos anti-células parietais na circulação (Toh Ban-Hock *et al.*, 2000). Estudos de depleção *in vivo* demonstraram que o desenvolvimento da lesão gástrica é mediada por células T CD4⁺ e não por células T CD8⁺ (De Silva HD *et al.*, 1998).

A análise da especificidade das células T CD4⁺ efectoras presentes nos animais 3dTx, demonstrou que o autoantígeno alvo reconhecido por essas células é a H⁺/K⁺ATPase presente nas células parietais da mucosa gástrica, responsável pela acidificação do estômago. A H⁺/K⁺ATPase é uma proteína heterodimérica formada por uma subunidade catalítica α (92 kDa), altamente conservada, e por uma subunidade β (60-90 kDa) altamente glicosilada (Toh Ban-Hock *et al.*, 2000; van Driel IR., 2002; Suri-Payer E *et al.*, 1996). Em concordância, os autoanticorpos presentes no soro dos pacientes e animais 3dTx mostraram-se ser específicos para as cadeias α e β da H⁺/K⁺ ATPase gástrica (Jones CM *et al.*, 1991).

A cadeia β da H⁺/K⁺ ATPase parece ter um papel dominante na ativação das células T CD4⁺ autorreativas, já que a expressão transgênica somente da cadeia β sob controle do promotor de MHC classe II torna o camundongo tolerante, prevenindo a produção de anticorpos para as subunidades α e β da H⁺/K⁺ATPase e o desenvolvendo de gastrite autoimune pós-3dTx (Alderuccio F *et al.*, 1993). Em contraste, a expressão transgênica da subunidade α no timo, também sob o controle do promotor de MHC classe II, não foi capaz de prevenir o desenvolvimento da doença (Alderuccio F *et al.*, 1997).

Através do estabelecimento de linhagens de células T a partir do linfonodos gástricos dos animais 3dTx, foi possível analisar a especificidade de dois diferentes clones envolvidos na patogênese da gastrite, denominados TXA23 e TXA51. Ambos reagiram a peptídeos distintos derivados da cadeia α . (Suri-Payer E *et al.*, 1999). De forma diferente, o hibridoma de célula T que reage a cadeia β foi gerado a partir de camundongos adultos normais imunizados com o epítipo dominante da cadeia β , sendo denominado de 1E4 (De Silva HD *et al.*, 2001). A análise do TCR dessas células T sugere que os clones específicos para cadeia α possuem alta afinidade pelo antígeno, ao contrário, o clone que responde a cadeia β parece ser de baixa afinidade. Sendo assim, os clones de alta afinidade como TXA23, seriam ativamente tolerizados na periferia de um camundongo normal, enquanto que os clones de baixa afinidade, por necessitarem de maior quantidade de antígeno para serem tolerizados na periferia, seriam capazes de escapar desse processo, permanecendo no animal, sendo ativados no caso de desencadeamento da doença (van Driel IR, *et al.*, 2005).

4.2. Expressão tímica promíscua de autoantígenos gástricos e indução de tolerância

Vários estudos sugerem que a expressão de genes periféricos no timo contribui para a manutenção da tolerância periférica. Podemos citar como exemplo a correlação entre o nível de expressão da insulina no timo e a resistência à diabetes, assim como a expressão tímica da proteína

proteolípídica da mielina (PLP) em camundongos resistentes à encefalomielite autoimune (C57Bl/6) e de antígenos uveitogênicos em camundongos resistentes à uveoretinite autoimune experimental (EAU) (Pugliese A *et al.*, 1997; Egwuagu CE *et al.*, 1997; Klein L *et al.*, 2000; De Voss J *et al.*, 2006). Dessa forma, um nível elevado de expressão do autoantígeno no timo favoreceria a deleção dos clones autorreativos, resultando na ausência ou na menor frequência desses clones na periferia, o que tornaria o camundongo resistente à indução de autoimunidade órgão-específica.

A expressão do mRNA da subunidade α já foi detectada em vários tecidos, incluindo estômago, timo, baço, cérebro, rim e fígado, entretanto, a expressão da subunidade β em outros tecidos que não o estômago, ainda é muito controversa (Alderuccio F *et al.*, 1997). Vários trabalhos descrevem a cadeia β como não sendo expressa no timo de camundongos, ou pelo menos não detectável por RT-PCR, o que não exclui a possibilidade de um pequeno número de células tímicas expressarem o autoantígeno gástrico (Derbinski J *et al.*, 2001; Alderuccio F *et al.*, 1993; Alderuccio F *et al.*, 1997). A presença cadeia β no timo parece ser fundamental para manutenção da tolerância, uma vez que camundongos deficientes para cadeia β da H^+/K^+ ATPase desenvolvem gastrite autoimune. O mesmo ocorre quando células T $CD4^+$ dos camundongos deficientes para cadeia β da H^+/K^+ ATPase, e não dos camundongos selvagens, são transferidas para BALB/c atímicos *nude*, sugerindo a presença de clones patogênicos na ausência H^+/K^+ ATPase β endógena (Laurie KL *et al.*, 2002). Ao contrário da subunidade β , a expressão do gene da subunidade α é facilmente detectável no timo (Alderuccio F *et al.*, 1997). Mesmo estando presente em maior quantidade, a capacidade de

deleção de clones patogênicos específicos para cadeia α está intimamente ligada ao nível de expressão da cadeia β , já que somente a superexpressão da cadeia α no timo não foi suficiente para deletar as células gastritogênicas α -específicas, sendo necessário para isso, a superexpressão da cadeia β concomitantemente (Allen S *et al.*, 2005). Esses dados sugerem um papel importante do nível da expressão de da cadeia β no timo na deleção, tanto dos clones α quanto β -específicos.

Um trabalho publicado em 2003 por Canto e cols foi capaz de detectar a cadeia β não só no timo, mas também em outros tecidos como baço e rim, em níveis mais baixos (Cantó E *et al.*, 2003). Os mesmos autores, através da técnica de RT-PCR seguida de imunoblot, mostraram haver uma diferença no nível de expressão da cadeia β da H^+/K^+ ATPase no timo de camundongos neonatos BALB/c e DBA/2, sendo estes susceptíveis e resistentes à AIG, respectivamente. Entretanto, como a técnica de RT-PCR não possui caráter quantitativo, faz-se necessário um estudo mais detalhado e quantitativo para que estes dados mostrem-se confiáveis. Assim, ainda falta estabelecer se a expressão promíscua de autoantígenos gástricos no timo é biologicamente relevante, sendo responsável ou não pelas diferenças na susceptibilidade à gastrite autoimune observada entre as linhagens murinas.

II. OBJETIVOS:

1. Objetivo Geral:

Estudar os mecanismos responsáveis pela determinação da susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia neonatal.

2. Objetivos específicos:

- a) Avaliar a incidência de gastrite autoimune pós-timectomia nos camundongos das linhagens susceptíveis e resistentes.
- b) Caracterizar fenotipicamente e funcionalmente as células Treg presente nos órgãos linfóides periféricos dos animais adultos timectomizados.
- c) Determinar se a frequência de Treg e de células T efectoras ativadas nos órgãos linfóides periféricos dos animais adultos 3dTx prediz a ocorrência de gastrite autoimune.
- d) Avaliar se o padrão de susceptibilidade das diferentes linhagens à gastrite autoimune, está correlacionada à frequência de células T regulatórias exportadas do timo para periferia até o terceiro dia de vida.
- e) Verificar se há diferenças na frequência de células T efectoras capazes de causar gastrite entre camundongos susceptíveis e resistentes.
- f) Determinar se há expressão ectópica de $H^+/K^+ATPase$ no timo e se esta expressão está relacionada à susceptibilidade e/ou resistência à gastrite autoimune pós-timectomia neonatal.

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens BALB/c (H-2^d), DBA/2 (H-2^d), A/J (H-2^a), B10.A (H-2^a), C3H/He (H-2^k) e C57Bl6 (H-2^b), machos ou fêmeas, com idade variando de 3 dias a 120 dias de vida. Foram também utilizados camundongos CB17 (SCID, H-2^d) fêmeas, com 60 dias de idade. Em todos os casos os animais foram retirados do biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. Todos os animais utilizados foram mantidos sob as mesmas condições e utilizados segundo as normas institucionais de boas práticas para manipulação de animais de experimentação. As linhagens resistentes à gastrite são: DBA/2, B10.A e C57/Bl6. As susceptíveis são: A/J, B10.A e BALB/c.

2. Meios de Cultura

Para cultura de células foi utilizado em todos os experimentos DMEM (*Dulbecco-modified Eagle Medium*) (Sigma, Saint Louis, USA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) (Gibco, California, USA), bicarbonato de sódio (3,7g/L), piruvato de sódio (1mM), vitaminas (0,1mM), aminoácidos não essenciais (0,1mM), aminoácidos essenciais (0,1mM), penicilina (100.00u), estreptomicina (100mg/l), L-glutamina (2mM), HEPES (10mM), β-mercaptoetanol (55μM). Todos os suplementos utilizados foram adquiridos da Gibco (California, USA). As células foram cultivadas a 37°C, em atmosfera com 5% de CO₂.

3. Timectomia neonatal (3dTx)

Todas as timectomias foram realizadas entre os dias 3-4 de vida (3dTx), considerando o dia do nascimento como dia zero, segundo protocolo previamente descrito (Dipaolo RJ *et al.*, 2005). Os camundongos neonatos foram anestesiados por resfriamento. A seguir, sob lupa, os animais foram imobilizados, foi feita uma incisão médio-esternal de 4-5mm na pele e subcutâneo, utilizando microbisturi, tendo como referência anatômica superiormente a glândula submandibular e inferiormente o 4º arco costal. A glândula submandibular foi rebatida cervicalmente, foi identificada a fúrcula esternal e caixa torácica foi aberta através de incisão paraesternal esquerda, englobando os três primeiros arcos costais. As paredes foram afastadas com microfórceps até a completa visualização dos dois lobos tímicos. O timo foi liberado das aderências e sugado com micropipeta acoplada a um sistema de vácuo. Após a sucção foi feita a exploração da cavidade, verificando se não foram deixados fragmentos do órgão. A seguir, a glândula submandibular foi reposicionada, as extremidades da ferida foram aproximadas e procedeu-se síntese da ferida utilizando cola cirúrgica. Os animais foram mantidos sob fonte de calor até que o efeito da anestesia terminasse. Os animais despertados e ativos foram devolvidos às mães. No caso dos animais “Sham”, o mesmo procedimento cirúrgico foi feito, porém o timo não foi retirado. Os animais descritos como “controle” não foram manipulados. Os animais foram desmamados aos 21 dias e utilizados nos experimentos entre 60-120 dias de vida. Em todos os experimentos foi feita a confirmação da timectomia total no animal adulto, após sacrifício, através de exploração da cavidade torácica.

Eventuais animais que apresentassem timectomia incompleta foram excluídos dos experimentos.

Em alguns experimentos o timo coletado no momento da timectomia, foi recuperado da micropipeta. As células foram lavadas, dissociadas em PBS e centrifugadas por 5 minutos a 500g. O pellet obtido foi ressuspenso em 500-1000µl Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) e armazenado a -80°C para posterior extração de RNA total. Os animais cujos timos foram recuperados foram marcados na pata para garantir sua identificação na idade adulta.

4. Retirada de órgãos linfóides

4.1. Neonatos: os animais foram sacrificados por decapitação. De acordo com o experimento, foram retirados baço (individualmente) ou linfonodos (em *pools* de 3-5 animais, no caso de neonatos de 3 dias de idade), com auxílio de lupa binocular e material cirúrgico para microcirurgia. Os linfonodos retirados foram os axilares, braquiais, poplíteos, inguinais, mesentéricos, gástricos e paraórticos. As células foram dissociadas mecanicamente, lavadas em PBS e utilizadas nos diversos experimentos.

4.2. Adultos: os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, sendo a seguir retirados o baço, linfonodos mesentéricos e linfonodos gástricos. Na maior parte dos experimentos, foram analisados os órgãos linfóides de cada animal individualmente. A exceção se faz para os linfonodos gástricos das linhagens resistentes à gastrite (B10.A e DBA/2), que foram recolhidos em

pools de 3-5 animais, devido ao reduzido número de células recuperado. As células foram dissociadas mecanicamente, lavadas em PBS e utilizadas nos diversos experimentos.

5. Análise fenotípica das células T por citometria de fluxo

5.1. Marcação de moléculas de superfície: as suspensões celulares obtidas de baço, linfonodos mesentéricos ou gástricos, foram inicialmente lavadas e incubadas em 100µl de PBS + 2% soro normal de camundongo) para o bloqueio de receptores FcγRI/RIII e incubadas por 10 minutos no gelo. As amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 450g e os pellets ressuspensos em 10µl do anticorpo apropriado diluído em tampão de bloqueio e incubados por 15 minutos no gelo. Em seguida, estas amostras foram lavadas com 100µl de tampão de bloqueio e centrifugadas por 5 minutos a 450g. As células que estavam sendo marcadas com anticorpos biotinizados foram ressuspensas em 10µl da estreptavidina apropriada diluída em tampão de bloqueio por 15 minutos, lavadas com 100µl deste tampão e centrifugadas por 5 minutos a 500g. As células foram fixadas com 4% de paraformaldeído (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), realizando-se então a aquisição no citômetro de fluxo.

5.2. Marcações intracitoplasmáticas: após a marcação de superfície com os anticorpos apropriados, foi feita a marcação intracitoplasmática para FoxP3 e CTLA-4, quando necessário, seguindo o protocolo do próprio kit para FoxP3 (eBioscience). As células previamente coradas na superfície, conforme o item 5.1, foram lavadas, fixadas com tampão Fix/Perm (eBioscience) e

incubadas a 4°C por 2-18 horas. A seguir, as células foram novamente lavadas e ressuspensas em tampão de permeabilização (eBioscience), sendo novamente lavadas e agora adicionadas de 5µl de rat-anti-mouse FoxP3 APC, diluído em tampão de permeabilização. As células foram incubadas por 30 minutos, lavadas com tampão de permeabilização e ressuspensas em PBS. Eventualmente, foi adicionado o anticorpo rat-anti-mouse CTLA-4 (UC10-4B9, eBioscience) na mesma etapa em que foi feita a incubação com anti-FoxP3. As células regulatórias (Treg) foram definidas como CD4⁺FoxP3⁺. As células efetoras ativadas foram definidas como CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻. A não ser quando indicado na legenda da figura, todos os percentuais são relativos à frequência da subpopulação estudada na população CD4⁺ total.

5.3 Anticorpos e análise por citometria de fluxo: os seguintes anticorpos foram utilizados: CD4 FITC (RM4.5, eBioscience), CD25 PE (7D4, eBioscience), FoxP3 APC (kit eBioscience), GITR biotinilado (DTA-1, eBioscience), CD69 PE (3H1.2F3, eBioscience), CTLA-4 (UC10-4B9, eBioscience). O anticorpo biotinilado (GITR) foi revelado com estreptavidina conjugada à ficoeritrina (Pharmigen, California, USA). As suspensões celulares foram analisadas pelo FACSCalibur®. As análises foram feitas em software Cell Quest Pro®, para Macintosh.

6. Ensaio de Supressão

6.1. Células supressoras: células CD4⁺CD25⁺ foram purificadas por separação em coluna magnética, a partir de linfonodos mesentéricos e baço de camundongos BALB/c 3dTx ou Sham com 90 dias de idade. Para tal, foi utilizado kit de purificação de células T CD4⁺CD25⁺ (Miltenyi), de acordo com o protocolo padrão fornecido pelo fabricante. As suspensões obtidas continham pureza de >93% em células CD4⁺CD25⁺.

6.2. Células respondedoras: Foram usadas como respondedoras células CD4⁺ purificadas a partir de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c de 90 dias de idade, através de seleção negativa em coluna magnética. Para tanto, as células dissociadas foram incubadas com anti-CD8 beads (53-6.7), anti-CD45R/B220-beads (RAB-632) e anti-CD25-beads (3C7), por 30 minutos. A seguir as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS + EDTA 0,02% e submetidas à purificação em coluna magnética, de acordo com o protocolo padrão de seleção negativa fornecido pelo fabricante. Da fração negativa obtida, foi retirada uma alíquota para confirmação da pureza através de citometria de fluxo. Foram obtidas populações com pureza superior a 98% em células CD4⁺CD25⁻. As células respondedoras foram então marcadas com CFSE 1 μ M (*5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester*, Molecular Probes). Para tanto, 1x10⁷ células/ml foram ressuspendidas em PBS contendo 1 μ M de CFSE. As células foram protegidas da luz e procedeu-se incubação por 30 minutos, a 37°C, 5% CO₂. Logo após, as células foram lavadas cinco vezes em DMEM 10% SFB, para eliminação do CFSE residual.

6.3. Células estimuladoras: esplenócitos de camundongos BALB/c foram utilizadas como células apresentadoras no ensaio de supressão. Para tanto, os esplenócitos foram irradiados (2500 rads) e depletados de células T, através de citotoxicidade mediada por complemento de coelho (produzido no próprio laboratório a partir de soro normal de coelho previamente adsorvido em esplenócitos murinos). As células previamente dissociadas foram ressuspendidas em mix de sobrenadantes dos hibridomas 53-6.7 (anti-CD8) e GK1.5 (anti-CD4) (5×10^7 cell/ml), contendo 20% de complemento de coelho. Procedeu-se incubação a 37°C, 5% CO₂, por 30 minutos. A seguir, as células foram lavadas duas vezes em DMEM 10% SFB e um novo *round* de depleção foi realizado. Ao final do 2º *round*, foi feita a confirmação da depleção através de citometria de fluxo.

6.4. Teste da supressão: 5×10^5 células respondedoras foram estimuladas com 0,75µg/ml de antiCD3 (2C11, purificado no próprio laboratório) e 5×10^5 células estimuladoras, na ausência ou presença de células supressoras nas razões Supressora:Respondedora (S:R) de 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10, 1:0. As culturas foram em DMEM 10% de SFB, em placas de 24 poços (Corning, New York, USA). Após 72 horas de cultura, as células foram recolhidas e a proliferação foi medida através da diluição do CFSE na população respondedora. A aquisição dos eventos foi feita em citômetro de fluxo FACSCalibur® e as análises foram feitas em software Cell Quest Pro®, para Macintosh.

7. Transferência de células

7.1. Animais doadores e preparação das suspensões celulares para transferência: foram usados como doadores camundongos 3dTx, 60 dias após a timectomia, ou controles pareados por idade. Os animais foram sacrificados, foram retirados o estômago e os linfonodos mesentéricos de cada animal, individualmente. Os estômagos foram preparados para análise histopatológica como descrito no item 8. As células dos linfonodos foram dissociadas mecanicamente e lavadas em PBS. Parte das suspensões foi submetida à depleção de células regulatórias, através de lise mediada por complemento, utilizando anticorpos anti-CD25 (clone 3C7), de acordo com protocolo descrito no subitem 6.3. A confirmação da depleção foi feita por citometria de fluxo, através da marcação com anticorpos anti-CD25 (clone 7D4). Em todos os casos a depleção resultou em <1% de células CD25⁺. A outra parte das suspensões não foi manipulada. Em todos os grupos, as células de cada animal doador foram processadas separadamente, obtendo-se ao fim, suspensões depletadas ou não de células regulatórias, representando cada animal doador individualmente.

7.2. Animais receptores: como receptores foram utilizados camundongos CB17/SCID, imunodeficientes, manipulados em condições de esterilidade. Os grupos de receptores foram previamente identificados por marcações nas orelhas, de modo a ser possível identificar cada receptor após a transferência. A seguir, cada receptor recebeu por via endovenosa 10⁶ células totais de linfonodos – depletadas ou não de células T regulatórias –

provenientes dos animais descritos no subitem anterior. Cada receptor recebeu células de apenas um doador, configurando-se assim pares doador/receptor. Sessenta dias após a transferência, os animais receptores foram sacrificados e os estômagos, linfonodos mesentéricos e gástricos foram retirados para análise. Os estômagos foram preparados para análise histopatológica, segundo descrito no item 8. Os linfonodos foram submetidos à marcação para CD4, CD25 e FoxP3, segundo descrito no item 6. A reconstituição imunológica foi confirmada em todos os receptores.

7.3. Análise pareada dos resultados: ao término do experimento, foi feita a análise histopatológica às cegas dos estômagos de todos os doadores e receptores. Após a conclusão da leitura, os escores obtidos em cada receptor foram comparados aos obtidos nos seus respectivos doadores. Os resultados foram representados através de código de cores para cada par doador:receptor, correspondendo o normal à cor branca, gastrite leve à cor azul-clara e gastrite severa à cor azul-escura.

8. Análise Histopatológica dos Estômagos

Os estômagos foram retirados, abertos pela grande curvatura e lavados delicadamente em água corrente para eliminação do conteúdo gástrico residual. A seguir os órgãos foram fixados em formalina (PBS 10% de formaldeído) por 24 horas e enviados para preparação dos blocos parafinados, corte e coloração por hematoxilina e eosina. Foram analisados no mínimo 6-8 cortes por bloco. Os parâmetros utilizados na avaliação da gastrite foram

previamente descritos (Dipaolo, R.J *et al*, 2005). Cada corte recebeu um valor de escore, variando de 0 a 6, e ao fim da análise foi determinado um escore médio. Os escores representam:

Escore	Achado
0	Ausência de infiltrado e modificações na composição ou arquitetura do órgão
1	Linfócitos dispersos na mucosa e submucosa
1.5	1-2 aglomerados pequenos de linfócitos na mucosa/submucosa
2	3-4 aglomerados linfocitários pequenos na mucosa/submucosa
3	Pelo menos 3 áreas com infiltrado intermediário se estendendo por até um 1/3 da mucosa
4	Grandes nódulos linfocitários se estendendo no mínimo pela metade da extensão da mucosa
4.5	Grandes nódulos linfocitários + evidência de destruição de células parietais e principais (<25%)
5	Extenso infiltrado linfocitário cobrindo toda a extensão da mucosa + destruição intensa de células parietais/principais
6	Perda completa das células parietais e principais, arquitetura da mucosa destruída e muitas células mucosas

Consideram-se normais os escores médios até 2, gastrite leve os escores médios entre 2 e 4, e como gastrite severa os escores médios maiores que 4. Em todos os experimentos as análises histopatológicas foram cegas.

9. Extração de RNA

A isolamento do RNA total dos timos dos camundongos neonatos de 3 dias foi realizada pelo método de Trizol (Life Technologies, Grand Island, NY,

USA). Partindo de uma suspensão de aproximadamente 2×10^6 células tímicas, adicionou-se 1mL de Trizol. Esta solução foi homogeneizada e então incubada por 5 minutos a temperatura ambiente, para permitir completa dissociação de complexos de nucleoproteínas. Durante esta fase as amostras foram congeladas a -80°C até o momento da extração. Em seguida adicionou-se 0,2 mL de clorofórmio para cada mL de trizol, seguido de agitação vigorosa por aproximadamente 15 segundos. O material foi posteriormente incubado por 2 a 3 minutos à temperatura ambiente e centrifugado por 15 minutos a 1120 g a 4°C . Após esta centrifugação ocorre a separação da solução em três fases (aquosa, interface e orgânica). A fase aquosa foi transferida para um novo tubo contendo 0,5 mL de álcool isopropílico para cada mL de trizol, para a precipitação do RNA. Este tubo foi homogeneizado por inversão, seguido de incubação por 1 hora a -20°C e então centrifugado novamente a 1120 g por 15 minutos a 4°C . O sobrenadante foi removido e o “pellet” de RNA lavado com etanol 75% diluído em água DEPC (Dietilpirocarbonato, Sigma-Aldrich, Steinhein, Alemanha) seguido de centrifugação a 640 g por 5 minutos a 4°C . O RNA assim obtido foi deixado secar por 5 minutos para evaporação do etanol e então ressuspenso em 10-20 μL de água DEPC. Este material foi mantido a -80°C até o momento da transcrição.

10. Quantificação do RNA

Após extração, o RNA obtido foi quantificado através de leitura no nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm. O grau de pureza da amostra foi verificado através da

análise da relação entre 260 e 280nm. Sendo considerada uma boa extração aquela que apresentou valores entre 1,6 a 1,8.

11. Tratamento com DNase

O RNA, já quantificado, foi tratado com DNase para evitar uma possível contaminação do RNA com DNA genômico. Para esse protocolo foi utilizado 1µl de DNase (1U/µl) para 1µg de RNA, 1µl do tampão 10x da enzima e água DEPC q.s.p. 10 µL. Essa mistura foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos, seguida da adição de 1µl de EDTA 25mM. Essa solução foi colocada a 65°C por 10 minutos, para que pudesse ocorrer a inativação da enzima.

12. Transcrição reversa

A solução final obtida pós-tratamento com DNase (1µg de RNA total) foi utilizada diretamente para síntese de cDNA (transcrição de reversa). Para isso, foi adicionado 1µL de oligo(dT)₁₂₋₁₈ (Invitrogen) (0,2 µg/µL) e 1µL de dNTP 10mM (25mM de dATP, dCTP, dGTP e dTTP), seguido de aquecimento a 65°C em termociclador (GeneAmp® PCR System 9700 Applied Biosystems) por 5 minutos para remoção de estruturas secundárias, sendo colocado rapidamente no gelo ao término dessa etapa. Em seguida foi adicionado 4µL de tampão de transcrição 5x, 2µL de DTT 0,1M e por último, 1µL (200U) da enzima transcriptase reversa (SuperScriptII - invitrogen). Esta solução foi colocada novamente em termociclador a 42°C por 55 minutos e 70°C por 15 minutos, para inativação da enzima. Como controle negativo, foi realizada toda síntese

de cDNA na ausência da transcriptase reversa, dessa forma excluimos a possibilidade de amplificação por contaminação com DNA genômico. O cDNA obtido foi quantificado no nanodrop (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer) nos comprimentos de onda (λ) de 260 e 280 nm.

13. PCR para amplificação da enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)

A enzima GAPDH está presente ubiqüitariamente nas células, sendo utilizada como controle da reação de transcrição do RNA em cDNA. Para esta reação foram utilizados 1 μ do cDNA transcrito, tampão para PCR 10x (200 mM Tris-HCl e 500 mM KCl), 1,5 mM MgCl₂, 200 μ M dNTPs, 0,5 μ M de cada primer, cujas seqüências estão descritos na Tabela 1, 1U de Taq polimerase e água qsp 20 μ L. Esta reação foi processada em termociclador, sendo iniciada a 95°C por 1 minuto para desnaturaçãõ, seguido por 35 ciclos que compreendem: 95°C por 30 segundos, seguidos de anelamento a 61°C por 30 segundos e uma extensão a 72°C por 45 segundos, completados por uma extensão final de 10 minutos a 72°C. O produto desta reação foi carregado em gel de agarose 2% corado com Brometo de Etídeo (0,5 μ g/mL) e submetido a corrida eletroforética a 100 V durante 20 minutos. O tamanho esperado do produto de PCR é de 100 pb. As seqüências dos oligonucleotídeos utilizados estão listadas na tabela 2.

Gene	Oligonucleotídeos para RT-PCR e qRT-PCR	Seqüência 5' – 3'
GAPDH	GAPDH F	TGA AGG TCG GTG TGA ACG GAT TTG G
	GAPDH R	ACG ACA TAC TCA GCA CCA GCA TCA C
H ⁺ K ⁺ ATPase- cadeia beta	H+K+ATPase- cadeia beta F	AGA GCT TTG CAG CTC CAA ACC
	H+K+ATPase- cadeia beta R	CCT CCT CGA AGC CGA AGC TGG

Tabela 2- Seqüência dos oligonucleotídeos utilizados para detecção da expressão dos mRNAs do GAPDH e da cadeia beta da H⁺K⁺ATPase por RT-PCR convencional e por PCR em tempo real.

14. PCR em tempo real (*Real time PCR*) para quantificação da expressão da cadeia β da H⁺/K⁺ ATPase

14.1. Validação do método

O qRT-PCR é baseado na detecção dos produtos de PCR pelo corante SYBR Green, que se intercala em duplas fitas de DNA. Sabe-se que, na análise do PCR em tempo real, a fluorescência emitida por este corante aumenta exponencialmente durante a fase exponencial do processo de amplificação do DNA. A reação de PCR foi padronizada utilizando-se curvas de diluições e verificando a correlação dos dados das diluições com os valores obtidos nos ensaios de qRT-PCR. Foram feitas também as correlações das curvas de diluição de amplificações do gene constitutivo GAPDH e da H⁺K⁺ ATPase. As correlações foram sempre satisfatórias, com um valor de $r^2 > 0,87$ o que valida a análise das diferentes amostras e das diferentes concentrações de transcritos da H⁺K⁺ ATPase encontradas. Esta validação é fundamental, uma vez que os transcritos da H⁺K⁺ ATPase serão, provavelmente, muito pouco expressos nas amostras analisadas.

Para verificar se os produtos formados correspondem aos produtos

específicos desejados, realiza-se uma análise da curva de dissociação desses produtos ao final da ciclagem das amostras. Nesta análise, a temperatura é aumentada lentamente até cerca de 95°C com o monitoramento contínuo da fluorescência. A fluorescência é alta a baixas temperaturas quando todo o DNA está em dupla fita, mas diminui drasticamente quando se atinge a temperatura em que ocorre de dissociação do produto de DNA específico. Produtos de PCR de diferentes tamanhos e seqüências dissociam a diferentes temperaturas e são observados como picos distintos quando organizados em gráficos de temperatura versus a derivada negativa da fluorescência. Quando apenas um produto específico é formado, visualiza-se um único pico no perfil da curva de dissociação.

Como controle negativo, foi utilizado água ao invés de cDNA, como também amostras submetidas ao protocolo de geração do cDNA mas na ausência da enzima transcriptase reversa. Esta análise excluiu a contaminação por DNA genômico, que poderia gerar resultados falso-positivos.

A quantificação do gene da cadeia β da H^+K^+ ATPase foi normalizada pela quantificação do gene constitutivo, levando-se em consideração os valores dos CTs das respectivas amostras ($\Delta CT = CT_{atpase} - CT_{GAPDH}$). O valor de CT corresponde ao ponto onde a curva de amplificação corta um limiar arbitrário. Este valor pode ser comparado entre diferentes amostras, sendo normalizado com relação aos valores de CT obtidos nas reações de amplificação para o gene constitutivo. O CT é diretamente proporcional à quantidade de amostra inicial presente na reação. Posteriormente, a amostra com o maior CT, ou seja, com a menor expressão da β da H^+K^+ ATPase, foi adotada como calibrador, que é a amostra que será utilizada como referência para a comparação das

quantificações. Com isso se define uma medida relativa que representa o número de vezes que a expressão do transcrito da cadeia β difere entre as amostras de timos de diferentes animais.

14.2. Metodologia

A detecção e quantificação da expressão do mRNA da subunidade β da H^+/K^+ ATPase no timo de neonatos de 3 dias (BALB/c) foi feita por PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), utilizando o sistema de Power SYBR Green (Power SYBR™ Green PCR Master Mix, Applied Biosystems). Os oligonucleotídeos utilizados estão listados na Tabela 2. A mistura de reação da PCR (20 μ L) contém 10 μ L de SYBR Green, 5 μ L da solução contendo os respectivos primers na concentração apropriada (0,5 μ M para H^+/K^+ ATPase e 0,2 μ M para GAPDH) e 1 μ g de cDNA diluído num volume total de 5 μ L. O programa de ciclagem consiste de uma incubação inicial a 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, seguidos de 50 ciclos de 95°C por 15 segundos, 61°C por 1 minuto e uma parada a 72°C por um segundo para efetuar a leitura de fluorescência das amostras. O qRT-PCR foi realizado no aparelho Chromo4™ Detector (MJ Research) e todas as amostras foram corridas em triplicatas, inclusive os controles negativos. Após o programa de ciclagem, era realizada uma curva de dissociação com o objetivo de certificar-se que o produto amplificado corresponde ao produto de interesse. Essa curva é realizada com um aumento de temperatura que vai de 60°C a 90°C, com leituras efetuadas a

cada 0,2°C. Tanto para o GAPDH quanto para a H⁺K⁺ATPase, o produto da amplificação tem cerca de 100pb.

15. Representação dos Resultados e Análise Estatística

Nos experimentos de citometria de fluxo, salvo se indicado na legenda da figura, todos os percentuais de subpopulações celulares, representam o percentual de tal população dentro população de células CD4⁺.

Exceto se descrito na legenda da figura, todos os resultados quantitativos são apresentados como média do grupo experimental ± erro médio padrão (SEM). As regressões lineares e testes estatísticos (*one-way* ANOVA com pós-teste de *Bonferroni*) foram feitos no programa GraphPad Prism 4.0.

IV. RESULTADOS

1. As linhagens susceptíveis e resistentes à doença autoimune pós-3dTx não diferem quanto à presença de células Treg CD4⁺ FoxP3⁺

A presença de células Treg foi avaliada nos órgãos linfóides periféricos de animais susceptíveis e resistentes à doença autoimune pós 3dTx. Animais das linhagens susceptíveis (BALB/c, C3H e A/J) e resistentes (DBA/2, B10.A e C57BL/6) foram timectomizados aos três dias de idade e 60 dias depois da timectomia, a presença de células T regulatórias FoxP3⁺ foi avaliada nos órgãos linfóides periféricos por citometria de fluxo. Os animais 3dTx apresentam células Treg (CD4⁺FoxP3⁺) tanto no baço quanto nos linfonodos mesentéricos (Figura 3).

Após a identificação das Tregs no baço e nos linfonodos mesentéricos dos animais 3dTx, foi feita a quantificação destas células nas diversas linhagens. De maneira geral, o número absoluto de células nos linfonodos e baço dos animais 3dTx foi cerca de 8-10 vezes menor do que nos animais Sham, conforme dados prévios da literatura (dados não mostrados) (Asano M *et al.*, 1996). A frequência de células Treg CD4⁺FoxP3⁺, dentro da população de células TCD4⁺, foi no mínimo equivalente a dos animais Sham, tanto nos linfonodos mesentéricos (Figura 4A) como no baço (Figura 4B) em todas as linhagens estudadas.

Uma vez que a timectomia neonatal não resultou em depleção do compartimento de células Treg, avaliou-se se a susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia neonatal poderia ser decorrente de uma frequência

reduzida de Tregs nos animais susceptíveis, em relação aos resistentes. Surpreendentemente não foram observadas diferenças entre os percentuais de células Treg CD4⁺FoxP3⁺ analisadas dentro da população CD4⁺, a despeito da resistência ou susceptibilidade à doença (Figura 4C e 4D). Os mesmos resultados foram válidos ao compararmos a frequência das subpopulações de células Treg (CD4⁺CD25⁻FoxP3⁺ ou CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) entre as diversas linhagens (Tabelas 3 e 4).

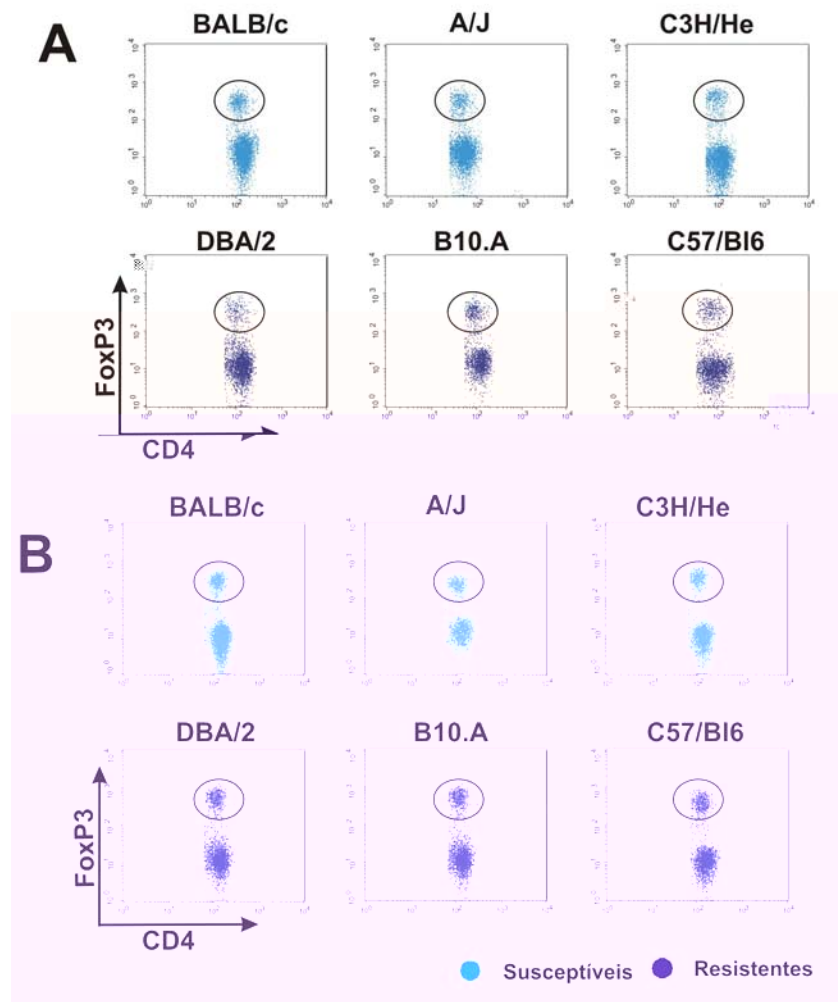


Figura 3 – Todas as linhagens de camundongos analisadas possuem células Treg na periferia. Análise da população de células Treg presente nos linfonodos e baço das diferentes linhagens de camundongos timectomizados adultos (90d). Os dados são representativos da análise individual de 103 animais (10-30 animais por grupo). **(A)** Plots representativos das marcações com anti-CD4-FITC e anti-FoxP3-APC nos linfonodos mesentéricos dos animais 3dTx **(B)** Plots representativos das marcações com anti-CD4-FITC e anti-FoxP3-APC no baço dos animais 3dTx. As populações assinaladas representam as células CD4⁺FoxP3⁺. As análises foram feitas dentro da população CD4⁺.

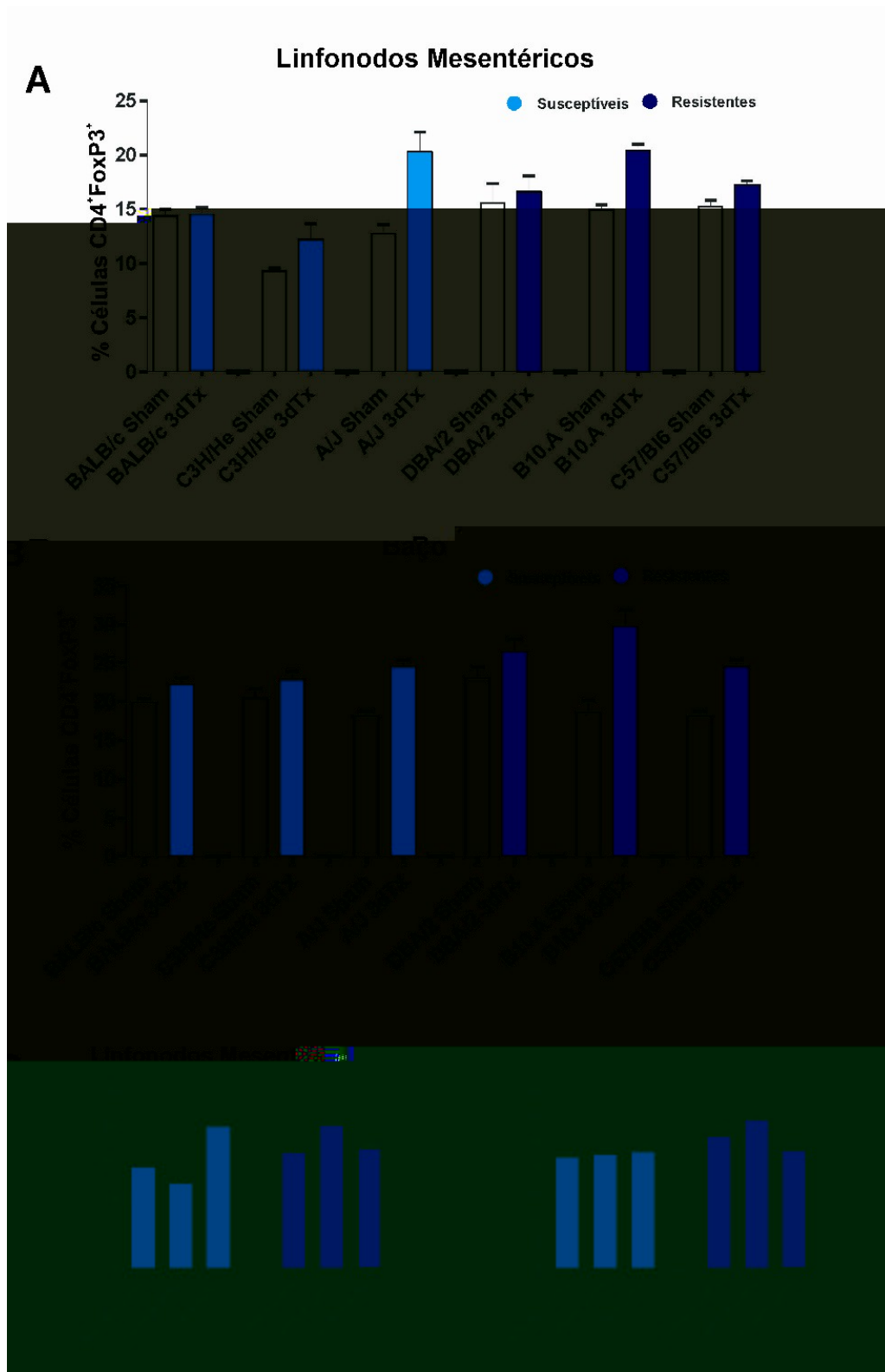


Figura 4 – A frequência de células T regulatórias nos animais 3dTx adultos não difere entre linhagens susceptíveis e resistentes à gastrite. Os camundongos das diversas linhagens foram timectomizados entre o 3-4 dias de vida (3dTx) ou não (Sham). Na fase adulta (90 dias), os órgãos periféricos foram coletados e analisados por citometria. **(A-B)** Comparação das frequências de células Tregs CD4⁺FoxP3⁺ entre os animais sham e 3dTx **(C-D)** Comparação das frequências de células Tregs CD4⁺FoxP3⁺ entre as diferentes linhagens. Análise de grupos com n=10-30 animais. Os resultados são apresentados como média±SEM, para grupos experimentais com n=10-30 animais. As análises foram feitas dentro da população CD4⁺

Linhagem	Status	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CD25 ⁺	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CD25 ⁻	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ CD25 ⁺
BALB/c	Sham	14,3±2,2	11,4±1,4	2,7±0,8	1,9±1,3
	3dTx	14,5±2,5	11,2±2,0	3,3±0,8	4,6±2,8
DBA/2	Sham	15,5±2,8	12,0±1,3	2,6±0,8	4,4±2,8
	3dTx	15,5±2,8	12,0±1,3	2,6±0,8	4,4±2,8

Tabela 3 – Frequência das subpopulações de células CD4 nos linfonodos mesentéricos dos animais timectomizados adultos. Os animais foram timectomizados entre 3-4 dias de vida (3dTx) ou não (Sham). Após 60-120 dias, a frequência das subpopulações celulares foi determinada por citometria de fluxo. Os percentuais referem-se sempre à frequência de determinada subpopulação na população de células CD4⁺. Os resultados são expressos como média±SD. n=10-30 animais por grupo.

Linhagem	Status	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁺	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CD25 ⁺	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CD25 ⁻	%CD4 ⁺ Foxp3 ⁻ CD25 ⁺
BALB/c	Sham	19,8±1,4	13,3±1,5	6,6±1,3	1,4±1,2
	3dTx	22,2±3,2	14,2±2,3	7,8±1,7	3,6±1,2
DBA/2	Sham	23,0±4,8	16,8±4,1	5,8±1,4	4,7±1,6
	3dTx	26,4±5,5	18,2±3,2	7,9±2,9	5,3±2,9
C3H/He	Sham	20,4±3,8	14,7±5,0	7,2±2,3	1,7±0,7
	3dTx	22,9±2,9	12,6±1,6	9,7±0,9	2,6±1,2
A/J	Sham	18,4±2,0	12,3±1,3	7,2±1,2	1,3±0,6
	3dTx	31,8±3,2	20,8±2,0	10,6±1,5	3,6±0,7
B10.A	Sham	18,6±4,5	12,3±3,2	6,5±2,0	0,7±0,2
	3dTx	29,6±4,2	15,9±3,3	13,1±2,9	1,1±0,4
C57/B6	Sham	18,1±1,4	11,7±1,3	6,5±0,9	0,6±0,3
	3dTx	24,5±1,7	15,1±1,2	9,9±1,1	1,3±0,6

Tabela 4 – Frequência das subpopulações de células CD4 no baço dos animais timectomizados adultos. Os animais foram timectomizados entre 3-4 dias de vida (3dTx) ou não (Sham). Após 60-120 dias, a frequência das subpopulações celulares foi determinada por citometria de fluxo. Os percentuais referem-se sempre à frequência de determinada subpopulação na população de células CD4⁺. Os resultados são expressos como média±SD. n=10-30 animais por grupo.

2. Camundongos adultos 3dTx possuem células Treg com fenótipo e potência supressora comparável às células dos camundongos não-timectomizados

Para confirmar se as células $CD4^+FoxP3^+$ eram realmente células regulatórias, foi feita uma fenotipagem mais detalhada, além de ensaios funcionais. Para tal, utilizamos camundongos BALB/c, já que esta linhagem é susceptível a doença quando submetido à 3dTx, mas resistente na ausência de tal procedimento.

Os animais BALB/c foram timectomizados entre 3-4 dias de vida. Após 60 dias da timectomia, a presença de células T regulatórias $FoxP3^+$ foi avaliada nos órgãos linfóides periféricos através de citometria de fluxo. Confirmando os dados mostrados no item anterior, os animais BALB/c 3dTx apresentam Tregs ($CD4^+Foxp3^+$) tanto no baço como nos linfonodos (Figura 5A). As células Treg encontradas apresentam o fenótipo classicamente descrito na literatura, apresentando alta expressão de CD25, CTLA-4 e GITR, e baixa expressão de CD69 (Figura 5B).

Apesar de haver células fenotipicamente similares as Tregs na periferia dos animais 3dTx, elas poderiam diferir das células regulatórias dos animais controles quanto à capacidade supressora. Com o objetivo de analisar se haveria diferença de potência de supressão entre as Tregs proveniente dos animais timectomizados e as dos animais controles, foram realizados ensaios de imunossupressão *in vitro*. Neste ensaio, células T $CD4^+CD25^+$ (supressoras) e células T $CD4^+CD25^-$ (respondedoras) foram purificadas de baço e/ou linfonodos mesentéricos de animais adultos timectomizados ou controles e

misturadas nas razões Supressora:Respondedora (S:R) de 1:1, 1:2, 1:5 e 1:10, 1:0. A comparação da potência de supressão das Tregs provenientes dos animais Sham e timentomizados, revelou que ambas possuem a mesma capacidade funcional, não havendo diferenças, *in vitro*, da inibição da proliferação das células T CD4⁺CD25⁻ respondedoras (Figura 5C). Portanto, animais adultos timentomizados possuem uma subpopulação de células T que expressa marcadores característicos das Tregs com atividade supressora similar às células T regulatórias dos animais controles sham. Sendo assim, ao contrário do que se esperaria pelos dados da literatura, a timentomia neonatal não depleta o compartimento de células T regulatórias nos animais timentomizado.

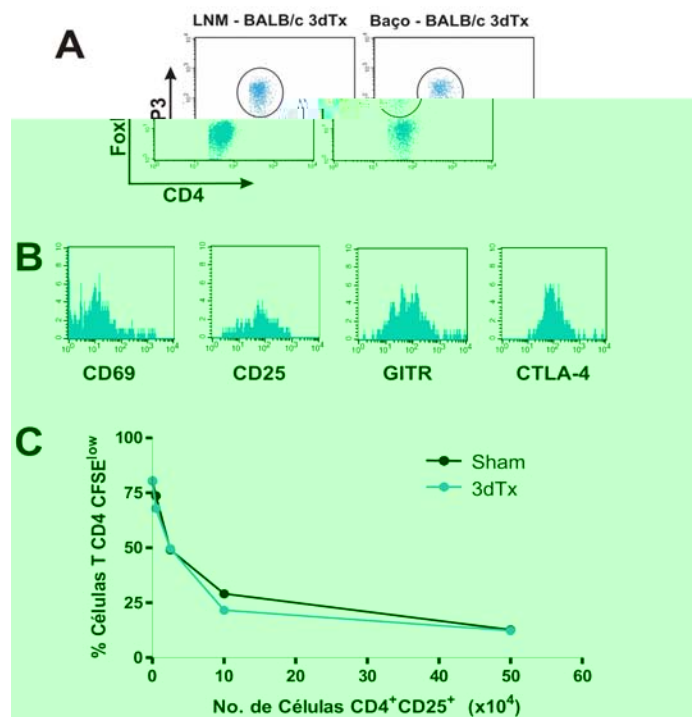


Figura 5 – As células T regulatórias estão presentes nos animais BALB/c 3dTx adultos. Análise da população de células Treg presente nos linfonodos e baço de animais BALB/c timentomizados (3dTx) adultos (90d). Os dados são representativos da análise individual de 25 animais. **(A)** Dot-plots representativos das marcações com anti-CD4-FITC e anti-FoxP3-APC nos órgãos linfóides periféricos dos animais BALB/c 3dTx. **(B)** Imunofenotipagem da subpopulação de células CD4⁺FoxP3⁺ do baço dos animais BALB/c 3dTx. **(C)** Ensaio de supressão utilizando células regulatórias purificadas baço e linfonodos de animais controle (preto) ou timentomizados (azul). Foram utilizadas as relações Treg:Teff 0:1, 1:10, 1:5, 1:2 e 1:1. Os resultados são expressos como % células que apresentaram diluição do CFSE e são representativos de dois experimentos independentes. As análises foram feitas dentro da população CD4⁺

3. O desenvolvimento de gastrite autoimune pós-timectomia não está relacionada à deficiência no compartimento de células T regulatórias

Todas as linhagens analisadas foram monitoradas quanto ao desenvolvimento de gastrite autoimune através de análise histopatológica do estômago após 60-90 dias da timectomia. Na avaliação da gastrite foram utilizados parâmetros histopatológicos previamente descritos na literatura e aceitos universalmente na caracterização desta doença (Dipaolo RJ *et al.*, 2005).

A figura 6 apresenta micrografias representativas dos diversos estágios de doença observados em animais BALB/c após a timectomia, e ilustra os parâmetros utilizados na definição e estratificação da gravidade da doença (vide item 8 , *Material e Métodos*). Na população de camundongos utilizada no presente estudo, a incidência de gastrite em cada linhagem foi comparável ao descrito na literatura por Kojima e Prehn (Kojima A & Prehn RT, 1981), confirmando as linhagens BALB/c, C3H/He e A/J como susceptíveis à gastrite, e as linhagens DBA/2, B10.A e C57/Bl6, como resistentes (Tabela 5).

Linagem	MHC	Status	Incidência	% Gastrite (escore>2)	% Gastrite severa (escore>4)	Escore máximo	Escore mínimo
BALB/c	H-2 ^d	Sham					

Tabela 5 – Análise Restrospectiva da Gastrite Autoimune na população de animais utilizada neste trabalho. Os animais foram timectomizados entre o 3-4 dias de vida (3dTx) e a análise histopatológica foi feita entre 60-120 dias após a timectomia. A histopatologia dos estômagos foi avaliada de acordo com os parâmetros descritos nos *Materiais e Métodos*. Os resultados apresentados englobam animais de diversos experimentos. n total = 334.

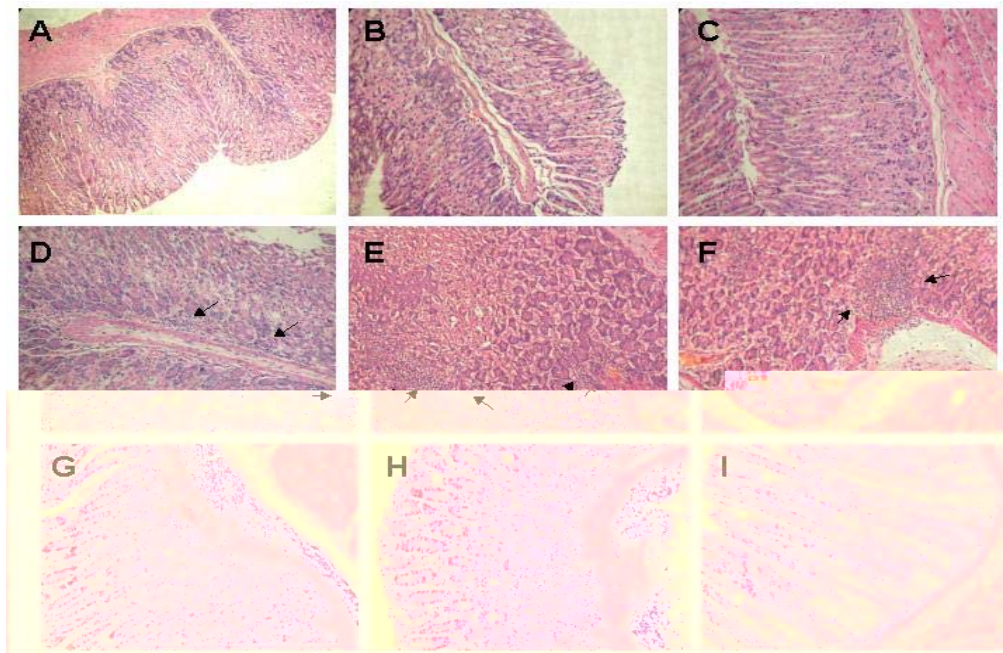


Figura 6 – Parâmetros utilizados na avaliação de Gastrite Autoimune. As micrografias representam a análise da gastrite autoimune pós-3dTx avaliada em animais com 90 dias de idade. **(A-C)** mucosas gástricas normais representativas de escore <2, **(D-F)** gastrite leve, apresentando infiltrado linfocitário (as setas apontam para os infiltrados) representativos de escore 2-4, **(G-I)** gastrite severa, apresentando grandes infiltrados linfocitários e destruição das células parietais com substituição por células principais ou mucinosas, representativos de escore > 4.

Uma vez confirmado que o padrão de resistência e susceptibilidade à doença autoimune pós 3dTx das diversas linhagens estudadas era compatível com a da literatura, foi feita a comparação entre as freqüências de Tregs nos órgãos linfóides periféricos dos animais timectomizados susceptíveis e a gravidade de doença.

Nas linhagens BALB/c e C3H/He, que são susceptíveis a gastrite, o escore de gastrite obtido nos animais adultos 3dTx, foi variável entre 0 e 6. A partir destes dado, levantou-se a possibilidade de que houvesse uma correlação positiva entre incidência/severidade da doença e freqüência maior de células Treg. Entretanto, a variação no escore de gastrite desenvolvido pelos animais adultos BALB/c 3dTx (Figura 7A) e C3H/He 3dTx (Figura 7B) não se correlacionou com a freqüência de Tregs CD4⁺FoxP3⁺ presente no linfonodos mesentéricos desses animais.

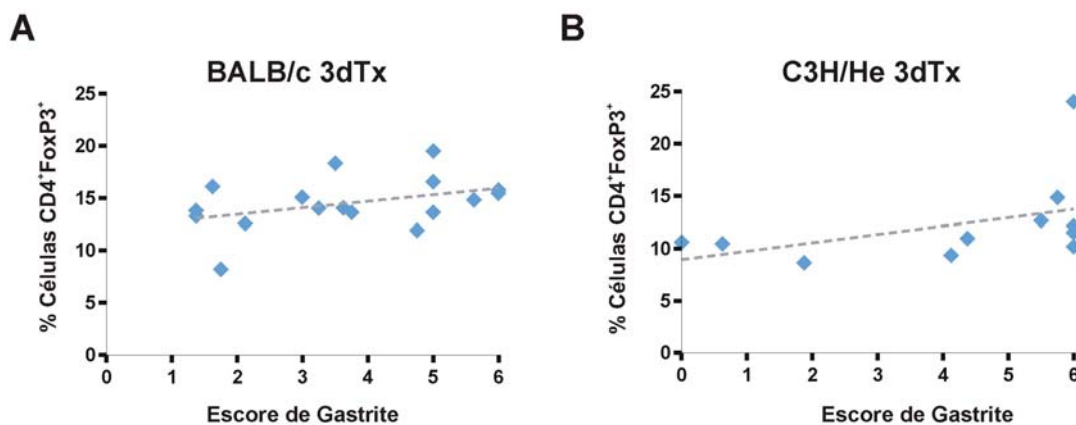


Figura 7 – Nas linhagens susceptíveis o escore de gastrite não apresenta correlação com a freqüência de células T regulatórias. Animais das linhagens susceptíveis BALB/c e C3H/He foram timectomizados entre 3-4 dias de vida. Após 90 dias os animais foram sacrificados, a freqüência de células Treg CD4⁺FoxP3⁺ nos linfonodos mesentéricos foi determinada por citometria de fluxo e o escore de gastrite foi avaliado através de histopatologia. A figura representa a correlação entre estes dois parâmetros, para cada indivíduo analisado. **(A)** Freqüência de Tregs em BALB/c 3dTx *versus* escore de gastrite ($r^2=0.24$) **(B)** Freqüência de Tregs em C3H/He 3dTx *versus* escore de gastrite ($r^2=0.14$). Resultados cumulativos de dois experimentos independentes.

O antígeno-alvo na gastrite autoimune já é bem caracterizado, consistindo na $H^+/K^+ATPase$ presente nas células parietais do estômago, o que torna importante a detecção das células Treg nos linfonodos gástricos de animais adultos timectomizados. Assim como nos resultados obtidos nos linfonodos mesentéricos e baço, a timectomia neonatal não alterou o compartimento de células T regulatórias nos linfonodos gástricos. Nota-se que a frequência das células T $CD4^+FoxP3^+$ entre os animais timectomizados e os seus respectivos controles sham é muito similar, sendo até mesmo maior no caso das linhagens BALB/c e B10.A timectomizadas (Figura 8). Ainda, a comparação das frequências de Tregs encontradas nos linfonodos gástricos dos animais susceptíveis e resistentes mostra não haver diferenças que se relacionem com o padrão de susceptibilidade das linhagens em questão (Figura 8).

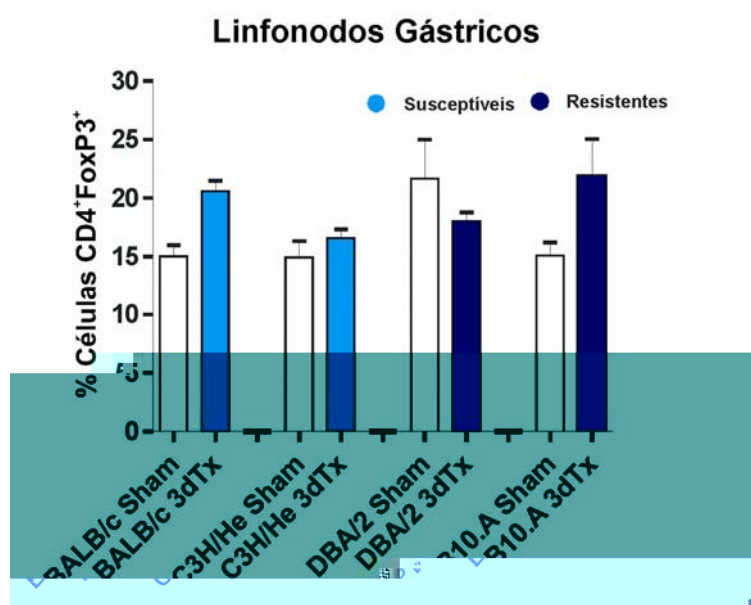


Figura 8 – Os linfonodos gástricos dos animais 3dTx possuem frequência normal de Tregs. Os linfonodos gástricos dos animais Sham ou 3dTx com 60-90 dias de idade foram coletados em *pool* e corados com anti-CD4 e anti-FoxP3. A determinação da frequência das células T $CD4^+FoxP3^+$ foi feita dentro da população $CD4^+$. Os resultados são apresentados como média \pm SEM. n = 3-5 pools.

4. A frequência de células T regulatórias no momento da timectomia não explica a resistência e susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia.

Como não foram encontradas diferenças no compartimento de células Treg que se relacionassem à susceptibilidade à gastrite nos animais adultos timectomizados, verificou-se se a frequência de células Treg no momento da timectomia (aos 3-4 dias de idade) poderia ser o determinante para o desenvolvimento da doença. A deficiência relativa de células Treg neste momento poderia resultar na expansão de clones autorreativos que escaparam da seleção negativa intratímica durante o período neonatal, resultando num repertório enriquecido de células potencialmente patogênicas.

Camundongos neonatos foram sacrificados aos 3-4 dias de vida, e os linfonodos totais ou baço foram analisados quanto a presença de células T CD4⁺FoxP3⁺ por citometria de fluxo. Ao contrário dos dados previamente descritos por Sakaguchi e cols (Asano M *et al.*, 1996), as células T CD4⁺FoxP3⁺ foram detectadas na periferia já no 3º dia de vida (Figura 9). O nível de expressão dos marcadores CTLA-4, GITR e CD25 foi alto na subpopulação FoxP3⁺ analisada, condizente com o fenótipo das células T regulatórias.

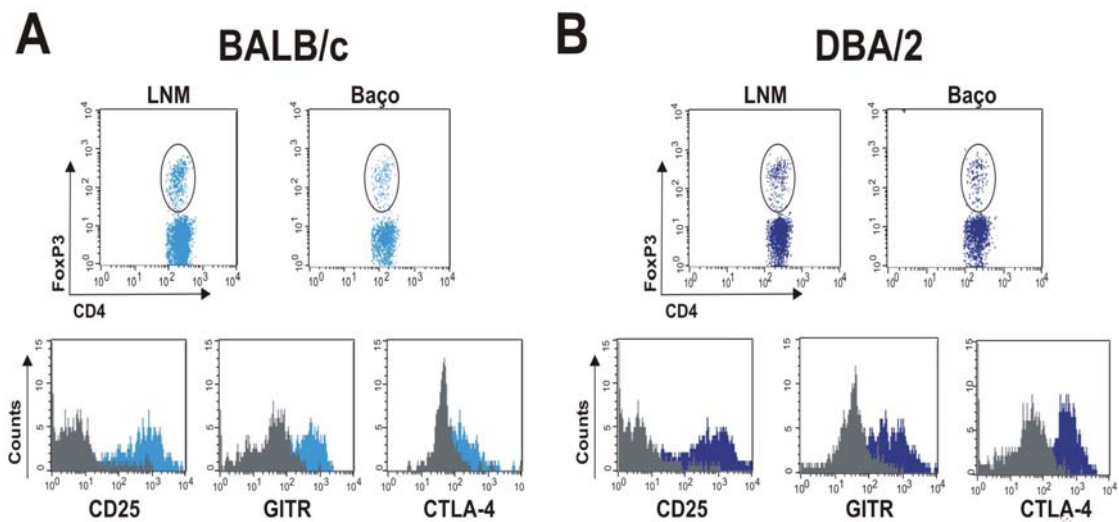


Figura 9 – Detecção e caracterização fenotípicas das células T regulatória em camundongos neonatos. (A) BALB/c ou (B) DBA/2 neonatos de 3 dias de idade foram sacrificados e os órgãos linfóides foram retirados para análise por citometria de fluxo. **Painel superior:** dot-plots representativos das marcações com anti-CD4-FITC e anti-FoxP3-APC nos órgãos linfóides periféricos. As populações assinaladas representam as células Treg. **Painel inferior:** imunofenotipagem das células CD4⁺FoxP3⁺ (azul) ou CD4⁺FoxP3⁻ (cinza) nos linfonodos dos neonatos. Dados são representativos de 3 experimentos independentes, com n= 3-5 (baço) e n=2-3 pools (linfonodos).

A presença células Treg na periferia (baço e linfonodos) foi confirmada não só em BALB/c e DBA/2, mas em todas as linhagens utilizadas nesse estudo, o que inclui tanto as linhagens susceptíveis (BALB/c, AJ e C3H/He) quanto resistentes (DBA/2, B10.A e C57BL/6) à gastrite (Figura 10). Apesar da frequência de Tregs nos neonatos ser menor do que a observada nos animais adultos, o padrão de susceptibilidade das linhagens não se mostrou associado a uma maior ou menor frequência de células Treg. Podemos observar que BALB/c, mesmo sendo uma linhagem susceptível, possui uma maior frequência de células Treg tanto nos linfonodos (Figura 11A) quanto no baço (Figura 11B), quando comparado à linhagem resistente, de mesma restrição de MHC, DBA/2.

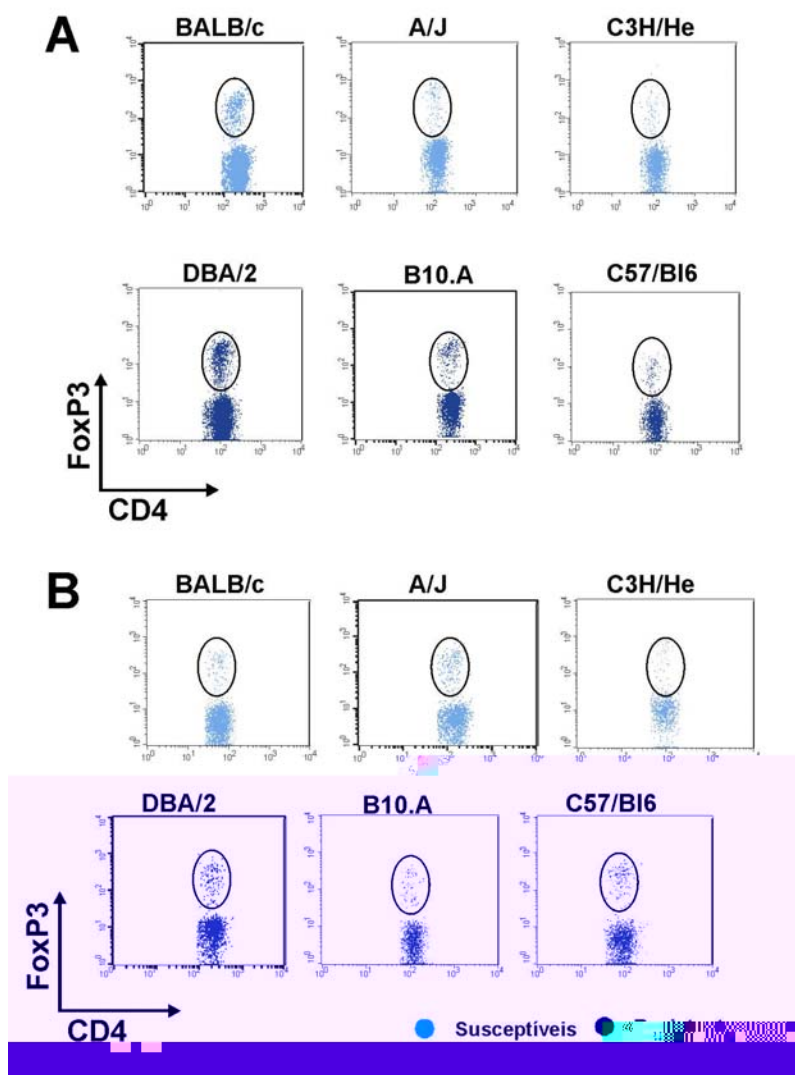


Figura 10 – Análise da população de células Treg presentes nos linfonodos e baço nas diferentes linhagens de camundongos com 3 dias de vida. Dot-plots representativos das marcações com anti-CD4-FITC e anti-FoxP3-APC nos linfonodos (A) ou baço (B) dos animais com 3 dias. As populações assinaladas representam as células Treg. Dados são representativos de pelo menos 3 experimentos independentes, com n=8-15 (baço) e n=2-3 pools (linfonodos). A determinação da frequência das células T $CD4^+FoxP3^+$ foi feita dentro da população $CD4^+$.

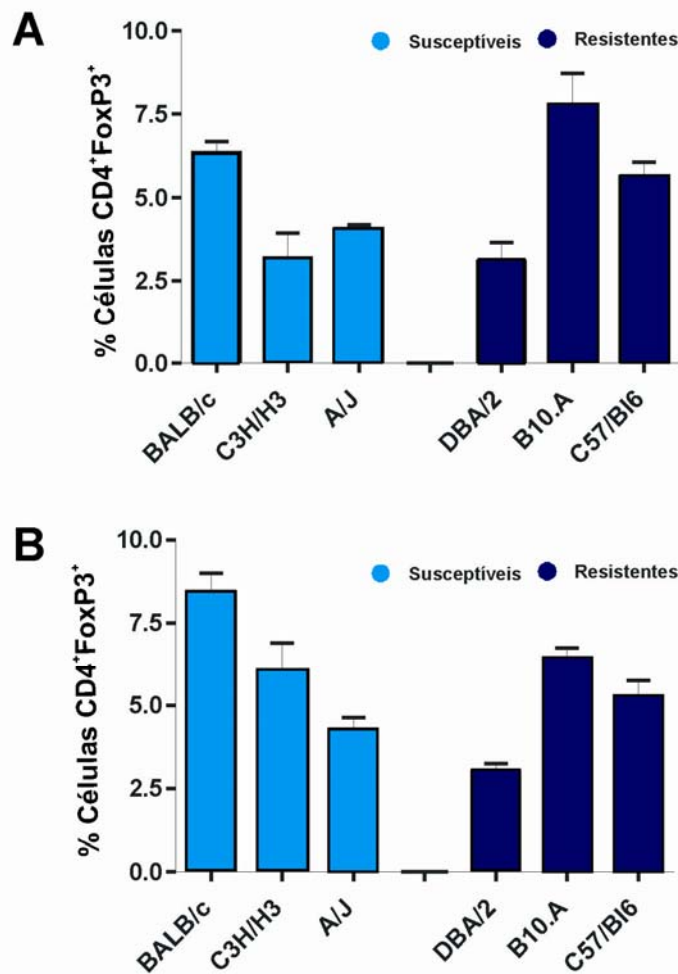


Figura 11 – Comparação entre as frequências das células T regulatórias CD4⁺FoxP3⁺ dos camundongos neonatos susceptíveis e resistentes. (A) Baço e (B) linfonodos totais foram coletados dos neonatos de 3 dias, corados com anti-CD4-FITC e anti-FoxP3-APC e analisados por citometria de fluxo. Os resultados são apresentados como média±SEM com n=8-15 (baço) ou n=2-3 pools (linfonodos).A determinação da frequência das células T CD4⁺FoxP3⁺ foi feita dentro da população CD4⁺.

5. A timectomia neonatal resulta no enriquecimento do repertório de linfócitos T em células efetoras ativadas autorreativas.

Uma vez que não houve alteração no compartimento regulatório dos animais timectomizados, levantou-se a possibilidade da susceptibilidade à gastrite estar relacionada, não a redução da frequência das células T

regulatórias, e sim ao aumento da frequência das células T efetoras ativadas. Para tanto, iniciou-se a caracterização, baseado em marcadores de superfície, do repertório de células T efetoras ativadas. A análise por citometria de fluxo foi feita a partir de células obtidas dos linfonodos gástricos, por ser local onde ocorre ativação das células específicas para H⁺/K⁺ ATPase. Os BALB/c adultos timectomizados foram analisados individualmente. As células T efetoras ativadas foram caracterizadas de acordo com a expressão do marcador CD25 na ausência da expressão de FoxP3, sendo, portanto, células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻. Os resultados demonstram claramente que há não só um aumento na frequência das células T ativadas, como também uma diminuição da relação Treg:Tefetora nos animais timectomizados, quando comparados aos animais controles (Figura 12).

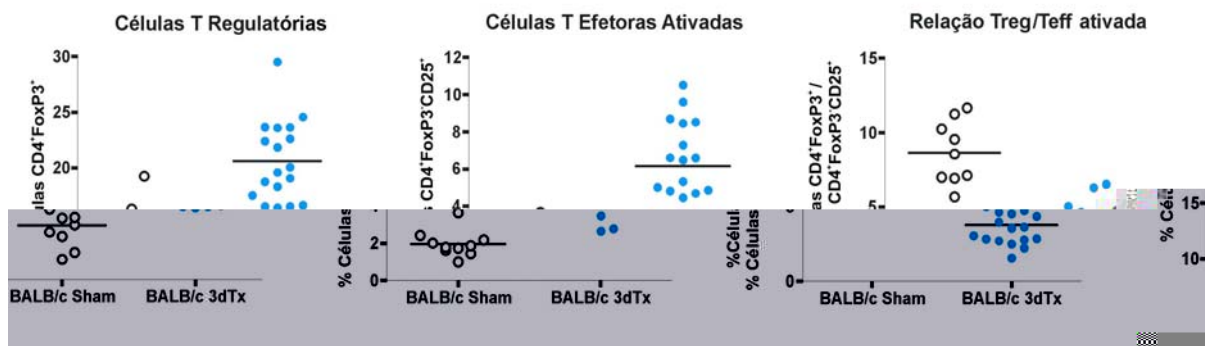


Figura 12 – Camundongos BALB/c 3dTx apresentam aumento na frequência das células ativadas e diminuição da relação Treg:Teff^{ativada} nos linfonodos gástricos. Animais BALB/c foram timectomizados aos 3 dias de vida. Após 90 dias, os animais foram sacrificados e os linfonodos gástricos retirados para análise. **Painel da esquerda:** frequência de Tregs. **Centro:** frequência de células T efetoras ativadas. **Direita:** relação Treg/Teff^{ativada} para cada animal individualmente. Dados cumulativos de 2 experimentos independentes. Cada símbolo representa um animal. A barra representa a média de cada grupo.

Ao correlacionar a frequência das células T CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ efetoras ativadas com o grau de gastrite desenvolvido pela linhagem susceptível BALB/c, observou-se que há uma correlação positiva na análise desse dois

parâmetros, ou seja, quanto mais alta for a frequência das células T ativadas CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻ nos linfonodos gástricos, mais severa será a doença, tendo, portanto, um escore alto de gastrite. Uma relação inversa é observada na correlação entre a razão Treg:Teff^{ativada} e o escore de gastrite (Figura 13). Ao contrário, o grau de gastrite desenvolvida pelos animais BALB/c 3dTx adultos não apresentou nenhuma correlação com a frequência de células Treg presentes linfonodos gástricos, uma vez que a associação dos dois parâmetros não apresentou tendência à regressão linear (Figura 13).

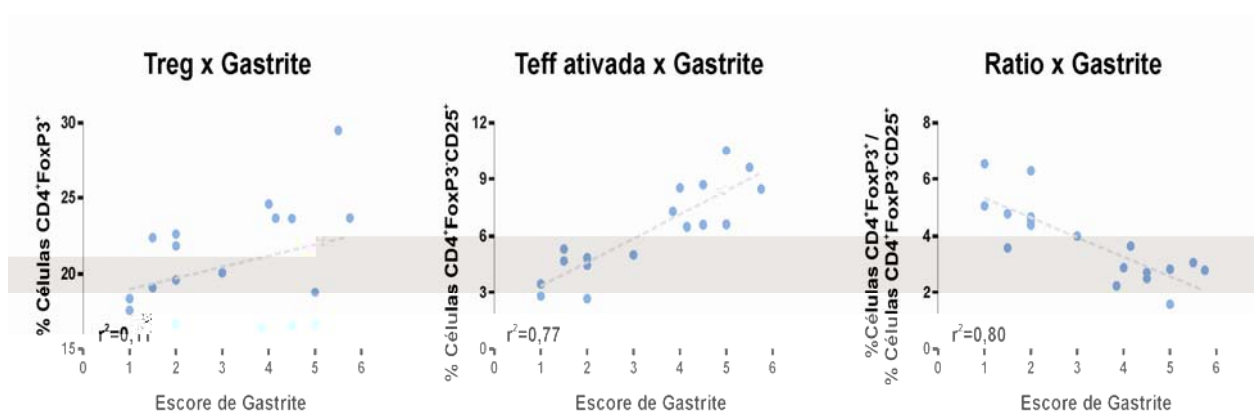


Figura 13 – A susceptibilidade à gastrite se correlaciona positivamente com frequência de células T efetoras ativadas nos linfonodos gástricos, mas não com a frequência de células T regulatórias. Os dados obtidos na figura anterior foram cruzados com o escore de gastrite avaliado para cada animal. A gastrite foi avaliada de acordo com os parâmetros descritos nos *Materiais e Métodos*. Cada símbolo representa a associação dos 2 parâmetros para um dado animal. As curvas representam a regressão linear obtida para cada grupo. $r^2 = 0.11$ (Treg x AIG), $r^2 = 0.77$ (Teff x AIG) e $r^2 = 0.80$ (Relação x AIG). $p < .001$.

Reforçando os dados obtidos em BALB/c timectomizados (Figuras 12 e 13), a mesma análise foi repetida em camundongos C3H/He 3dTx. De fato, os animais adultos apresentam enriquecimento em células T CD4⁺ efetoras ativadas nos linfonodos gástricos e redução da relação Treg:Teff (Figura 14). Ao contrário, nas duas linhagens resistentes DBA/2 e B10.A a frequência de

células T efetoras ativadas e a relação Treg:Teff ativada nos linfonodos gástricos se manteve inalterada (Figura 14). Os dados obtidos até o momento sugerem que o evento primário que desencadeia a doença autoimune pós-timectomia seja o aumento na frequência de células T patogênicas e não a redução na frequência de células T regulatórias

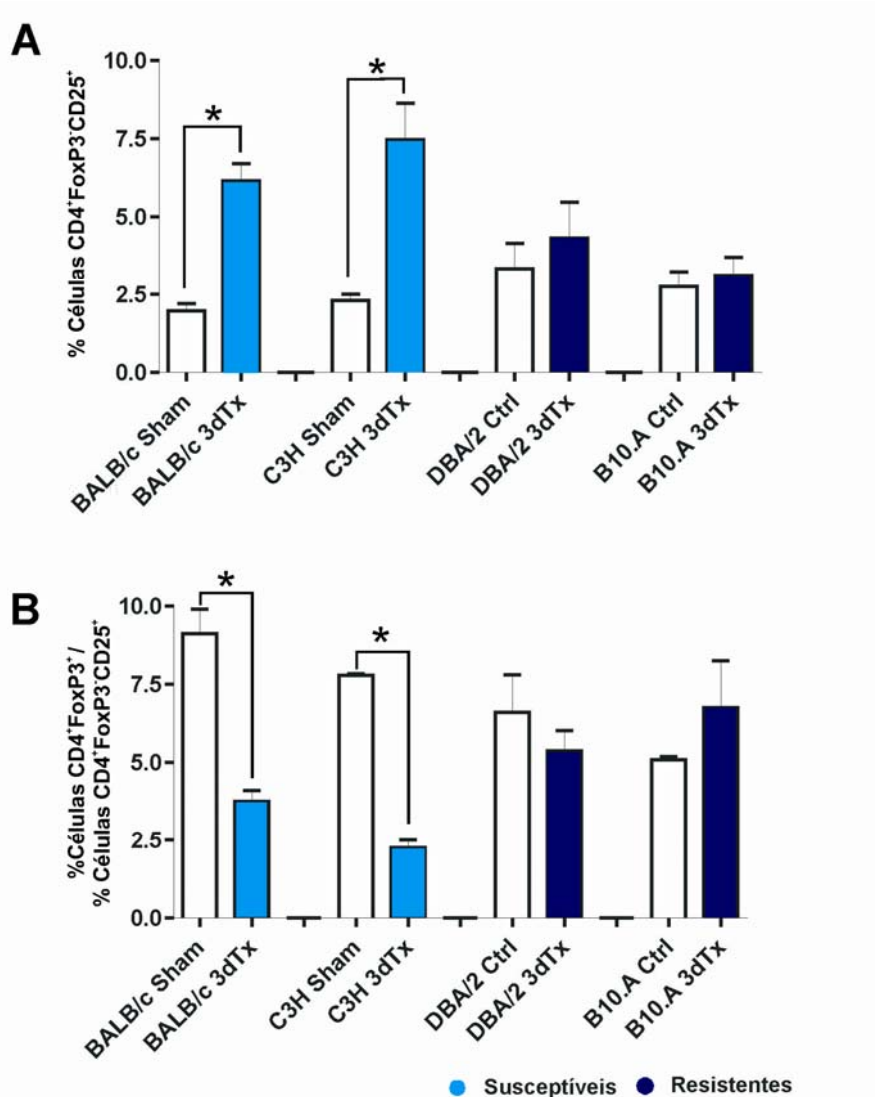


Figura 14. Somente as linhagens susceptíveis à gastrite apresentam aumento na frequência de células T ativadas CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻. Animais das diferentes linhagens foram timectomizados aos 3 dias idade. Após 90 dias, os animais foram sacrificados e os linfonodos gástricos retirados em *pool* para análise por citometria de fluxo. As células T efetoras ativadas foram caracterizadas como CD4⁺CD25⁺FoxP3⁻. **(A)** Frequência de células T efetoras ativadas e **(B)** relação Treg/Teff^{ativada} nas linhagens susceptíveis. Os resultados são apresentados como média±SEM e são representativos de 3 experimentos independentes. *p=0.01

6. O desenvolvimento de gastrite autoimune pós-timectomia neonatal requer a presença de um repertório de células T efetoras autorreativas

Com o objetivo de avaliar se a haveria diferenças qualitativas no repertório das células T autorreativas presente em camundongos BALB/c 3dTX individuais, realizou-se um experimento baseado na transferência de células de linfonodos mesentéricos de animais adultos individuais BALB/c timectomizados ou controles, depletados ou não de Tregs, para camundongos receptores C.B17/SCID, imunodeficientes. A confirmação da depleção foi feita por citometria de fluxo, através da marcação com anticorpos anti-CD25. Em todos os casos a depleção resultou em <1% de células CD25⁺ (dados não mostrados). Cada receptor recebeu células de apenas um doador, configurando-se assim pares doador/receptor. O desenvolvimento de gastrite dos doadores e dos receptores foi posteriormente confirmado através da análise histopatológica do estômago. Em concordância com nossa hipótese, somente células provenientes de doadores timectomizados com gastrite foram capazes de transferir doença para o seu respectivo animal receptor. As células dos animais doadores timectomizados que não desenvolveram gastrite, não foram capazes de transferir a doença, mesmo após a depleção das Tregs (Figura 15) Outro fato importante foi que na presença das células Treg o grau da doença desenvolvido no doador foi mantido no animal receptor. O aumento na gravidade da doença só foi observado quando as células Treg foram depletadas do pool de células do doador. Sendo assim, os resultados sugerem de forma consistente que, apesar das Tregs serem importantes para o controle da resposta das células T efetoras, o que define o desenvolvimento da doença

órgão-específica pós-timectomia é a presença de células T capazes de causar a doença.

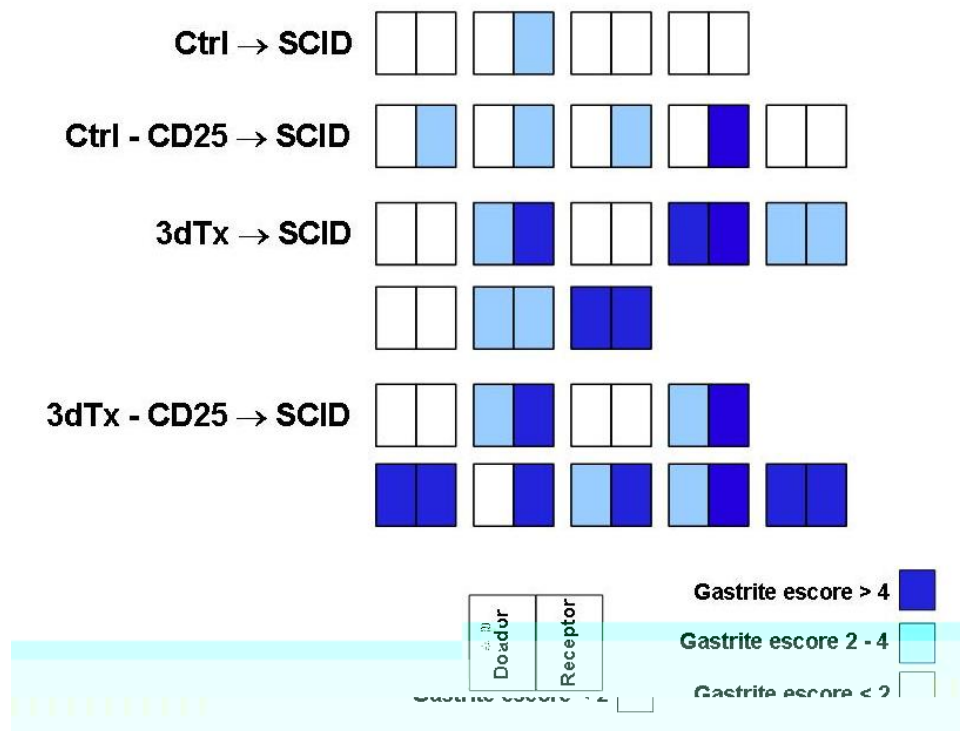


Figura 15. O desenvolvimento de gastrite autoimune requer a presença de um repertório de células T efectoras gastritogênicas. Camundongos SCID receberam 10^6 células totais de linfonodos – depletadas ou não de células T regulatórias, de doadores BALB/c 3dTx com 60 dias de vida, ou animais controles pareados por idade. Cada receptor recebeu células de apenas um doador, configurando-se assim pares doador/receptor, ilustrados acima pelos pares de retângulos. Após 60 dias da transferência os receptores foram sacrificados e os estômagos foram retirados para análise histopatológica. Ao término do experimento o escore de gastrite de cada receptor foi comparado com o de seu respectivo doador. Os doadores estão agrupados em controles (Ctrl), controles depletados de células Treg (Ctrl - CD25), timectomizados (3dTx) ou timectomizados depletados de células Treg (3dTx - CD25).

7. A cadeia β da H^+/K^+ ATPase é expressa no timo

Se a susceptibilidade à gastrite autoimune está relacionada a presença ou ausência de células T efectoras autorreativas no repertório dos camundongos neonatos, que fatores seriam responsáveis por essas diferenças? Um dos mecanismos propostos para justificar o escape de células potencialmente

patogênicas do timo é baseado no nível de expressão ectópica de antígenos periféricos no timo. Enquanto a alta expressão tímica do autoantígeno resultaria na deleção dos clones autorreativos, a ausência/ baixa expressão resultaria no escape de clones autorreativos do timo para periferia.

Verificou-se primeiramente nesse trabalho, se a expressão da cadeia β da H^+/K^+ ATPase ocorre de fato no timo. Para isso, foi utilizado como material cDNA sintetizado a partir de RNA de células tímicas de camundongos BALB/c neonatos (3 dias). A detecção da expressão da cadeia β foi feita por PCR em tempo real (qRT-PCR), já que essa técnica tem maior sensibilidade quando comparada ao RT-PCR convencional. Neste trabalho, utilizamos o gene constitutivo GAPDH como controle interno.

De acordo com os resultados obtidos pelo qRT-PCR, a cadeia β da H^+/K^+ ATPase é expressa nas células tímicas dos camundongos neonatos BALB/c, assim como o GAPDH utilizado como controle interno, conforme mostrado na curva de amplificação (Figura 16A e 16B, respectivamente). A verificação da especificidade dos produtos foi confirmada através da análise das curvas de dissociação, mostrando que tanto para cadeia β da H^+/K^+ ATPase quanto para o GAPDH não houve formação de produtos inespecíficos (Figura 16C e 16D, respectivamente). Ainda, a análise da curva de dissociação feita para os controles negativos mostra ausência de uma amplificação robusta e ausência do pico único característicos das curvas de dissociação (Figura 16E e 16F), indicando especificidade das reações de amplificação para cadeia β da H^+/K^+ ATPase e GAPDH no timo dos neonatos.

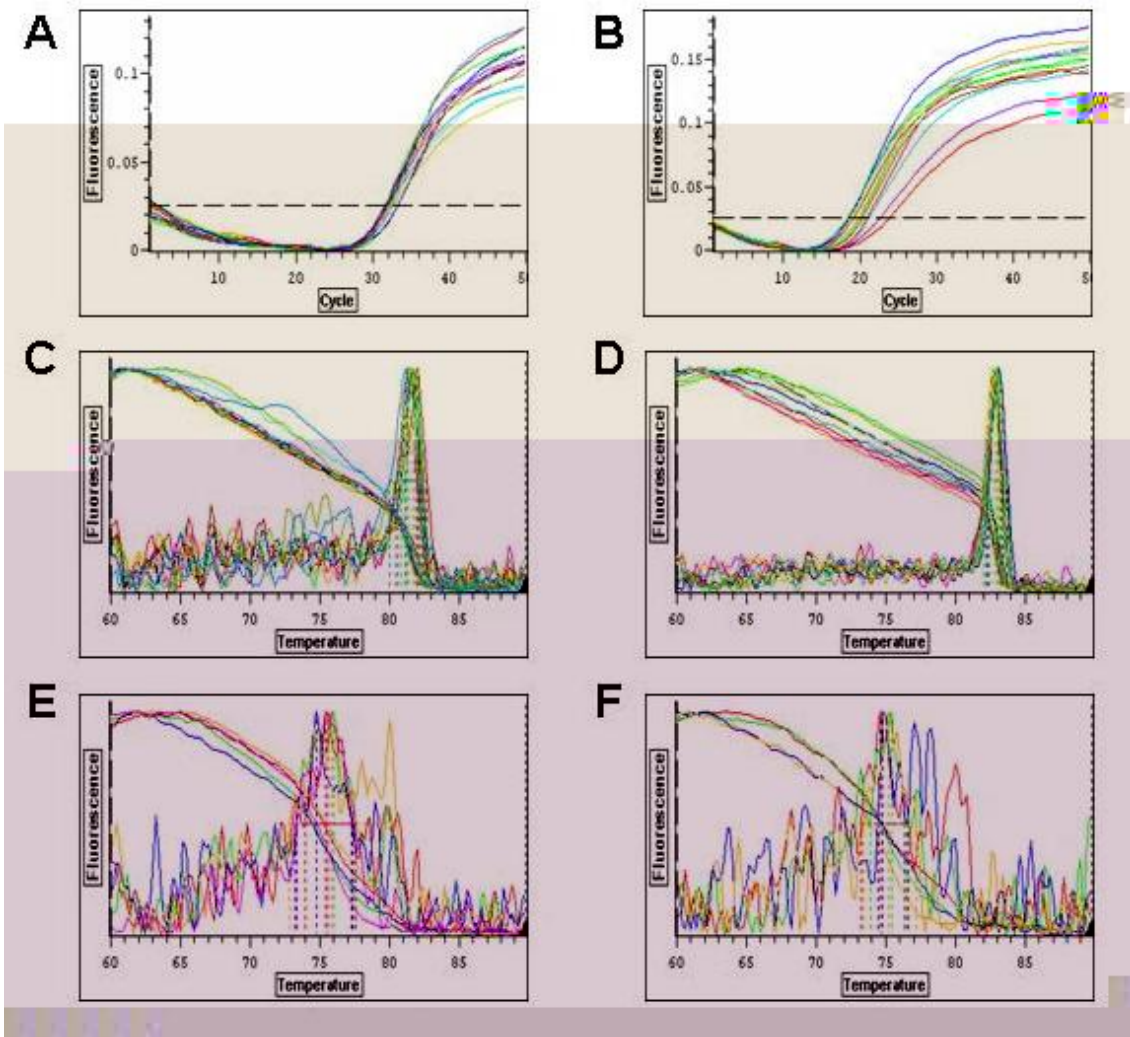


Figura 16. Curvas de quantificação de fluorescência e dissociação para os genes da cadeia β da H^+/K^+ ATPase e GAPDH. (A) Curva de quantificação de fluorescência para o gene da cadeia β da H^+/K^+ ATPase **(B)** Curva de quantificação de fluorescência para o gene constitutivo GAPDH **(C)** Curva de dissociação para o gene da cadeia β da H^+/K^+ ATPase **(D)** Curva de dissociação para o gene constitutivo GAPDH **(E)** Curva de dissociação utilizando água como molde (reação negativa) **(F)** Curva de dissociação das amostras de cDNA sintetizadas na ausência da enzima transcriptase reversa (reação negativa).

8. O padrão de expressão intratímica da cadeia β da H^+/K^+ ATPase condiciona o desenvolvimento de gastrite autoimune pós-3dTx

Uma vez demonstrada a expressão da cadeia β da H^+/K^+ ATPase no timo, o próximo passo foi associar o nível de expressão desse autoantígeno gástrico no timo, com a susceptibilidade à gastrite dentro da própria linhagem

BALB/c, visto que somente 60-70% dos animais desenvolvem gastrite pós-3dTx. A associação desses dois parâmetros (expressão do autoantígeno x desenvolvimento de doença) foi testada com amostras dos timos dos animais com 3 dias de vida que foram coletadas individualmente no momento da timectomia e, após extração de RNA e síntese de cDNA, foram submetidos ao qRT-PCR para quantificação da expressão relativa da cadeia β da H^+/K^+ ATPase. Os animais cujos timos foram recuperados foram marcados na pata para garantir sua identificação na idade adulta (60 dias), confirmando posteriormente o desenvolvimento de AIG através da análise dos estômagos.

Os resultados do qRT-PCR, juntamente com os resultados obtido pela histopatologia do estômago dos animais 3dTx, mostram que a susceptibilidade ao desenvolvimento de gastrite autoimune pós-timectomia neonatal está correlacionado ao nível de expressão do autoantígeno gástrico no timo, uma vez que os animais que expressam altos níveis da cadeia β da H^+/K^+ ATPase no timo foram protegidos do desenvolvimento da doença, enquanto que a baixa expressão foi associada ao desenvolvimento de gastrite (Figura 17). Sendo assim, os resultados obtidos em conjunto sugerem de forma consistente que a susceptibilidade à gastrite autoimune pode ser atribuída, pelo menos em parte, à presença do autoantígeno relevante no timo e que estes níveis devem ser suficientes para induzir tolerância central a esse antígeno.

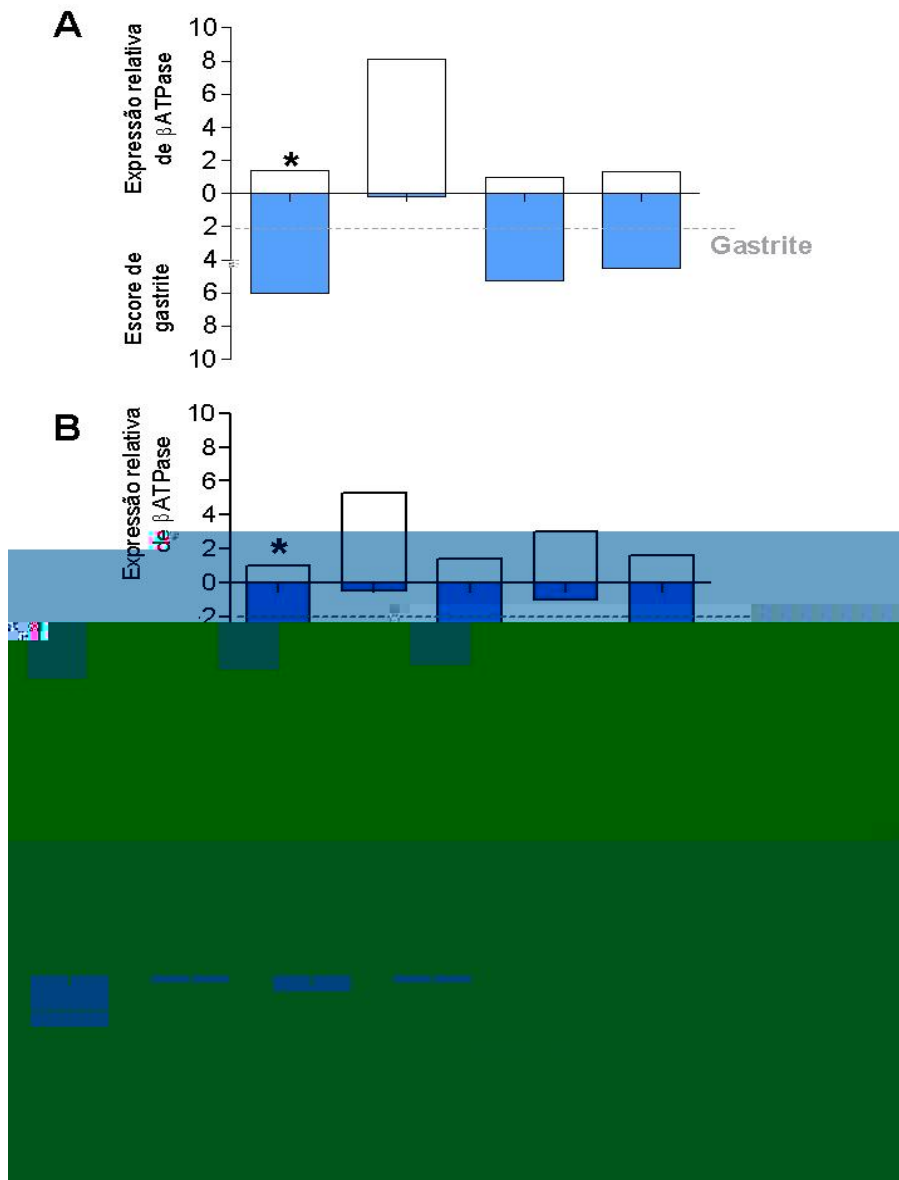


Figura 17. Expressão da cadeia β da H^+/K^+ ATPase no timo e incidência de gastrite na linhagem BALB/c. Quantificação relativa da expressão da cadeia β da H^+/K^+ ATPase utilizando SYBR Green. A análise da expressão foi feita em 3 experimentos diferentes (A,B e C). Os timos dos BALB/c de 3 dias foram testados para a amplificação dos genes da cadeia β da H^+/K^+ ATPase e GAPDH. Os valores de CT da cadeia β foram normalizados pelos valores do gene constitutivo GAPDH. O valor da expressão relativa da cadeia β e o respectivo grau de gastrite de cada animal são ilustrados pelas barras (branca e azul, respectivamente). Cada barra é representativa do timo de um indivíduo (n=13). Escore > 2 foi considerado gastrite. * amostra com o maior CT foi adotada como calibrador interno

V. Discussão

A timectomia neonatal foi amplamente utilizada em estudos relacionados ao desenvolvimento de autoimunidade órgão-específica. Nesse modelo, camundongos timectomizados entre o dia 3-4 desenvolvem doença autoimune na fase adulta de forma espontânea, não havendo necessidade de sensibilização prévia com o antígeno (Nishizuka Y *et al.*, 1969; Kojima A *et al.*, 1976; Kojima A *et al.*, 1980). Uma importante peculiaridade desse modelo, é que a taxa de incidência de doença e o tipo de órgão afetado são variáveis de acordo com a linhagem murina estudada (Kojima A. & Prehn RT, 1981).

A explicação mais aceita para o desenvolvimento de autoimunidade pós-timectomia neonatal, está relacionada ao compartimento de células T regulatórias. O modelo de timectomia foi de extrema importância para identificação e caracterização dessas células com potencial supressor, visto que, já nos trabalhos iniciais, o desenvolvimento de doença foi associado à perda seletiva de uma subpopulação de células T (Sakaguchi S *et al.*, 1982; Sakaguchi S *et al.*, 1985; Sugihara S *et al.*, 1988; Powrie F & Mason D, 1990). Mais tarde, essa subpopulação de linfócitos T com características supressoras foi caracterizada por Sakaguchi e cols, como sendo CD4⁺CD25⁺ (Sakaguchi S *et al.*, 1995).

O trabalho publicado em 1996, por Sakaguchi e cols, foi fundamental para o estabelecimento do dogma relacionado à depleção de Tregs e desenvolvimento de autoimunidade (Asano M *et al.*, 1996). De acordo com os autores, as células Treg só seriam exportadas do timo a partir do terceiro dia de vida do camundongo, já que não foi possível detectar células CD3⁺CD25⁺ no baço dos camundongos neonatos. Além disso, a transferência de células

CD4⁺CD25⁺ para camundongos BALB/c recém-timectomizados, foi capaz de inibir o desencadeamento de gastrite autoimune. A partir daí, todos os trabalhos passaram a considerar o desenvolvimento de doença autoimune como consequência da depleção das células T regulatórias pela timectomia neonatal. Entretanto, mesmo considerando que as células Treg CD3⁺CD25⁺ estariam ausentes no momento da timectomia, ao analisar os camundongos adultos timectomizados, os mesmos autores observaram uma quantidade considerável de células T CD3⁺CD25⁺, havendo inclusive um maior percentual dessas células quando comparadas aos animais controles não-timectomizados. Em corroboração com esses dados, Shevach e cols também encontraram frequência aumentada de células CD4⁺CD25⁺ no baço e linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c timectomizados adultos (Bonomo, A *et al.*, 1995). O fato do marcador CD25 não ser exclusivo das Tregs dificultou a análise desses dados, uma vez que essas células poderiam ser somente células T efetoras ativadas. Em 2004, após Sakaguchi e cols descreverem que FoxP3 é marcador específico das células Treg (Hori S *et al.*, 2003), Bandeira e cols retornaram a essa questão, buscando esclarecer se os animais timectomizados realmente não apresentavam células T regulatórias (Dujardin HC *et al.*, 2004). Através da técnica de PCR em tempo real, os autores não só demonstraram que as células T CD4⁺CD25⁺ dos animais adultos timectomizados expressavam FoxP3, como também observaram a presença dessas células nos neonatos de 3 dias. Vale ressaltar que todos os dados foram gerados baseados na linhagem BALB/c, que é susceptível à gastrite autoimune, não havendo nenhum dado relacionado às linhagens resistentes à doença. Diante do exposto acima, nosso primeiro passo foi confirmar a

presença das células T regulatórias CD4⁺FoxP3⁺ nos animais adultos timectomizados da linhagem BALB/c. Conforme descrito por Bandeira e cols, nossos dados mostram que as células T regulatórias CD4⁺FoxP3⁺ estão presentes na periferia (baço e linfonodos) dos animais BALB/c timectomizados, em frequência comparável ao controles não-timectomizados (Figura 5A). Essas células expressam marcadores classicamente utilizados na caracterização das Tregs, incluindo CTLA-4, GITR, CD25, CD69 (Figura 5B) e possuem ainda atividade supressora idêntica àquela observada nas células dos animais controle (Figura 5C). Como dito anteriormente, os estudos relacionados à Treg foram feitos em animais BALB/c timectomizados, não havendo nenhum dado relacionado ao compartimento regulatório nos animais resistentes à gastrite autoimune, como é o caso das linhagens DBA/2, B10.A e C57BL/6. Com o intuito de buscar uma relação entre a susceptibilidade à doença autoimune pós-3dTx e possíveis variações no compartimento regulatório desses animais, avaliamos a presença das Tregs em 6 linhagens murinas adultas timectomizadas. Além do BALB/c, analisamos as linhagens susceptíveis A/J e C3H/He. Dentre as resistentes, incluímos DBA/2, que apresenta a mesma molécula de MHC que BALB/c (H-2^d), exemplificando a ausência de relação entre a molécula de restrição e a susceptibilidade à gastrite autoimune. Além do DBA/2, também estudamos as linhagens resistentes C57Bl/6 e B10.A. Os resultados da citometria mostram que as células T CD4⁺FoxP3⁺ estão presentes em todas as linhagens timectomizadas analisadas, tanto nos linfonodos mesentéricos quanto no baço (Figura 3A e 3B, respectivamente) e, mais importante, a timectomia não resultou na alteração da frequência das Tregs em nenhum dos animais analisados, visto que a frequência nos

timectomizados se manteve constante, quando comparada aos controles sham não-timectomizados (Figura 4A e 4B). Ao analisarmos a população CD4⁺CD25⁺ presente no baço e linfonodos mesentéricos dos animais timectomizados observamos que, mesmo sendo de um modo geral enriquecido de células T ativadas (Bonomo A *et al.*, 1995) a grande maioria das células que expressa o marcador CD25, também expressa o marcador FoxP3, o que sugere que a subpopulação CD25⁺ é constituída em grande parte por células regulatórias FoxP3⁺, não sendo meramente constituído de células ativadas CD25⁺. Conjuntamente, esses resultados confirmam a presença de células T regulatórias em animais timectomizados, reforçando assim os dados publicados por Bandeira e cols.

Apesar de todas as linhagens apresentarem Tregs na periferia, poderia haver diferença nas freqüências dessas células entre os diferentes animais, explicando assim o padrão de susceptibilidade observado. Entretanto, essa possibilidade não se mostrou verdadeira, uma vez que todas as linhagens, tanto susceptíveis quanto resistentes, não diferem quanto à freqüência de Tregs nos órgãos linfóides periféricos (Figura 4C e 4D). Na tabela 4 e 5 podemos observar que a susceptibilidade à doença não é justificável por variações na subpopulação de células T CD4⁺FoxP3⁺, nem na subpopulação CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, ambas já descritas como tendo uma mesma capacidade supressora (Fontenot JD *et al.*, 2005a).

Ao estudarmos as linhagens murinas, com diferentes padrões de doença associados à 3dTx, nos preocupamos em reproduzir no presente estudo a taxa de incidência de gastrite autoimune descrita na literatura. Como mostrado na Tabela 3, as linhagens susceptíveis 3dTx desenvolveram gastrite autoimune

similarmente ao percentual já descrito. A análise histopatológica do estômago foi feita levando-se em consideração os parâmetros utilizados na avaliação da gastrite, previamente descritos (Dipaolo RJ *et al.*, 2005). A figura 6 deste trabalho ilustra os graus de gastrite analisados e utilizados como referência nos nossos dados.

Nos animais susceptíveis BALB/c e C3H/He o escore de gastrite, avaliado através da histopatologia dos estômagos, varia de 0 (ausência de gastrite) até 6 (gastrite severa). Uma explicação para essa variação observada no grau de gastrite dos animais susceptíveis, poderia ser baseada numa variação proporcional na frequência das Tregs, porém, essa correlação entre o grau de gastrite e a frequência de Tregs não foi confirmada pelos nossos resultados (Figura 7). Ao analisarmos a frequência das Tregs nos linfonodos mesentéricos dos animais BALB/c e C3H/He, observamos que não houve correlação positiva entre esses dois parâmetros, ou seja, o desenvolvimento de gastrite severa não está relacionado a uma diminuição da frequência das Tregs, assim como o fato do animal não ter desenvolvido gastrite não estar relacionado ao aumento na frequência das Tregs (Figura 7).

A resposta autoimune na gastrite é direcionada por células T CD4⁺ em resposta ao autoantígeno gástrico H⁺/K⁺ATPase, presente nas células parietais do estômago (Scheinecker C *et al.*, 2002). Por esse motivo, a frequência de células patogênicas, capazes de causar gastrite, é muito maior nos linfonodos gástricos, que são os sítios drenantes do estômago. A presença dessas células também é detectável, porém em menor escala, nos linfonodos pancreáticos e mesentéricos (Suri-Payer E *et al.*, 1996). Uma observação relevante está em torno da apresentação via MHC, da H⁺/K⁺ATPase nos

linfonodos (Scheinecker C *et al.*, 2002). Mesmo sendo um autoantígeno presente em células que não expressam MHC classe II (células parietais), a $H^+K^+ATPase$ é constitutivamente captada, processada e apresentada, no contexto de MHC classe II, por DCs gástricas em condições não-inflamatórias. Todo esse estudo sobre apresentação da $H^+/K^+ATPase$ pelas DCs foi feito no modelo murino BALB/c, demonstrando, portanto, que as DCs desses animais apresentam eficientemente o autoantígeno gástrico. Ao analisar camundongos BALB/c com gastrite, os mesmos autores mostraram haver um aumento no número de DCs apresentando a $H^+/K^+ATPase$ conforme a progressão da gastrite e conseqüente perda das células parietais, sugerindo inclusive um aumento na expressão de moléculas de MHC classe II e co-estímulo nas DCs, o que se relacionaria com ativação das células T $CD4^+$ patogênicas e progressão da doença autoimune (Scheinecker C *et al.*, 2002).

Nesse contexto, a caracterização do compartimento regulatório nos linfonodos gástricos torna-se importante, já que a menor freqüência das Tregs nos linfonodos gástricos dos animais susceptíveis poderia resultar na maior expansão das células T gastritogênicas, desencadeando a doença. Porém, mais uma vez os resultados confirmaram a presença de Tregs $CD4^+FoxP3^+$ nos linfonodos gástricos de todas as linhagens analisadas, não havendo diminuição nos animais timectomizados quando comparados aos controles sham (Figura 8). Além disso, ao compararmos as linhagens susceptíveis BALB/c e C3H/He com as linhagens resistentes DBA/2 e B10.A, novamente não foi encontrada uma variação na freqüência de Tregs que se relacionasse a susceptibilidade à doença e até pelo contrário, a linhagem susceptível BALB/c tem maior freqüência de células Treg (Figura 8). Entretanto, na análise da

frequência das células T ativadas $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, observou-se um enriquecimento dessas células efetoras nos linfonodos gástricos dos animais timectomizados susceptíveis BALB/c e C3H/He, o que não se aplica aos animais resistentes das linhagens DBA/2 e B10.A, cujas frequências das células T ativadas se mantiveram constantes mesmo após a timectomia, sendo, portanto, comparáveis aos respectivos controles não timectomizados (Figura 14). Nota-se ainda que nos animais susceptíveis timectomizados a relação célula T regulatória:célula T efetora ativada está diminuída quando comparada aos controles não-timectomizados (Figura 14). Essa diminuição na relação Treg:Teff não foi observada no caso dos animais timectomizados resistentes. Numa análise mais detalhada dos linfonodos gástricos, tomando como base somente camundongos BALB/c timectomizados, verificou-se, como já citado, uma frequência de células T efetoras ativadas superior à observada nos animais controle e uma relação célula regulatória:célula efetora ativada muito inferior aos controles (Figura 12). Finalmente, se relacionarmos agora a frequência de células T efetoras ativadas nos linfonodos gástricos dos camundongos timectomizados com o escore de gastrite, verificamos que há uma correlação positiva entre esses dois parâmetros, e que relação inversa é observada ao relacionarmos a relação Treg:Teff ativada e o escore de gastrite (Figura 13). Em conjunto, os resultados sugerem que apesar da timectomia não resultar na alteração do compartimento regulatório nas diferentes linhagens analisadas, ela parece afetar, somente nas linhagens susceptíveis, a relação Treg:Teff, como consequência da maior frequência de células T ativadas em resposta à gastrite nos animais susceptíveis. Esses resultados nos fizeram pensar em duas explicações plausíveis: i) possíveis diferenças entre as

linhagens susceptíveis e resistentes, na capacidade de apresentação da $H^+/K^+ATPase$ nos linfonodos gástricos pelas DCs às células T potencialmente patogênicas presentes nos linfonodos gástricos ii) ausência de células T autorreativas específicas para o autoantígeno gástrico no repertório dos animais resistentes, enquanto que, nos animais susceptíveis, essas células estariam presentes e seriam ativadas nos linfonodos drenantes do estômago. Conforme citado anteriormente, a $H^+/K^+ATPase$ é eficientemente apresentada nos linfonodos dos animais BALB/c tanto saudáveis quanto doentes (Scheinecker C *et al.*, 2002). Apesar do nível de expressão da $H^+/K^+ATPase$ no estômago não diferir entre a linhagem susceptível BALB/c e a resistente DBA/2 (Cantó E *et al.*, 2003) não se sabe se esse autoantígeno é igualmente apresentável pelas DC gástricas em ambos animais. Não há nenhum estudo mostrando possíveis diferenças de apresentação da $H^+/K^+ATPase$ de acordo com o padrão de susceptibilidade à AIG. A diferença no repertório das células T autorreativas específicas para $H^+/K^+ATPase$ é um outro parâmetro que ainda precisa ser diretamente avaliado, uma vez que os nossos resultados, mesmo sendo indicativos de diferenças na subpopulação de células T capazes de causar a doença, não confirmam a especificidade dessas células.

Após analisarmos o compartimento regulatório dos animais adultos timectomizados e verificarmos que não havia diferenças que pudessem justificar o padrão de suscetibilidade observado entre as linhagens, nós estudamos o compartimento de Tregs nos camundongos neonatos no momento que ocorre a timectomia. Em corroboração com o trabalho publicado por Bandeira e cols, e contrapondo os resultados de Sakaguchi e cols, as células T regulatórias $CD4^+FoxP3^+$ foram detectadas na periferia (baço e

linfonodos), tanto nas linhagens BALB/c e DBA/2 com 3-4 dias de vida (susceptível e resistente, respectivamente), como também em todas as outras linhagens utilizadas nesse estudo (Figura 9 e 10). Essas células, além de expressarem FoxP3, também expressam outros marcadores utilizados na caracterização das Tregs, incluindo CTLA-4, GITR, CD25 (Figura 9). Após a detecção das Tregs na periferia, fomos averiguar a possibilidade de haver diferenças na frequência de Tregs entre as linhagens, no período neonatal. Uma menor frequência das Tregs nesse momento poderia explicar uma expansão diferencial de clones autorreativos que teriam escapado da deleção tímica, resultando num repertório enriquecido de células potencialmente patogênicas, ocasionando o desenvolvimento de autoimunidade em algumas linhagens quando adultas. Entretanto, novamente não conseguimos encontrar um padrão que se relacionasse diretamente com a susceptibilidade à gastrite autoimune pós-timectomia. Por exemplo, a linhagem BALB/c que é susceptível apresenta frequência mais elevada de Tregs tanto no baço, quanto nos linfonodos, quando comparada à linhagem DBA/2, que é resistente (Figura 11). É importante ressaltar que mesmo tendo células T regulatórias na periferia, a frequência dessas células nos neonatos, em geral, é menor do que a frequência de células encontradas nos animais adultos (Figura 11 e 4, respectivamente).

A presença de uma menor quantidade de Tregs FoxP3⁺ na periferia dos neonatos de 3 dias é, provavelmente, resultado da geração e exportação mais tardia das células T regulatórias FoxP3⁺ pelo timo durante a ontogenia, em relação as células T não-regulatórias. Essa suposição é baseada em dados da literatura que mostram que a frequência de células FoxP3⁺ no timo é

substancialmente baixa até os 3 dias de vida, aumentando gradativamente até atingir a frequência observada na fase adulta, o que ocorre na segunda semana de vida. Esse atraso na geração das Tregs parece estar associado ao fato da região medular tímica dos neonatos ser mais desorganizada e relativamente menor do que a região cortical, quando comparadas a dos adultos, ocorrendo aumento progressivo no tamanho e na organização da medula durante a ontogenia (Fontenot JD *et al.*, 2005b). Como a maioria das células Treg está localizada na região medular (Fontenot JD *et al.*, 2005a) onde provavelmente sofre seleção positiva, a deficiência quantitativa/qualitativa do compartimento regulatório no timo dos neonatos pode estar contribuindo para a redução das células FoxP3⁺ durante os primeiros dias de vida dos camundongos (Fontenot JD *et al.*, 2005b).

Nossos resultados sugerem que mesmo havendo um número menor de Tregs nos neonatos de 3 dias, essas células são capazes de proliferar substancialmente no ambiente linfopênico gerado pela timectomia neonatal (dados não mostrados), atingindo frequência similar aos animais não-timectomizados na vida adulta precocemente (dados não mostrados). Estudos feitos em modelos murinos têm demonstrado que as células T regulatórias possuem ampla capacidade proliferativa *in vivo*, havendo uma forte expansão homeostática dessas células em ambientes linfopênicos (Almeida AR *et al.*, 2005; Krupica T Jr *et al.*, 2006). Esses dados reforçam a nossa idéia de que a susceptibilidade à gastrite pós-timectomia não é determinada primariamente pela perda do compartimento de células T regulatórias, uma vez que essas células proliferam substancialmente nos animais timectomizados, até atingir um *plateau* homeostático que corresponde à frequência de células Treg

encontrada na fase adulta do animal. Não descartamos também a possibilidade de haver conversão de Tregs na periferia dos animais timectomizados a partir de células não-regulatórias. Porém, alguns estudos mostram que a proliferação homeostática das Tregs é o principal fator responsável pelo aumento do número de células Treg na periferia, havendo pouca contribuição da conversão periférica nesse contexto (Hsieh CS *et al.*, 2004; Zhang H *et al.*, 2005).

Uma outra característica que parece ser intrínseca dos timos dos neonatos e que poderia influenciar na susceptibilidade à autoimunidade, é a capacidade de exportar células imaturas tímicas, potencialmente autorreativas, durante o período neonatal. Essa idéia é apoiada por diversos estudos que incluem a detecção de determinadas subpopulações de V β , normalmente deletadas nos adultos, na periferia dos neonatos de 3-4 dias (Smith H *et al.*, 1989), escape de células T específicas para ovalbumina em neonatos do animal duplo transgênico RIPmOVAxOT (Bevan MJ, 2006), escape neonatal de células T duplo-positivas, específicas para H-Y em camundongos TCR-transgênicos machos (Bonomo A *et al.*, 1994). Especula-se que a falha na tolerância central observada no período neonatal, seja resultado da deficiência quantitativa/qualitativa da medula tímica dos neonatos (Fontenot JD *et al.*, 2005b; Bevan MJ, 2006). Como se sabe, a expressão de antígenos tecido-específicos (TSA) no timo ocorre principalmente nas células epiteliais tímicas medulares (mTEC). Sendo assim, o tamanho reduzido da medula poderia afetar não só a seleção positiva das Tregs, como dito anteriormente, mas também a eficiência da deleção das células T potencialmente autorreativas. Também é possível que a apresentação cruzada dos TSA pelas DC tímicas esteja reduzida nos neonatos, uma vez que a subpopulação de células CD8 $\alpha\alpha$,

envolvidas nos eventos de deleção, constituem somente 30% das DCs nos neonatos, comparadas aos 80% no timo de um animal adulto (Daki A *et al.*, 2004; Gallegos AM & Bevan MJ, 2006) Uma explicação adicional à exportação de células T autorreativas estaria relacionada à baixa expressão de moléculas de MHC classe II no timo neonatal, o que poderia facilitar a seleção positiva, mas ser insuficiente para uma seleção negativa adequada dos clones autorreativos (Jenkinson EJ *et al.*, 1981). Em conjunto, todos esses dados já descritos sugerem que durante o período neonatal ocorre um escape de células potencialmente autorreativas, devido à falhas no processo de seleção negativa que estão relacionadas a um timo ainda estruturalmente e funcionalmente imaturo.

Em condições fisiológicas, os emigrantes tímicos dos neonatos sofrem intensa proliferação na periferia, fenômeno conhecido como proliferação em resposta a linfopenia, ou proliferação homeostática (Freitas AA & Rocha B, 2000; Min B *et al.*, 2003). Essa proliferação acontece até alcançar o percentual de células encontrado em animais adultos. Esse fenômeno de expansão homeostática normalmente observada em camundongos neonatos, também se aplica aos neonatos timectomizados no terceiro dia de vida. Porém, a análise do TCR do repertório neonatal pós-expansão indica a presença de um repertório de células T mais limitado, o que estaria relacionado a uma expansão oligoclonal das células T nos animais timectomizados em resposta a um conjunto restrito de ligantes endógenos (La Gruta NL *et al.*, 2000).

Diante desses dados, levantamos a hipótese de que a susceptibilidade a gastrite autoimune pudesse estar relacionada à exportação diferencial entre os animais que fazem doença e os que não fazem doença, de células T

potencialmente patogênicas, do timo, durante o período neonatal que antecede a timectomia. O ambiente linfopênico favoreceria, ainda, um enriquecimento em células autorreativas oriundas da expansão de clones potencialmente patogênicos presentes no repertório do neonato. Se essa hipótese fosse verdadeira, a frequência de células T regulatórias que aparentemente é normal e suficiente para proteger o animal não-timectomizado da autoimunidade, na situação da timectomia não seria suficiente para controlar um repertório com uma frequência tão grande de células T efectoras autorreativas. De fato, ao analisarmos a população de células T presente no linfonodos gástricos dos animais adultos timectomizados, observamos um enriquecimento de células T efectoras ativadas $CD4^+CD25^+FoxP3^-$ somente nos animais susceptíveis à AIG (Figura 14), enquanto que a frequência de Tregs se manteve constante em todas as linhagens analisadas, independentemente do padrão de susceptibilidade (Figura 4). Esses resultados são somente sugestivos de um enriquecimento de clones autorreativos específicos para o autoantígeno gástrico, uma vez que a análise da especificidade dessas células não foi feita.

Ainda com o objetivo de demonstrar a importância primária da presença de um repertório efector autorreativo na determinação da susceptibilidade à AIG, nós realizamos um experimento baseado na transferência individual de células de camundongos BALB/c adultos 3dTx para receptores imunodeficientes SCID. De acordo com a literatura, a transferência de células T $CD4^+$ esplênicas totais de camundongos BALB/c adultos 3dTx ou a transferência de células T esplênicas de camundongos BALB/c normais, depletadas de células T $CD4^+CD25^+$, é capaz de induzir gastrite autoimune em receptores imunodeficientes, como *nude* e SCID (Sakaguchi S *et al*, 1995; Shevach EM,

2000). Esses dados formaram a base para a afirmação de que os camundongos timectomizados desenvolviam gastrite devido à depleção do compartimento regulatório pela timectomia neonatal. Porém, todos os experimentos foram baseados na transferência de células obtidas a partir de um *pool* de animais BALB/c timectomizados, não levando em consideração o fato de que cerca de 40% desses animais não desenvolvem gastrite autoimune pós-3dTx. Diante dessa questão, formulamos a seguinte hipótese: a principal diferença entre os BALB/c doentes e saudáveis está na presença de um repertório efetor autorreativo, exportado do timo antes da timectomia e que se tornou enriquecido devido à expansão no ambiente linfopênico neonatal, levando ao quadro de autoimunidade observado. Apesar de ambos os animais terem a mesma frequência de células Treg, os BALB/c timectomizados sem gastrite não teriam células T patogênicas capazes de induzir a doença. Ainda, por serem da mesma linhagem, não haveria diferenças na apresentação do autoantígeno nos linfonodos gástricos (Scheinecker C *et al.*, 2002). A transferência de células foi realizada individualmente, tendo para cada doador BALB/c 3dTx um receptor SCID. Em alguns casos as células T CD4⁺ infundidas foram depletadas de células T regulatórias. Em concordância com a nossa hipótese, os resultados obtidos nesse trabalho mostram que somente as células oriundas de doadores que desenvolveram gastrite, foram capazes de transferir doença para os receptores imunodeficientes (Figura 15). As células T oriundas de camundongos timectomizados saudáveis, mesmo após depleção das células T regulatórias, não foram capazes de transferir doença (Figura 15). Assim, a presença de um repertório autorreativo patogênico enriquecido, que

provavelmente escapou da seleção negativa no período neonatal, parece ser crucial e definitivo para o desenvolvimento de autoimunidade.

A obtenção de resultados indicativos de diferenças no repertório efetor autorreativo entre BALB/c doentes e não-doentes, nos fez pensar qual seria o mecanismo capaz de justificar a divergência observada entre esses animais BALB/c isogênicos com relação ao padrão de doença observado. Uma possibilidade seria o escape de células autorreativas, específicas para o autoantígeno $H^+/K^+ATPase$, no período neonatal, com base no nível de expressão desse autoantígeno no timo. A correlação entre o nível de expressão de um determinado autoantígeno no timo e a susceptibilidade à autoimune, tem sido descrita em vários trabalhos, em diferentes modelos de doença (Pugliese A *et al.*, 1997; Egwuagu CE *et al.*, 1997; Klein L *et al.*, 2000; De Voss J *et al.*, 2006; Taubert R *et al.*, 2007). De acordo com esses trabalhos, um nível alto de expressão do autoantígeno no timo favoreceria a deleção dos clones autorreativos, resultando na ausência ou na menor frequência desses clones na periferia, o que tornaria o camundongo resistente à indução de autoimunidade órgão-específica. Sendo assim, espera-se que uma menor expressão $H^+/K^+ATPase$ resulte em escape de células T efectoras autorreativas durante o período neonatal, levando ao desenvolvimento de gastrite pós-timectomia.

A $H^+/K^+ATPase$, autoantígeno reconhecido pelas células T gastritogênicas, é constituída pela subunidade α e pela subunidade β . Ambas as subunidades parecem contribuir para patogênese da gastrite, uma vez que anticorpos específicos para as 2 subunidades são igualmente detectáveis no soro dos animais doentes (Jones CM *et al.*, 1991; Alderuccio F *et al.*, 1997).

Camundongos que transgenicamente superexpressam a subunidade β no timo não desenvolvem gastrite autoimune pós-timectomia neonatal, nem mesmo quando são imunizados com H^+/K^+ ATPase gástrica (Alderuccio F *et al.*, 1993; Alderuccio F *et al.*, 1997). Dados recentes mostram que a expressão tímica da $\beta H^+/K^+$ ATPase resulta não só na tolerância à subunidade $\beta H^+/K^+$ ATPase, como também induz tolerância à subunidade α (Allen S *et al.*, 2005). Essa observação indica o motivo pelo qual a superexpressão de $\beta H^+/K^+$ ATPase no timo é capaz de prevenir gastrite autoimune, uma vez que tanto células anti- $\beta H^+/K^+$ ATPase quanto células anti- $\alpha H^+/K^+$ ATPase, contribuem para o desenvolvimento da doença (vanDriel IR, 2005). Além disso, camundongos deficientes na expressão da cadeia β da H^+/K^+ ATPase no timo possuem maior título de aut anticorpos para a ATPase gástrica, apresentam uma resposta proliferativa aumentada *in vitro* em resposta a este antígeno e ainda as células esplênicas desses animais deficientes são capazes de transferir doença para receptores imunodeficientes, sem necessidade de depleção das células Treg, o que não acontece com animais que expressam a cadeia β da H^+/K^+ ATPase endógena (Laurie KL *et al.*, 2002). Esses dados mostram que os animais deficientes para cadeia β da H^+/K^+ ATPase possuem um repertório com maior frequência de células T anti- $\beta H^+/K^+$ ATPase, provavelmente devido a falhas na tolerância central, sugerindo assim um papel imunodominante para $\beta H^+/K^+$ ATPase na patogênese da doença (Laurie KL *et al.*, 2002).

Diante do exposto acima nosso passo seguinte foi quantificar, por PCR quantitativo em Tempo Real, a expressão da $\beta H^+/K^+$ ATPase nos timos de BALB/c, buscando correlacionar o nível de transcrição do autoantígeno gástrico com a susceptibilidade à doença pós-timectomia. Os timos foram coletados

individualmente no momento da timectomia e, após o resultado do qRT-PCR, cada amostra de timo de neonato foi associada ao respectivo animal adulto identificado na pata, cujo estômago foi submetido posteriormente à histopatologia para análise do desenvolvimento de gastrite.

A correlação entre o nível de transcrição da $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ no timo e o desenvolvimento de gastrite autoimune foi confirmada nas amostras analisadas nesse estudo (Figura 17). Nota-se que quanto maior é o nível de expressão do autoantígeno no timo, menor é o grau de gastrite desenvolvido pelo animal. Esses resultados são extremamente sugestivos de que a predisposição a gastrite autoimune, ao menos na linhagem BALB/c, é resultado de uma diferença na expressão intratímica da $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$. Provavelmente, a baixa expressão desse antígeno resulta no escape de células T autorreativas anti- $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ no período neonatal, que proliferam e causam gastrite na fase adulta.

Além de não deletar eficientemente as células anti- $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, a baixa expressão tímica do antígeno poderia resultar na ausência de seleção positiva das Treg, uma vez que essas células requerem a presença do antígeno específico no timo para serem geradas (Jordan MS. *et al.*, 2001; Apostolou I *et al.*, 2002). Entretanto, células regulatórias geradas em animais normais ou deficientes para $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ ou para $\alpha\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, ou ainda para ambas as cadeias, são igualmente capazes de inibir a proliferação e suprimir desenvolvimento de gastrite quando células T CD4^+ policlonais ou $\alpha\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ -específicas são transferidas para camundongos atímicos *nude* (Zwar TD *et al.*, 2006). Em concordância com esses resultados, um trabalho recente mostra que a perda da expressão tímica de um autoantígeno do olho,

devido à ausência de AIRE, é suficiente para causar uveíte autoimune (DeVoss J *et al.*, 2006). Ainda, as células geradas na ausência desse antígeno, são capazes de suprimir a doença quando transferidas (Grajewski RS *et al.*, 2006). Esses dados sugerem que, mesmo na ausência do antígeno no timo, as células Treg geradas são capazes de inibir eficientemente as células autorretivas, indutoras de doença.

Apesar da detecção da expressão da $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ no timo ser controversa, nós conseguimos detectá-la nesse trabalho (Figura 16). A diferença de resultados provavelmente foi devido à escolha do método de detecção, já que a maioria dos trabalhos utiliza RT-PCR ou DNA *microarrays*, duas técnicas sabidamente menos sensíveis do que o PCR quantitativo em Tempo Real, utilizado no nosso estudo (Derbinski J *et al.*, 2001; Alderuccio F *et al.*, 1993, Alderuccio F *et al.*, 1997; Cantó E *et al.*, 2003). Nossos experimentos mostram que, mesmo tendo, de maneira geral, baixo nível de expressão ($\text{Ct} \pm 33,5$), a $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ é claramente suficiente para induzir tolerância à gastrite. Variações na expressão da $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$, mesmo que em baixos níveis, se mostraram capazes de tornar o camundongos susceptíveis ao desenvolvimento de doença pós-timectomia (Figura 17). Recentemente, Kyewski e cols analisaram a variabilidade inter-individual da expressão vários TSA, incluindo insulina (diabetes), proteína proteolipídica (esclerose múltipla), antígeno retinóico (uveíte) e $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ (gastrite) em mTECs purificadas de 26 amostras individuais de timo humano. De acordo com os autores, alguns autoantígenos como insulina e $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ foram altamente variáveis dentro das amostras analisadas, se correlacionando diretamente com a expressão de AIRE (Taubert R *et al.*, 2007). Assumindo uma relação direta entre os níveis de

transcrição de AIRE e os seus autoantígenos-alvo, a regulação da molécula AIRE ao nível de transcrição já seria um fator importante na determinação da tolerância individual à variação na expressão de autoantígenos no timo. Pouco se sabe sobre a forma como ocorre a regulação da transcrição de AIRE, assim como os fatores exatos que influenciam a variação observada na expressão promíscua de genes no timo. Várias observações recentes sugerem que tanto fatores genéticos (polimorfismos, por exemplo), como também mecanismos epigenéticos como, por exemplo, hipometilação de regiões promotoras e modificação da cromatina, parecem estarem envolvidos no controle da expressão promíscua de genes nas mTEC assim como no nível de transcrição de AIRE (Gotter J & Kyewski B, 2004).

No nosso trabalho, a análise da expressão da $\beta\text{H}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ no timo só foi feita em camundongos isogênicos BALB/c, sendo, portanto, todos geneticamente idênticos. Assim, ainda fica difícil explicar as variações observadas no nível de expressão baseando-se somente em diferenças genéticas. Possivelmente fatores ambientais, como infecções microbianas e mimetismo antigênico, ou até mesmo fatores estocásticos de regulação gênica podem estar envolvidos no fenômeno de variabilidade observado nos nossos resultados (D'Elia MM *et al.*, 2004; Murrack P *et al.*, 2001).

Concluindo, o presente trabalho demonstra que o desenvolvimento de gastrite autoimune – como consequência da timectomia neonatal – não está relacionada à perda das células T regulatórias, uma vez que essas células se mantêm preservadas nos animais adultos timectomizados. O baixo nível de expressão do autoantígeno no timo e, provavelmente, o escape de células T autorreativas do timo para periferia parecem ser os principais mecanismos

relacionado à susceptibilidade à gastrite autoimune observada nos camundongos BALB/c. Estudos posteriores serão necessários para confirmar a presença de células autorreativas gastritogênicas no repertório neonatal de BALB/c e para verificar a importância destes mecanismos na determinação da resistência versus susceptibilidade em outras linhagens de camundongos.

VI. Referências Bibliográficas

1. Alderuccio F, Gleeson PA, Berzins SP, Martin M, Van Driel IR, Toh BH. Expression of the gastric H/K ATPase α subunit in the thymus may explain the dominant role of the β -subunit in the pathogenesis of autoimmune gastritis. *Autoimmunity*. 25, 167-75 (1997).
2. Alderuccio F, Toh BH, Tan SS, Gleeson PA, van Driel IR. An autoimmune disease with multiple molecular targets abrogated by the transgenic expression of a single autoantigen in the thymus. *J Exp Med*. 178, 419-26 (1993).
3. Alferink J, Tafuri A, Vestweber D, Hallmann R, Hammerling GJ, Arnold B. Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking. *Science*. 282, 1338-41 (1998).
4. Allen S, Read S, DiPaolo R, McHugh RS, Shevach EM, Gleeson PA, van Driel IR. Promiscuous thymic expression of an autoantigen gene does not result in negative selection of pathogenic T cells. *J Immunol*. 175, 5759-64 (2005).
5. Almeida AR, Rocha B, Freitas AA, Tanchot C. Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells. *Semin Immunol*. 17, 239-49 (2005).

6. Anderson G, Moore NC, Owen JJT, Jenkinson EJ. Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol.* 14, 73-99 (1996).
7. Anderson MS, Venanzi ES, Chen Z, Berzins SP, Benoist C, Mathis D. The cellular mechanism of Aire control of T cell tolerance. *Immunity.* 23, 227-39 (2005).
8. Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, Chen Z, Berzins SP, Turley SJ, von Boehmer H, Bronson R, Dierich A, Benoist C, Mathis D. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science.* 298,1395-401 (2002).
9. Apostolou I & Von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naïve T cells. *J Exp Med.* 199, 1401-08 (2004).
10. Apostolou I, Sarukhan A, Klein L, von Boehmer H. Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen. *Nat Immunol.* 3, 756-63 (2002).
11. Asano M, Sakaguchi N, Sakaguchi S. Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *J Exp Med.* 184, 387- 96 (1996).
12. Aschenbrenner K, D'Cruz LM, Vollmann EH, Hinterberger M, Emmerich J, Swee LK, Rolink A, Klein L. Selection of FoxP3⁺ regulatory T cells specific

for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells. *Nat Immunol.* 8, 351-8 (2007).

13. Baldwin KK, Trenchak BP, Altman JD, Davis MM. Negative selection of T cells occurs throughout thymic development. *J Immunol.* 15, 689-98 (1999).
14. Barcinski MA, Blake JT, Rosenthal AS. Determinant selection is a macrophage dependent immune response gene function. *Nature.* 276, 156-8 (1977).
15. Betterle C, Greggio NA, Volpato M. Clinical review 93: Autoimmune polyglandular syndrome type 1. *J Clin Endocrinol Metab.* 83, 1049-55 (1998).
16. Billiau A & Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *J Leukoc Biol.* 70, 849-60 (2001).
17. Bjorses P, Aaltonen J, Horelli-Kuitunen N, Yaspo ML, Peltonen L. Gene defect behind APECED: a new clue to autoimmunity. *Hum Mol Genet.* 7, 1547-53 (1998).
18. Bonomo A & Matzinger P. Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance. *J Exp Med.* 177, 1153-64 (1993).

19. Bonomo A, Kehn PJ, Payer E, Rizzo L, Cheever AW, Shevach EM. Pathogenesis of post-thymectomy autoimmunity. Role of syngeneic MLR-reactive T cells. *J Immunol.* 154, 6602-11 (1995).
20. Bonomo A, Kehn PJ, Shevach EM. Premature escape of double-positive thymocytes to the periphery of young mice. Possible role in autoimmunity. *J Immunol.* 152, 1509-14 (1994).
21. Bosco N, Agenes F, Rolink AG, Ceredig R. Peripheral T cell lymphopenia and concomitant enrichment in naturally arising regulatory T cells: the case of the pre-Talpha gene-deleted mouse. *J Immunol.* 177, 5014-23 (2006).
22. Bouneaud C, Kourilsky P, Bousso P. Impact of negative selection on the T cell repertoire reactive to a self-peptide: a large fraction of T cell clones escapes clonal deletion. *Immunity.* 13, 829–40 (2000).
23. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet.* 27, 68-73 (2001).
24. Canto E, Vidal S, Rodríguez-Sánchez JL. HK-ATPase expression in the susceptible BALB/c and the resistant DBA/2 strains of mice to autoimmune gastritis. *Autoimmunity.* 36, 375-283 (2003).

25. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor FoxP3. *J Exp Med.* 198, 1875-86 (2003).
26. Dakic A, Shao QX, D'Amico A, O'Keeffe M, Chen WF, Shortman K, Wu L. Development of the dendritic cell system during mouse ontogeny. *J Immunol.* 15, 1018-27 (2004).
27. De Silva HD, Alderuccio F, Toh BH, van Driel IR, Gleeso PA. Defining T cell receptors which recognise the immunodominant epitope of the gastric autoantigen, the H/K ATPase beta-subunit. *Autoimmunity.* 33, 1-14 (2000).
28. De Silva HD, Van Driel IR, La Gruta N, Toh BH, Gleeson PA. CD4⁺ T cells, but not CD8⁺ T cells, are required for the development of experimental autoimmune gastritis. *Immunology.* 93, 405-8 (1998).
29. D'Elios MM, Appelmelk BJ, Amedei A, Bergman MP, Del Prete G. Gastric autoimmunity: the role of Helicobacter pylori and molecular mimicry. *Trends Mol Med.* 10, 316-23 (2004).
30. Derbinski J, Gabler J, Brors B, Tierling S, Jonnakuty S, Hergenhausen M, Peltonen L, Walter J, Kyewski B. Promiscuous gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. *J Exp Med.* 202, 33-45 (2005).

31. Derbinski J, Schulte A, Kyewski B, Klein L. Promiscuous gene expression in medullary thymic epithelial cells mirrors the peripheral self. *Nat Immunol.* 2, 1032-9 (2001).
32. DeVoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, Chang H, Caspi RR, Fong L, Anderson MS. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med.* 27, 2727-35 (2006).
33. Dipaolo RJ, Glass DD, Bijwaard KE, Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ T cell prevent the development of organ-specific autoimmune disease by inhibiting the differentiation of autoreactive effector T cells. *J Immunol.* 175, 7135-42 (2005).
34. Dudley EC, Petrie HT, Shah LM, Owen MJ, Hayday AC. T cell receptor beta chain gene rearrangement and selection during thymocyte development in adult mice. *Immunity.* 1, 83-93 (1994).
35. Dujardin HC, Burlen-Defranoux O, Boucontet L, Vieira P, Cumano A, Bandeira A. Regulatory potential and control of FoxP3 expression in newborn CD4⁺ T cells. *PNAS.* 101, 14473-8 (2004).
36. Egwuagu CE, Charukamnoetkanok P, Gery I. Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunol.* 159, 3109-12 (1997).

37. Fisson S, Darrasse-Jeze G, Litvinova E, Septier F, Klatzmann D, Liblau R, Salomon BL. Continuous activation of autoreactive CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in the steady state. *J Exp Med.* 198, 737-46 (2003).
38. Fontenot JD, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Developmental regulation of FoxP3 expression during ontogeny. *J Exp Med.* 202, 901-6 (2005b).
39. Fontenot JD, Gavin MA and Rudensky AY. FoxP3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 4, 330-6 (2003).
40. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor FoxP3. *Immunity.* 22, 329-41 (2005a).
41. Freitas AA. & Rocha B. Population biology of lymphocytes: the flight for survival. *Annu Rev Immunol.* 18, 83-111 (2000).
42. Gallegos AM & Bevan MJ. Central tolerance to tissue-specific antigens mediated by direct and indirect antigen presentation. *J Exp Med.* 200, 1039-49 (2004).
43. Gallegos AM, Bevan MJ. Central tolerance: good but imperfect. *Immunol Rev.* 209, 290-6 (2006).

44. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky, AY. FoxP3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 445, 771-5 (2007).
45. Gershon RK & Kondo K. Infectious immunological tolerance. *Immunology*. 18, 723-35 (1970).
46. Gill J, Malin M, Sutherland J, Gray D, Hollander G, Boyd R. Thymic generation and regeneration. *Immunol Rev*. 195, 28-50 (2003).
47. Gleeson P, Toh BH, Van Driel, Ian R. Organ-specific autoimmunity induced by lymphopenia. *Immunol Rev*. 149, 97-125 (1996).
48. Gotter J & Kyewski B. Regulating self-tolerance by deregulating gene expression. *Curr Opin Immunol*. 16, 741-5 (2004).
49. Gotter J, Brors B, Hergenahn M, Kyewski B. Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes co-localized in chromosomal clusters. *J Exp Med*. 199, 155-66 (2004).
50. Grajewski RS, Silver PB, Agarwal RK, Su SB, Chan CC, Liou GI, Caspi RR. Endogenous IRBP can be dispensable for generation of natural

CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells that protect from IRBP-induced retinal autoimmunity. *J Exp Med.*17, 851-6 (2006).

51. Hogquist KA, Jameson SC, Heath WR, Howard JL, Bevan MJ, Carbone FR. T cell receptor antagonist peptides induce positive selection. *Cell.* 76, 17-27 (1994).
52. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor FoxP3. *Science.* 299, 1057-61 (2003).
53. Hsieh CS, Liang Y, Tyznik AJ, Self SG, Liggitt D, Rudensky AY. Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺ CD4⁺ T cell receptors. *Immunity.* 21, 267-77 (2004).
54. Hsieh CS, Zheng Y, Liang Y, Fontenot JD, Rudensky AY. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat Immunol.* 7, 401-10 (2006).
55. Jenkins MK & Schwartz RH. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J Exp Med.* 165, 302-19 (1987).
56. Jenkinson EJ, Van Ewijk W & Owen JJ. Major histocompatibility complex antigen expression on the epithelium of the developing thymus in normal and nude mice. *J Exp Med.* 153, 280-92 (1981).

57. Jiang W, Anderson MS, Bronson R, Mathis D, Benoist C. Modifier loci condition autoimmunity provoked by Aire deficiency. *J Exp Med.* 19, 805-15 (2005).
58. Jones CM, Callaghan JM, Gleeson PA, Mori Y, Masuda T, Toh BH. The parietal cell autoantigens recognized in neonatal thymectomy-induced murine gastritis are the alpha and beta subunits of the gastric proton pump. *Gastroenterology.* 101, 287-94 (1991).
59. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Holenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2, 301-6 (2001).
60. Kappler JW, Roehm N, Marrack PT cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell.* 49, 273-80 (1987).
61. Katz JD, Wang B, Haskins K, Benoist C, Mathis D. Following a diabetogenic T cell from genesis through pathogenesis. *Cell.* 74, 1089-100 (1993).
62. Khattri R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 4, 337-42 (2003).

63. Kisielow, P, Bluthmann, H, Staerz, UD, Steinmetz, M & von Boehmer, H. Tolerance in T-cell-receptor transgenic mice involves deletion of nonmature CD4⁺8⁺ thymocytes. *Nature*. 333, 742-6 (1988).
64. Klein L & Kyewski B. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity: *J Mol Med*. 78, 483-94 (2000).
65. Klein L, Khazaie K, von Boehmer H. In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro. *PNAS*. 22, 8886-91 (2003).
66. Klein L, Klugmann M, Nave KA, Tuohy VK, Kyewski B. Shaping of the autoreactive T cell repertoire by a splice variant of self protein expressed in thymic epithelial cells. *Nat Med*. 6, 56-61 (2000).
67. Kojima A & Prehn RT. Genetic susceptibility to post-thymectomy autoimmune diseases in mice. *Immunogenetics* 14, 15-27 (1981).
68. Kojima A, Taguchi O, Nishizuka Y. Experimental production of possible autoimmune gastritis followed by macrocytic anemia in athymic nude mice. *Lab Invest*. 42, 387-95 (1980).

69. Kojima A, Tanaka-Kojima Y, Sakakura T, Nishizuka Y. Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice. *Lab Invest.* 34, 550-7 (1976).
70. Krupica T Jr, Fry TJ, Mackall CL. Autoimmunity during lymphopenia: a two-hit model. *Clin Immunol.* 120, 121-8 (2006).
71. Kyewski B & Derbinski J. Self-representation in the thymus: An extended view. *Nat Rev Immunol.* 4, 688-98 (2004).
72. La Gruta NL, van Driel IR, Gleeson P. Peripheral T cell expansion in lymphopenic mice results in a restricted T cell repertoire. *Eur J Immunol.* 30, 3380-6 (2000).
73. Laurie KL, Van Driel IR, Zwar TD, Barrett SP, Gleeson PA. Endogenous H/K ATPase beta subunit promotes T cell tolerance to the immunodominant gastritogenic determinant. *J Immunol.* 169, 2361-7 (2002).
74. Lin W, Haribhai D, Relland LM, Truong N, Carlson MR, Williams CB, Chatila TA. Regulatory T cell development in the absence of functional FoxP3. *Nat Immunol.* 8, 359-68 (2007).
75. Liston A, Gray DH, Lesage S, Fletcher AL, Wilson J, Webster KE, Scott HS, Boyd RL, Peltonen L, Goodnow CC. Gene dosage--limiting role of Aire

in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity. *J Exp Med.* 18, 1015-26 (2004).

76. Liston A, Lesage S, Wilson J, Peltonen L, Goodnow CC. Aire regulates negative selection of organ-specific T cells. *Nat Immunol.* 4, 50-4 (2003).
77. Marrack P, Kappler J, Kotzin BL. Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med.* 7, 899-905 (2001).
78. Marson A, Kretschmer K, Frampton GM, Jacobsen ES, Polansky JK, Maclsaac KD, Levine SS, Fraenkel E, von Boehmer H, Young RA. FoxP3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation. *Nature.* 445, 931-5 (2007).
79. Min B, McHugh R, Sempowski GD, Mackall C, Foucras G, Paul WE. Neonates support lymphopenia-induced proliferation. *Immunity.* 18, 131-40 (2003).
80. Mori Y, Hosono M, Murakami K, Katoh H, Yoshikawa Y, Kuribayashi K, Kannagi R, Sakai M, Okuma M, Masuda T. Genetic studies on experimental autoimmune gastritis induced by neonatal thymectomy using recombinant inbred strains between a high-incidence strain, BALB/c, and a low-incidence strain, DBA/2. *Clin Exp Immunol.* 84, 145-52 (1991).

81. Nishizuka Y & Sakakura T. Thymus and reproduction: sex-linked dysgenesis of gonad after neonatal thymectomy in mice. *Science*. 166, 753-55 (1969).
82. Pacholczyk R. Origin and T cell receptor diversity of FoxP3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells. *Immunity*. 25, 249-59 (2006).
83. Palmer E. Negative selection - clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. *Nat Rev Immunol*. 3, 383-91 (2003).
84. Pennington DJ, Silva-Santos B, Silberzahn T, EscÃrcio-Correia M, Woodward MJ, Roberts SJ, Smith AL, Dyson PJ, Hayday AC. Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells. *Nature*. 444,1073-7 (2006).
85. Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK. Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. *Immunity*. 6, 411-7 (1997).
86. Perheentupa J. Autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy (APECED). *Horm Metab Res*. 28, 353-6 (1996).
87. Peterson P, Nagamine K, Scott H, Heino M, Kudoh J, Shimizu N, Antonarakis SE, Krohn KJ. et al. APECED: a monogenic autoimmune

disease providing new clues to self-tolerance. *Immunol Today*. 19, 384-6 (1998).

88. Powrie F & Mason DW. OX-22^{high} CD4⁺ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset. *J Exp Med*. 172, 1701-1708 (1990).
89. Pugliese A, Zeller M, Fernandez A, Zalcberg LJ, Bartlett RJ, Ricordi C, Pietropaolo M, Eisenbarth GS, Bennett ST, Patel DD. The insulina gene is transcribed in the human thymus and transcription levels correlated with allelic variation at the INS VNTR-IDD3 susceptibility locus for type 1 diabetes. *Nat Genet*. 15, 293-297 (1997).
90. Ramsey C, Winqvist O, Puhakka L, Halonen M, Moro A, Kampe O, Eskelin P, Pelto-Huikko M, Peltonen L. Aire deficient mice develop multiple features of APECED phenotype and show altered immune response. *Hum Mol Genet*. 15, 397-409 (2002).
91. Robey E & Fowlkes BJ. Selective events in T cell development. *Annu Rev Immunol*. 12, 675-705 (1994).
92. Sakaguchi S, Fukuma K, Kuribayashi K, Masuda T. Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance;

deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease. *J Exp Med.* 161, 72-87(1985).

93. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 155, 1151-64 (1995).
94. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T. Immunologic tolerance maintained by CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol Rev.* 182,18-32 (2001).
95. Sakaguchi S, Takahashi T, Nishizuka Y. Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis. *J Exp Med.* 156, 1577-86 (1982).
96. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 22, 531-62 (2004).

97. Scheinecker C, McHugh R, Shevach EM, Germain RN. Constitutive presentation of a natural tissue autoantigen exclusively by dendritic cells in the draining lymph node. *J Exp Med.* 21, 1079-90 (2002).
98. Schwartz R. Immunological Tolerance, in *Fundamental Immunology*. Edited by William E. Paul. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 4th edition (2003).
99. Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity. *Annu Rev Immunol.* 18, 423-49 (2000).
100. Shevach EM. CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol.* 2, 389-400 (2002).
101. Siggs OM, Makaroff LE, Liston A. The why and how of thymocyte negative selection. *Curr Opin Immunol.* 18, 175-83 (2006).
102. Silveira PA, Baxter AG, Cain WE, van Driel IR. A major linkage region on distal chromosome 4 confers susceptibility to mouse autoimmune gastritis. *J Immunol.* 162, 5106-11 (1999).
103. Silveira PA, Wilson WE, Esteban LM, Jordan MA, Hawke CG, van Driel IR, Baxter AG. Identification of the Gasa 3 and Gasa 4 autoimmune gastritis susceptibility genes using congenic mice and partitioned, segregative and interactions analyses. *Immunogenetics.* 53, 741-50 (2001).

104. Singer GG & Abbas AK. The Fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice. *Immunity*. 1, 365-71 (1994).
105. Smith H, Chen IM, Kubo R, Tung KS. Neonatal thymectomy results in a repertoire enriched in T cells deleted in adult thymus. *Science*. 18, 749-52 (1989).
106. Smith H, Sakamoto Y, Kasai K, Tung KS. Effector and regulatory cells in autoimmune oophoritis elicited by neonatal thymectomy. *J Immunol*. 147, 2928-33 (1991).
107. Sospedra M, Ferrer-Francesch X, Domanguez O, Juan M, Foz-Sala M, Pujol-Borrell R. Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens. *J Immunol*. 161, 5918-29 (1998).
108. Steinman, L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell*. 85, 299-302 (1996).
109. Su MA & Anderson MS. Aire: an update. *Curr Opin Immunol*. 16, 746-52 (2004).

110. Sugihara S, Izumi Y, Yoshioka T, Yagi H, Tsujimura T, Tarutani O, Kohno Y, Murakami S, Hamaoka T, Fujiwara H. Autoimmune thyroiditis induced in mice depleted of particular T cell subsets. I. Requirement of Lyt 1 dull L3T4 bright normal T cells for the induction of thyroiditis. *J Immunol.* 141, 105-13 (1988).
111. Surh CD & Sprent J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus. *Nature.* 372, 100-3 (1994).
112. Suri-Payer E, Kehn PJ, Cheever AW, Shevach EM. Pathogenesis of Post-thymectomy autoimmune gastritis. Identification of Anti-H/K adenosine triphosphatase- reactive T cells. *J Immunol.* 157,1799-805 (1996).
113. Suri-Payer E, Wei K, Tung K. The Day-3 Thymectomy Model for Induction of Multiple Organ-Specific Autoimmune Disease, *in Current Protocols in Immunology.* Edited by Richard Coico. John Wiley & Sons, Inc. Online edition. (1999).
114. Suri-Payer E, Amar AZ, McHugh R, Natarajan K, Margulies DH, Shevach EM. Post-thymectomy autoimmune gastritis: fine specificity and pathogenesis of anti-H/K ATPase-reactive T cells. *Eur J Immunol.* 29, 669-77 (1999).

115. Takahama Y. Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol.* 6, 127-35 (2006).
116. Takahashi T, Kuniyasu Y, Toda M, Sakaguchi N, Itoh M, Iwata M, Shimizu J, Sakaguchi S. Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state. *Int Immunol.* 10, 1969-80 (1998).
117. Taubert R, Schwendemann J, Kyewski B. Highly variable expression of tissue-restricted self-antigens in human thymus: implications for self tolerance and autoimmunity. *Eur J Immunol.* 37, 838-48 (2007).
118. Thornton AM & Shevach EM. Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific. *J Immunol.* 164, 182-90 (2000).
119. Toh BH, SENTRY JW, Alderuccio F. The causative H⁺/K⁺ ATPase antigen in the pathogenesis of autoimmune gastritis. *Immunol Today.* 21, 348-54 (2000).
120. Uchida D, Hatakeyama S, Matsushima A, Han H, Ishido S, Hotta H, Kudoh J, Shimizu N, Doucas V, Nakayama KI, Kuroda N, Matsumoto M. AIRE functions as an E3 ubiquitin ligase. *J Exp Med.* 199, 167-72 (2004).

121. van Driel IR, Baxter AG, Laurie KL, Zwar TD, La Gruta NL, Judd LM, Scarff KL, Silveira PA, Gleeson PA. Immunopathogenesis, loss of T cell tolerance and genetics of autoimmune gastritis. *Autoimmun Rev.* 1, 290-7(2002).
122. van Driel IR, Read S, Zwar TD, Gleeson PA. Shaping the T cell repertoire to a bona fide autoantigen: lessons from autoimmune gastritis. *Curr Opin Immunol.* 17, 570-6 (2005).
123. Van Santen HM, Benoist C, Mathis D. Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells. *J Exp Med.* 200, 1221-30 (2004).
124. Van van Meerwijk JP, Marguerat S, Lees RK, Germain RN, Fowlkes BJ, MacDonald HR. Quantitative impact of thymic clonal deletion on the T cell repertoire. *J Exp Med.* 185, 377-83 (1997).
125. Venanzi ES, Benoist C & Mathis D. Good riddance: Thymocyte clonal deletion prevents autoimmunity. *Curr Opin Immunol.* 16, 197-202 (2004).
126. Vogel A, Strassburg CP, Obermayer-Straub P, Brabant G, Manns MP. The genetic background of autoimmune polyendocrinopathy-candidiasis-ectodermal dystrophy and its autoimmune disease components. *J Mol Med.* 80, 201-11 (2002).

127. von Boehmer H, Aifantis I, Gounari F, Azogui O, Haughn L, Apostolou I, Jaeckel E, Grassi F, Klein L. Thymic selection revisited: how essential is it? *Immunol Rev.* 191, 62-78 (2003).
128. von Boehmer H. Mechanisms of suppression by suppressor T cells. *Nat Immunol.* 6, 338-44 (2005).
129. Walker, LSK. & Abbas AK. The enemy within: Keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol.* 2, 13-9 (2002).
130. Watanabe N, Wang YH, Lee HK, Ito T, Wang YH, Cao W, Liu YJ. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in human thymus. *Nature.* 436, 1181-85 (2005).
131. Wekerle H, Bradl M, Linington C, Kaab G, Kojima K. The shaping of the brain-specific T lymphocyte repertoire in the thymus. *Immunol Rev.* 149, 231-43 (1996).
132. Wu Y, Borde M, Heissmeyer V, Feuerer M, Lapan AD, Stroud JC, Bates DL, Guo L, Han A, Ziegler SF, Mathis D, Benoist C, Chen L, Rao A. FoxP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT. *Cell.* 126, 375-387 (2006).

133. Zehn D & Bevan MJ. T cells with low avidity for a tissue-restricted antigen routinely evade central and peripheral tolerance and cause autoimmunity. *Immunity*. 25, 261-70 (2006).
134. Zhang H, Chua KS, Guimond M, Kapoor V, Brown MV, Fleisher TA, Long LM, Bernstein D, Hill BJ, Douek DC, Berzofsky JA, Carter CS, Read EJ, Helman LJ, Mackall CL. Lymphopenia and interleukin-2 therapy alter homeostasis of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Med*. 11, 1238-43 (2005).
135. Zheng Y & Rudensky A. FoxP3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol*. 5, 457-62 (2007a).
136. Zheng Y, Josefowicz SZ, Kas A, Chu TT, Gavin MA, Rudensky AY. Genome-wide analysis of FoxP3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature*. 445, 936-40 (2007b).
137. Zinkernagel RM. Immunology taught by viruses. *Science*. 271, 173-8 (1996).
138. Zwar TD, Read S, van Driel IR, Gleeson PA. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells inhibit the antigen-dependent expansion of self-reactive T cells in vivo. *J Immunol*. 176, 1609-17 (2006).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)