

Jean Pierre Schatzmann Peron

**O FENÔMENO DA TOLERÂNCIA ORAL E A REGULAÇÃO DE CÉLULAS
PATOGENICAS Th17 NO MODELO DE ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL
AUTO-IMUNE.**

Tese de Doutorado Apresentada ao Instituto
de Ciências Biomédicas da Universidade de
São Paulo Para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

São Paulo

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Universidade de São Paulo

Jean Pierre Schatzmann Peron

**O FENÔMENO DA TOLERÂNCIA ORAL E A REGULAÇÃO DE CÉLULAS
PATOGENICAS Th17 NO MODELO DE ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL
AUTO-IMUNE.**

Tese de Doutorado Apresentada Ao Instituto
de Ciências Biomédicas Da Universidade de
São Paulo Para obtenção do Título de Doutor
em Ciências.

Área de Concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo

São Paulo

2008

**“ Ao meu pai Peron e mãe Sandra com carinho.
Meus Irmãos Johnny e Jennifer com afeto.
À minha avó Norma com respeito”.**

**O presente trabalho foi realizado com auxílio da FAPESP, CAPES e
*Brigham and Women's Hospital.***

*“Algumas palavras duras em voz mansa te golpearam.
Nunca, nunca cicatrizam.
À sombra de um mundo errado,
Murmuraste um protesto tímido.
Mas virão outros...”*
(Carlos Drummond de Andrade)

*“...Resta esse eterno morrer na cruz dos seus braços,
e esse eterno ressuscitar para ser re-crucificado.
Resta esse diálogo cotidiano com a morte,
Esse fascínio pelo momento à vir.
Quando emocionada,
ela virá me abrir a porta como uma velha amante,
sem saber que é minha mais nova namorada”.*
(Vinicius de Moraes)

AGRADECIMENTOS

Agradeço não de forma hierárquica mas sim de forma sincera, primeiramente ao Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo, que não só me aceitou de braços abertos em seu laboratório, como sempre me incentivou e me depositou confiança a despeito das inúmeras “pedras no caminho” durante esses 4 anos. Meu sincero muito obrigado.

Ao Prof. Dr. Howard L. Weiner que também me proporcionou uma experiência única e me permitiu ficar por um ano em seu laboratório na Harvard Medical School em Boston, MA realizando grande parte deste trabalho.

Agradeço ao Prof. Dr. Edécio Cunha-Neto, Prof. Dra. Ana Caetano de Faria e Profa. Dr. Karina Bastos, membros de minha banca de qualificação pelas críticas e sugestões.

Agradeço com toda as minhas forças ao meu pai Peron, minha mãe Sandra, minha irmã Jennifer, meu irmão Johnny e minha avó Norma. Os mais inabaláveis alicerces sobre os mais instáveis terrenos.

Ao meu cunhado Jonattan pela doação total para com a minha família e pelo divino presente chamado Bryan.

Ao meu tio Marquinhos, tia Glaci, Gleici, Rubens (Schulapa), Amanda, Rafael Gláucia, Gabriel (Biel) e Marcos (Kiko). Agradeço por todos esses anos sempre juntos e pelo eterno carinho para comigo.

Agradeço à Ana Paula, pela sua presença agradável, sua loucura apaixonante, seu coração “*maior que o mundo*” e por tudo que você tem se tornado em minha vida em tão pouco tempo.

Agradeço ao meu grande amigo-irmão Norival Jr., pela cumplicidade durante todos esses anos, pela compreensão para com nossas diferenças e a cada re-encontro pela sensação de nunca ter deixado Joinville.

Ao meu amigo Juliano Freitas pela grande confiança que deposita em mim, pela ajuda interminável, e pelas conversas abaláveis que me pôs a pensar muito sobre minha carreira.

Ao amigo Diego Santos, pela amizade e pela garantia de ótimas noites sempre que voltasse a Joinville.

Agradeço à Daniela, pela pessoa maravilhosa que é, e por todos os momentos que passamos juntos. Agradeço também ao Tio Pedro, Tia Vera, Flávio, Guto, Pedroquinha, Pedrinho, pela honra de ter por três anos e meio sido inserido na família e por ter realmente me sentido como tal.

À Alessandra G. Commodaro pela nossa amizade, pelas conversas intermináveis, colaborações e por ter me apresentado alguém tão especial.

Aos amigos Rodrigo Rosa e Fernanda, Daniel Randig e Carla, Rodrigo Pinheiro e Michelle, Tiago Borba e Maísa, Juliano e Sabrina. O melhor e mais inteligente círculo de amigos que alguém pode ter.

Aos amigos Rafinha e Eriquinha, por simplesmente serem as pessoas adoráveis que são e estenderem não só a mão mas o corpo todo por nossa amizade.

À Laudicéia, pela amizade ímpar e pelas conversas sem fim sobre a vida, poesia, música, etc, etc, etc...

Ao pessoal do laboratório de Imunologia Clínica, Luciana, Julieta, Thaís, Natália, Tatinha, Kadu, Cris, Cris Moulin, Adriana Vallochi, Lilia e Silvio assim como ao pessoal do laboratório de Apoptose, Prof. Dr. Gustavo Pessini, Ricardo, Jaqueline, Fábíola, Mônica, Aninha, Janine, Claudinha, Julinha, Maíra, Welbert, Daniel.

Ao amigo Ivo, por termos compartilhado desde a iniciação científica vários momentos agradáveis e de grande discussão científica.

Aos amigos Luizão e Nana, pela amizade e pelas inumeráveis noites étlicas no Franboi.

A Jotelma e Amarildo pela boa vontade sempre que precisei de ajuda na pós-graduação.

Agradeço à Áurea pelos eternos cafezinhos e pela descontração.

Aos grandes amigos Basso e Rita, pelas conversas intermináveis sobre MPB e bossa nova nas noites geladas de Boston, regadas a *Guinness* e boa música.

Aos amigos do *Center for Neurological Diseases*, Henry, Francisco e Tamara, Maria Cristina, Maurício, Alex Kostianovski, KY, Vissia, Tracy, Manu, Gaele, Kadir, Steene, Ruth Maroon, Dan Frenkel, Julia Carrier, Mei Ling, Roopali, Akansha, Oleg Butovski, Mee Rie, Jimmy, Rocio. Por terem tornado minha estada em Boston mais que agradável.

Aos amigos do *IVDiffusion*, Antonio, Alan, Rob, Eric e Andreas, pelas noites de Rock and Roll quando tocávamos nos barzinhos de Boston.

Ao primeiro mestre Prof. Dr. Phileno Pinge Filho e Profa. Dra. Marli Pinge. Por despertar em mim o amor pela pesquisa e pela relação agradável que dura até hoje.

Aos amigos Cleide e Valdir Harger pela longa amizade e pelo apoio desde a época da iniciação científica.

RESUMO

Peron JPS. O fenômeno da tolerância oral e a regulação das células patogênicas Th17 no modelo de encefalomielite experimental auto-imune. [Tese] São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas IV – Universidade de São Paulo.

A esclerose múltipla é uma doença bastante debilitante e altamente incidente em países do norte europeu assim como nos Estados Unidos. Caracterizada por uma potente resposta imune contra antígenos de mielina presentes no SNC, a esclerose múltipla (EM) pode variar de casos abruptos de pico e remissão até aqueles chamados de primários ou secundários progressivos. Através do modelo experimental de EM, chamado de encefalomielite experimental auto-imune (EAE), tem sido demonstrada recentemente a relevância de uma nova população de células T chamadas Th17 na patogênese deste modelo. Tal população é responsável por induzir a quebra da barreira hemato-encefálica devido à capacidade inerente destas em secretarem IL-17 e IL-22 de forma dependente de IL-6 + TGF- β . Através do fenômeno da tolerância oral, no qual o antígeno de mielina MOG 35-55 é dado oralmente para animais C57BL/6 antes da imunização com o mesmo antígeno, demonstramos em nosso trabalho que a produção de IL-6 e IL-17 está diminuída nos animais tolerados. Nossos resultados também apresentaram uma menor secreção de CCL2 e IL-6 por células mononucleares extraídas do CNS dia 10 pós-imunização. Todavia, não observamos diferença na produção de IL-4,5,10, 13, IL-12p70, TNF- α , e IFN- γ entre os grupos. Em relação ao infiltrado inflamatório no SNC, nossos resultados demonstraram uma menor quantidade de macrófagos ao dia 7, associado a um aumento de linfócitos ao dia 10 pós-imunização. Em suma, nossos resultados mostram que o fenômeno da tolerância oral é capaz de suprimir parâmetros de EAE devido a uma menor capacidade linfoproliferativa, associada a uma supressão de células patogênicas Th17 tanto na periferia como no SNC.

ABSTRACT

Peron JPS. The phenomenon of oral tolerance and the regulation of Th17 pathogenic cells during the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis model. [Ph.D Thesis]. São Paulo Instituto de Ciências Biomédicas IV – Universidade de São Paulo.

Multiple sclerosis is a very debilitating and highly incident autoimmune disease in northern Europe countries as well as in the USA. Characterized by an extensive immune response against self antigens presented in the central nervous system, MS can vary from relapse and remitting to primary or secondary progressive cases. Using the murine model for multiple sclerosis, the so called experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), it has recently been shown the relevance of a new population of T cells described as Th17 in EAE and MS pathogenesis. These cells can induce blood-brain barrier disruption due to the capacity to secrete IL-17 and IL-22 in an IL-6 and TGF- β dependent manner. Using the oral tolerance phenomenon, by which the myelin antigen MOG 35-55 is given orally to C57BL6 mice previous to immunization, we showed here that IL-6 and IL-17 is suppressed of orally tolerated mice. Our results also showed lower levels of CCL2 and IL-6 from CNS extracted mononuclear cells, associated with no difference on IL-4,5,10,13, IL-12p70, TNF- α and IFN- γ between the groups. Concerning target organ infiltration, we showed a diminished concentration of macrophages at day 7th post-immunization, associated to a higher percentage of T cells on day 10th. Altogether, our results showed here that the oral tolerance phenomenon is able to suppress EAE, mainly due to a lack of lymphoproliferative response that is associated to suppression of the Th17 pathogenic cells both in the periphery and also inside the CNS.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	37
3 MATERIAIS E MÉTODOS	39
3.1 Animais	39
3.2 Indução de EAE e Tolerância Oral	39
3.3 Ensaio de Linfoproliferação	40
3.4 Dosagem de Citocinas	40
3.5 Citometria de Fluxo	41
3.6 Obtenção de Células Mononucleares do SNC	42
3.7 PCR em Tempo Real	43
3.8 Análise Estatística	43
4 RESULTADOS	48
4.1 Tolerância Oral Suprime o Grau de EAE em Animais C57Bl/6.	44
4.2 Tolerância Oral Suprime a Linfoproliferação de Células de Baço e Linfonodos de Animais com EAE.	50
4.3 Tolerância não Altera a Porcentagem de Linfócitos Totais, T CD4⁺ e Monócitos no Sangue Periférico de Animais com EAE.	58
4.4. Tolerância Oral Suprime a Transcrição e a Secreção de IL-17 nos Linfonodos Drenantes Além de Suprimir a Secreção de IL-6, CCL2 e IL-17 no SNC.	65
4.5 Citometria de Fluxo de Células Extraídas do SNC	68
5 DISCUSSÃO	75
6 CONCLUSÃO	78
6 REFERÊNCIAS	84

1 INTRODUÇÃO

1.1 Auto-tolerância

“The organism possesses certain contrivances by means of which the immunity reaction, so easily produced by all kinds of cells, is prevented from acting against the organism’s own elements and so giving rise to autotoxins ... so that we might be justified in speaking of a ‘horror autotoxicus’ of the organism. These contrivances are naturally of the highest importance for the individual.” Paul Ehrlich.,

“O organismo possui certos mecanismos pelos quais a reação imune, tão facilmente produzida por todos os tipos de células, é prevenida de reagir contra os elementos do próprio organismo e gerar auto-toxinas...de forma que pode isso pode ser justificado faland-se do horror autotoxicus do organismo. Esses mecanismos são da maior importância para o indivíduo.” Paul Ehrlich.,

.....

Levando-se em consideração a observação de Paul Ehrlich descrita acima, na qual denota-se a presença de mecanismos reguladores que impedem a “auto-resposta”, lembramos que a auto-tolerância é foco de estudo já há muitos anos. Sabemos hoje que, filogeneticamente a partir da compartimentalização do sistema imune, ou seja, do surgimento das células da imunidade específica, os linfócitos T e B, capazes de reconhecer um grande espectro de antígenos próprios ou estranhos” surgiu também o advento das respostas auto-ímmunes. Isso devido ao fato de que, a partir de então, tais células seriam capazes de reconhecer e serem ativadas por moléculas presentes no próprio organismo e gerar assim uma resposta crônica e lesiva contra este.

Sendo assim, o sistema imune também evoluiu com mecanismos eficazes de geração de tolerância ao próprio, ou como descrito por Burnet anos mais tarde, a chamada “contra-resposta”. Tais mecanismos têm como intuito evitar com que os fenômenos auto-ímmunes aconteçam e que resultem em efeitos deletérios para o organismo. Isso foi notado também por Paul Ehrlich quando descreveu o *Horror autotoxicus*: “...o sistema imune possui uma capacidade inerente de impedir com que este reaja contra o próprio...e isso é de grande importância para o indivíduo” [1].

Atualmente sabemos que os mecanismos de geração de tolerância podem ocorrer em dois momentos distintos durante a ontogênese dos linfócitos T, definindo assim dois

mecanismos de geração de tolerância também distintos entre si, chamados de tolerância central e periférica [2].

Nos mecanismos centrais de tolerância, os progenitores linfóides provenientes da medula óssea se dirigem ao timo e neste sofrem seu processo de maturação. À medida que migram das camadas mais externas do tecido tímico (córtex) em direção à região central (medula), os linfócitos imaturos chamados timócitos, interagem principalmente com as células epiteliais tímicas, mas também com células dendríticas e macrófagos. E é através dessas interações que ocorrem os fenômenos de seleção positiva e negativa [1].

Durante a seleção positiva, os clones que adentram o timo são resgatados da morte celular por negligência se forem capazes de reconhecer um auto-antígeno sendo apresentado no contexto de MHC (*Major Histocompatibility Complex*) daquele indivíduo. Uma vez que o receptor de células T deve reconhecer não só o peptídeo presente na fenda do MHC, mas também uma parte deste, o sinal dado pelo engajamento MHC -Antígeno – TCR (*T Cell Receptor*) faz com que a célula seja resgatada da morte celular por negligência. Tal fenômeno restringe a resposta das células T daquele indivíduo ao contexto do seu próprio MHC.

Concomitante ao reconhecimento da porção MHC do complexo MHC-peptídeo, a avidéz de ligação daquele TCR com aquele complexo Ag - MHC é também de grande importância. Se o clone de célula T se ligar com alta avidéz ao complexo Ag – MHC presente, o clone será deletado por apoptose, em um fenômeno denominado seleção negativa. Isso faz com que o número de células com potencial auto-reativo capazes de serem ativadas na periferia na presença de seu auto-antígeno específico seja muito reduzida, uma vez que foram eliminadas. De fato, somente 10% dos clones que adentram o timo alcançam os órgãos linfóides secundários [2].

A seleção negativa só é possível devido à expressão promíscua de uma série de antígenos no timo. Isso acontece devido a um fator de transcrição chamado AIRE (*Autoimmune Regulator*), o qual permite que as células epiteliais da medula tímica

expressem um número bastante vasto de antígenos, montando assim um repertório antigênico, dentre os quais podemos citar, catepsinas, insulina, mielina, miosina, antígeno retinal S entre outros, responsáveis pela seleção negativa [3, 4].

Alguns autores, por exemplo, justificam a susceptibilidade de alguns animais, como os camundongos B10.RIII ao modelo de EAU (*Experimental Autoimmune Uveitis*), devido à ausência de antígenos oculares sendo apresentados no timo. Sendo assim, aqueles clones que reconhecem antígenos oculares não seriam eliminados durante a seleção negativa, encaminhando-se para a periferia onde poderiam ser ativados pelo seu antígeno cognato [5, 6].

Sendo assim, devido a essas falhas nos mecanismos centrais de tolerância, o organismo deve lançar mão de mecanismos periféricos para evitar que esses clones remanescentes auto-reativos se ativem e levem a uma resposta auto-imune.

Dentre os mecanismos já descritos, podemos citar:

1) **Anergia clonal**: Células T ativadas na ausência de co-estimulação, ou na presença de muitas interações do tipo CD80/CD86: CTLA-4 (*Cytotoxic T Lymphocyte Antigen 4*), disparam uma via de sinalização a qual culmina em uma parada no ciclo celular, ou seja, anergia clonal. Isso impede a expansão desses clones assim como a produção de grandes quantidades de citocinas, principalmente as do tipo Th1[7].

Dados mais recentes têm demonstrado que esta interação é uma via bi-direcional, acarretando em mudanças também nas células apresentadoras de antígenos (APCs), principalmente as células dendríticas (DCs). Demonstrou-se que após o engajamento de GITR (*Glucocorticoide Induced TNF Receptor*) ou CTLA-4 em células T, principalmente Tregs, com DCs de fenótipo CD11c⁺CD8α⁺ há a ativação de STAT5 (*Signal Transducer and Activation of Transcription*) e transcrição de IFN-γ por essas APCs. Este, através de uma ação autócrina induz a expressão de uma heme-proteína chamadaIDO (*Indoleamine -2,3- Dioxygenase*) a qual é responsável por quebrar o

aminoácido triptofano em seus metabólitos chamados kinureninas. Além disso, tal população de DCs apresentam a via de sinalização de CD86:CD28 impedida através da expressão constitutiva de SOCS3 (*Supressor of Cytokine Signaling 3*), fazendo com que somente as interações com CTLA-4 culminem em transcrição de sinal [8]. A atividade de IDO se relaciona então à depleção de triptofano em um fenômeno chamado *tryptophan starvation*, o qual já havia sido descrito como de suma importância na resposta imune a *Toxoplasma guindei*, *Chlamydia psittaci* e *Leishmania donovani* [9]. Da mesma forma, esta atividade está relacionada à supressão da proliferação de células T tanto *in vivo* como *in vitro* [10].

Aparentemente células T ativadas sentem a ausência de triptofano no meio e disparam uma via de transcrição de sinal dependente de duas kinases distintas, chamadas GCN2K e CHOP, as quais impedem a proliferação das células T. Tais dados foram comprovados uma vez que células deficientes para CHOP não respondiam à ausência de triptofano [11]. Além disso, as kinureninas propriamente ditas, também são capazes de gerar células T reguladoras *in vitro*, além de diminuir a expressão da cadeia zeta do TCR, diminuindo a ativação de células T por essa via [12, 13]. O papel dessas moléculas *in vivo* porém, ainda é grande motivo de debate, a despeito de ter sido demonstrado que o tratamento oral com um derivado de triptofano foi capaz de suprimir a EAE através da diminuição da produção de citocinas inflamatórias e da expressão de moléculas co-estimuladoras [14].

2) **Supressão ativa:** Vários grupos têm demonstrado que a secreção de citocinas ou moléculas com potencial anti-inflamatório é muito importante na manutenção da auto-tolerância, como por exemplo o TGF- β (*Transforming Growth Factor- β*) e a IL-10. Camundongos TGF- β KO da mesma forma que aqueles deficientes para CTLA-4, sucumbem já nas primeiras semanas de vida a uma doença intensamente linfoproliferativa na qual se observa intenso infiltrado inflamatório disseminado em todos os órgãos [15-17]. De forma interessante, utilizando um camundongo KO condicional, ou seja, onde o gene do TGF- β era abolido somente em células T CD4⁺, mostrou-se um fenômeno semelhante àqueles observados nos animais KO totais. Os animais

apresentaram uma maior quantidade de células T ativadas. Tais resultados nos demonstram a importância da produção de TGF- β à partir de células T CD4, a despeito dessa molécula ser secretada por uma série de outras populações celulares [18].

Outro exemplo da capacidade reguladora das citocinas é o caso da IL-2. A despeito da IL-2 há anos estar relacionada à proliferação de células T, esta também possui papel importante como supressor ativo. A expressão de FAS-FASL, induzida pela presença de IL-2, é responsável por levar células T à morte ao término de uma resposta adaptativa. Isso foi comprovado quando, de forma interessante, camundongos deficientes para IL-2, ao invés de apresentarem um fenótipo de imunodeficiência, estes também sucumbiram a uma intensa resposta linfoproliferativa disseminada [7].

3) **Ignorância imunológica ou imunoprivilégio:** A despeito de ter sido amplamente discutida à época em que fora descrita, hoje a ignorância imunológica é objeto de grandes debates na imunologia, sendo assunto mais em voga de grupos que estudam as respostas imunes oculares e do sistema nervoso central. Atualmente, tem-se demonstrado que tal mecanismo não é só resultado da falta de acesso das células do sistema imune a tais órgãos, na verdade, tem-se demonstrado cada vez mais a presença de mecanismos refinados. A baixa expressão de MHC I e II, a expressão constitutiva de FAS-L no epitélio retiniano assim como as altas quantidades de TGF- β , VIP (*Vasoactive Intestinal Peptide*), MSH (*Melanocyte Stimulating Hormone*) ou corticosteróides no humor aquoso são alguns exemplos [19]. Tais eventos estão relacionados a um fenômeno chamado “desvio imune associado à câmara anterior do olho” (*ACAID: Anterior Chamber Associated Immunedeviation*). Barreiras anatômicas como a barreira hemato-retiniana e hemato-encefálica também podem ser citadas como contribuintes para o imunoprivilégio [19, 20]

4) **Células T reguladoras:** O conceito de células T reguladoras não é assunto novo na pesquisa em imunologia. Na década de 70, experimentos já demonstravam a possibilidade de uma população específica de células T capazes de suprimir a resposta imune. À época, as células então chamadas T supressoras acreditavam-se ser CD8⁺ [21].

Mas foi então em meados da década de 90 que as células antes chamadas de T supressoras voltaram a ser estudadas. Foi demonstrado então pela primeira vez a capacidade supressora dessas células quando transferidas a camundongos *nude*. Além disso, demonstrou-se também que estas possuíam um fenótipo $CD4^+CD25^+$ e que eram geradas no timo a partir do terceiro dia de idade. Dado este demonstrado através de experimentos de timectomia neonatal [22]. A partir de então, as células chamadas T reguladoras (Treg) naturais foram identificadas como $CD4^+CD25^+$, as quais compreendem cerca de 1 - 2% dos linfócitos T $CD4$ circulantes em humanos e 5 - 10% em camundongos [23].

Estudos anteriores já haviam demonstrado que uma linhagem mutante de camundongos chamada *scurfy* sucumbe a um processo de doença linfoproliferativa disseminada causada por uma ativação descontrolada de linfócitos T $CD4^+$. Tais animais apresentam uma mutação em um gene comum chamado *Foxp3* que codifica para um fator de transcrição chamado *scurfin*. Em 2005, um grupo de pesquisadores conseguiu através do *knockout* de *foxp3* inserindo 2 pares de base no oitavo exon, reproduzir o fenótipo dos animais mutantes em camundongos *wild-type* [24].

Mas foi somente em 2003 que o gene *foxp3* foi finalmente associado às células T reguladoras. O mesmo grupo de Shimon Sakaguchi demonstrou que tal gene possui papel fundamental na atividade dessas células. Experimentos de transfecção de células T $CD4^+CD25^-$ demonstraram que essas adquiriam um fenótipo supressor após a indução da expressão do gene *foxp3*. Tal fato explicaria que, a desordem linfoproliferativa presente nos animais mutantes de *foxp3* seria causada provavelmente por uma diminuição da população de células reguladoras, e que a expressão de tal gene se relaciona com a atividade destas células [25].

Ficou comprovado que as células T reguladoras se ativam de forma TCR específico e sua capacidade supressora se deve a inibição da produção de IL-2. Além disso a supressão era extremamente dependente de contato, uma vez que o co-cultivo em câmaras de transwell aboliu a capacidade supressora [26].

Mais tarde porém, demonstrou-se que as células reguladoras *per se* necessitam de IL-2 para sua manutenção, e que isto se deve a um padrão diferente de resposta após estimulação por esta citocina, desencadeado pelos seus fatores de transdução de sinal Jak-STAT [27]. Além disso, essas células são mais resistentes a apoptose devido a um aumento de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 por exemplo [27].

Em 2002 demonstrou-se a importância da molécula GITR, um dos receptores da superfamília do TNF- α (*Tumor Necrosis Factor- α*) na ativação das células CD4⁺CD25⁺. Utilizando um anticorpo monoclonal agonista anti-GITR, a capacidade supressora das células CD4⁺CD25⁺ foi inibida, sendo que a ligação GITR ao seu ligante (GITRL) parece modular a hiporresponsividade destas células a IL-2 [28]. Além disso, a estimulação destas células através do GITR parece romper com os padrões de auto-tolerância, demonstrando ser esta uma molécula essencial na manutenção deste mecanismo [29].

As células T reguladoras também foram divididas em duas populações distintas segundo as integrinas que estas expressam. Aparentemente aquelas que expressam integrinas $\alpha 4\beta 7$ se dirigem aos intestinos e as que expressam $\alpha 4\beta 1$ se dirigem aos linfonodos, sendo ainda responsáveis por induzir a produção de IL-10 ou TGF- β respectivamente, sendo que ambas apresentam expressão de *foxp3* [30].

Dados ainda mais interessantes foram gerados quando pesquisadores avaliaram os processos de maturação tímica das células T CD4⁺CD25⁺. Através de um camundongo F1 que expressava tanto o antígeno como o TCR específico para este, demonstrou-se que uma interação de alta avididade de uma célula reguladora com um auto-antígeno + MHC no timo, ao invés promover a morte celular deste clone por seleção negativa, permite que este sobreviva e se dirija até a periferia. Logo, demonstrou-se que as células T reguladoras não obedecem aos mecanismos convencionais de geração de tolerância central e são por natureza própria células auto-reativas [31].

Estudos também têm sugerido a possibilidade de que as células reguladoras exerçam sua função através de granzimas uma vez que estas aumentam a expressão de granzima A mas não de granzima B quando estimuladas *in vitro* com anticorpos anti-CD3 e anti-CD28 ou anti-CD3 e anti-CD46. Com isso surgiu um novo conhecimento acerca dos mecanismos reguladores exercidos por esta população celular chamada de “*Regulatory Killer Cells*”. Todavia, talvez pelo fato deste achado demonstrar algo novo, no caso a ação de granzima independente de perforina, tais resultados têm sido pouco explorados recentemente, sendo a característica citolítica das Tregs pouco difundidas [32]

Com o advento de ferramentas mais sofisticadas, como os camundongos *Knockin*, desenvolveu-se um camundongo Foxp3-KI, o qual apresenta a molécula de Foxp3 associada à GFP (*Green Fluorescent Protein*). Tal fato facilitou muito no estudo e conhecimento da biologia dessas células, desde sua ontogenia até seus mecanismos funcionais. Demonstrou-se por exemplo sua maturação tímica, assim como sua migração para a periferia [33].

Mais interessante, o mesmo grupo utilizando agora um camundongo Foxp3 – DTR (*Diphtheria Toxin Receptor*), o qual expressa o receptor da toxina diftérica de forma restrita às células Foxp3⁺ demonstrou o papel das Tregs sobre a imunidade inata em animais *naive*. Tais camundongos são passíveis de depleção das Tregs quando inoculados com toxina diftérica. Através destes experimentos, demonstrou-se que essas células são responsáveis por manter em *xeque* a ativação de células da imunidade inata, tais como as células dendríticas, por exemplo. Após a depleção das células Tregs, os animais apresentavam uma maior expressão de moléculas co-estimulatórias, além de uma maior síntese de citocinas pró-inflamatórias [34].

Sendo assim, juntamente com o compartimento específico do sistema imune, capaz de levar ao auto-reconhecimento e às respostas auto-imunes, os mecanismos centrais e periféricos de geração de tolerância também surgiram no intuito de manter a integridade do organismo e fazer com a que resposta imune quando montada, seja algo efetivo e nunca deletério ao mesmo.

Contudo, a despeito dos variados mecanismos de tolerância, sejam eles centrais ou periféricos, o organismo ainda não está salvo das doenças auto-imunes. Interessante notar que indivíduos normais apresentam clones auto-reativos na periferia, como anti-IRBP ou anti-MBP e mesmo assim não apresentam quaisquer tipos de doença, como revisto recentemente [35]. A despeito da grande gama de trabalhos feitos sobre a regulação do sistema imune, em particular após o *boom* das células T reguladoras, pouco ainda se sabe sobre os mecanismos e eventos presentes durante o advento destas respostas. A quebra da auto-tolerância é ainda hoje uma das grandes áreas da imunologia que carece de conhecimento.

Além disso, muito ainda há para ser descoberto, tudo no intuito de tornar fácil e viável a manipulação desses mecanismos, em especial as células T reguladoras na prática clínica ou na compreensão da fisiopatogenia das doenças auto-imunes, como revisto recentemente por Howard L. Weiner : “ Há um grande potencial para a terapia celular em humanos...todavia aparentemente será mais aplicada à circunstâncias nas quais um tratamento curto é utilizado, e será necessária a associação com uma terapia crônica”¹ e por Jeffrey A. Bluestone: “ ... o potencial da terapia celular é bastante diverso, indo de transplante de medula e órgãos sólidos até doenças auto-imunes, como esclerose múltipla, diabetes tipo II e colite. ...porém temos idéias sobre seu uso (das células T reguladoras) nessas doenças, mas ainda é cedo para se dizer” .²

¹ “*There is great potential for cell-based tolerogenic immunotherapy. It could potentially be used in the treatment of cell-mediated and antibody-mediated autoimmune diseases, in allergy and in the prevention of transplant rejection. However, I think cell-based tolerogenic immunotherapy, if it can be developed for humans, given the problems discussed above, will be best suited to selective instances in which short-term treatment is needed and will need to be followed by additional and chronic immunotherapy*”. Howard L. Weiner in What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? Nature Immunol August 2007 Vol 7.

² “*With regards to immunological diseases, the potential uses of cell-based therapies are quite diverse, ranging from bone-marrow and solid-organ transplantation to autoimmune diseases, such as multiple sclerosis, type I diabetes and inflammatory bowel disease. However, it is not yet clear if regulatory T-cell-based therapy might be harnessed for use in more general inflammatory conditions, such as cardiovascular disease, Parkinson’s disease and Alzheimer’s disease, and as a treatment against the destructive aspects of immune responses to viruses. We have hints of their potential role in these diseases, but it is too early to say*”. Jeffrey A. Bluestone in What does the future hold for cell-based tolerogenic therapy? Nature Immunol August 2007 Vol 7.

1.3 Encefalomielite Experimental Auto-imune.

A despeito da quantidade de mecanismos presentes no organismo para se evitar a auto-reatividade, é comum a presença de clones específicos para antígenos endógenos na periferia, como anti-IRBP (*Interphotorreceptor Retinoid Binding Protein*), anti-MBP (*Myelin Basic Protein*), anti-colágeno e anti-tireoglobulina no sangue periférico de indivíduos normais, como já discutido anteriormente. Isso evidencia que o fenômeno de tolerância é mais complexo do que parece, sendo ainda que a presença de tais clones possa ser importante na homeostase do sistema imune. Logo, não é suficiente somente a presença de clones auto-reativos na periferia, mas principalmente a quebra de tolerância, a qual leva então à uma resposta altamente inflamatória e deletéria para o indivíduo.

Vale a pena ressaltar também que, pesquisadores como Matzinger defendem a *danger theory*, na qual o organismo responde a sinais de perigo, podendo este ser ativado por agentes exógenos ou moléculas endógenas, como revisto por ela mesma [36, 37]. Citam-se moléculas altamente hidrofóbicas da matrix extracelular como alguns fatores de perigo, e que estes podem se ligar aos TLRs (*Toll-like Receptors*) e desencadear a produção de altos níveis de IL-12, a qual pode então facilitar a quebra de tolerância e potencializar o aparecimento de uma resposta auto-imune [38].

Dentre as doenças debilitantes que se destacam, tanto pela complexidade de sua fisiopatogenia como pelo aumento da incidência principalmente em países temperados está a esclerose múltipla (EM), que tem sido cada vez mais estudada, tanto na pesquisa básica como na clínica [39].

De etiologia controversa, os grupos de pesquisa ainda se dividem entre adeptos da auto-imunidade, com haplótipos de HLA (*Human Leucocyte Antigen*) relacionados à doença (HLA-DRB1*1501 e HLA-DRB5*0101) e os adeptos da infecção viral. O fato porém, é que a EM é uma doença que pode variar de casos com ataques abruptos e rápidos de bom prognóstico, até uma doença progressiva que pode levar ao óbito [40].

Além disso, as duas hipóteses não são auto-exclusivas, sendo possível especularmos que a infecção viral possa levar à auto-imunidade.

A EM é uma doença do sistema nervoso central, caracterizada por desmielinização, astrogliose e ainda variados graus de destruição de axônios e oligodendrócitos [41]. Com o passar dos anos, vários grupos têm demonstrado a importância dos componentes do sistema imune em sua patogenia. Dentre esses componentes, as células T CD4⁺ parecem ser de grande importância na ativação da doença. Todavia, células como macrófagos, linfócitos B e T CD8, associadas à deposição de anticorpos e complemento parecem estar mais envolvidos nas lesões propriamente ditas [42].

Alguns grupos defendem o fato de que a EM se inicia com lesões mediadas por células T CD4⁺ e fatores produzidos por estas, porém são as células T citotóxicas que amplificam e realmente medeiam essas lesões [43, 44]. Pacientes com EM ativa apresentam uma maior frequência na periferia de células T CD8 específicas para proteínas de mielina. Além disso, dentro do sistema nervoso central (SNC), essas células são encontradas tanto nas bordas das lesões como nas regiões perivasculares, enquanto as T CD4 são mais abundantes somente nas bordas das lesões [45].

Por outro lado, de forma interessante, foi observado que células T citotóxicas capazes de eliminar células T CD4 encefalitogênicas são abundantemente encontradas em pacientes tratados com acetato de glatiramer (Copaxone[®]), uma droga composta por uma mistura aleatória de alanina, ácido glutâmico, lisina e tirosina, aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no tratamento de pacientes com EM [46]. Tal dado nos dá uma idéia da complexidade dos fenômenos envolvidos nesta doença.

Atualmente tem-se demonstrado que esta mesma droga é capaz também de mudar as características de macrófagos, desviando-os para o perfil M2, sendo assim capazes de secretar uma série de citocinas anti-inflamatórias, principalmente IL-10 e TGF-β. Além

disso, são capazes de diminuir a secreção de TNF- α e potencializar a geração de células T reguladoras [47].

A grande maioria dos dados levantados nos estudos de EM foram realizados em modelos experimentais. Utilizando Ags derivados do sistema nervoso central, o modelo de EAE (*Experimental Autoimmune Encefalomyelitis*) apresenta grandes semelhanças à doença humana. Esta é mais comumente induzida em camundongos, mas podendo também ser utilizados ratos, cobaias, coelhos, porcos, macacos entre outros. Linhagens como C57BL/6, SJ/L ou B10.PL são as mais utilizadas, sendo responsivas a Ags como MOG, MBP e PLP respectivamente. Todos apresentam uma doença um tanto similar entre si, apesar de suas diferenças cinéticas [48].

O modelo de EAE surgiu após o interesse do Prof. Thomas M. Rivers em descobrir o motivo pelo qual pacientes que eram vacinados contra raiva pelo Prof. Louis Pasteur, não invariavelmente desenvolviam paralisia. Tentando descobrir o agente etiológico responsável por esses achados neurológicos, este resolveu imunizar macacos *Rhesus* com extratos de medula de animais com raiva, da mesma forma que procedia Louis Pasteur. Todavia, resolveu utilizar também um grupo controle no qual extratos de coelhos não infectados foram utilizados. Os resultados foram interessantes uma vez que mesmo os animais inoculados com medula sadia também desenvolveram a paralisia. Os achados eram semelhantes àqueles vistos por Pasteur em seus pacientes imunizados ou pacientes com síndromes pós virais, como aquelas causadas por varíola, *vaccinia* vírus e sarampo. Estes iam desde perda da visão até paralisia, e eram observados em picos de doença e remissão [48]. Surgiu então um dos modelos mais utilizados hoje para se estudar a esclerose múltipla humana, e responsável por cerca de 4566 trabalhos no Pubmed atualmente .

A indução da EAE se dá através da inoculação de Ags de mielina emulsificados em CFA (*Complete Freund Adjuvant*). Tal procedimento leva a uma intensa ativação do sistema imune, produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, expansão de clones

encefalitogênicos e o conseqüente rompimento da barreira hematoencefálica inflamação do órgão alvo [49].

Vários fatores têm tido comprovada importância no fenômenos de iniciação e de transmigração celular durante a EAE. Dentre os mais importantes, talvez as moléculas de adesão como as selectinas (E-, P-, e L-Selectinas) e as interações de integrinas (VLA-4 (*Very Late Antigen-4*) e LFA-1 (*Lymphocyte Function-associated Antigen-1*) sejam as mais importantes. Além disso, o uso da toxina de *Bordetella pertussis* durante a imunização possui papel importante na promoção da infiltração celular para o SNC. Um dos mecanismos propostos é que a ativação das células endoteliais da barreira hematoencefálica através do TLR4 (*Toll-like Receptor-4*), induz alta expressão de P-selectinas, facilitando a transmigração das células T para dentro do SNC [50]. O engajamento de agonistas de TLRs em astrócitos, é também capaz de aumentar a produção de IL-6 e outras quimiocinas, aumentando o recrutamento de células com potencial inflamatório para o local [51].

Corroborando tal teoria, vale ressaltar que o Natalizumab[®], um anticorpo monoclonal humanizado anti-integrina $\alpha 4$, tem demonstrado resultados interessantes na prática clínica, diminuindo o acesso de células patogênicas ao SNC [52].

Após a infiltração do SNC pelas células T ativadas, uma série de fatores pró-inflamatórios como IL-1, TNF- α e IFN- γ são produzidos localmente, ocasionando em aumento da permeabilidade vascular e uma maior infiltração celular, porém agora mais preponderantemente composta de macrófagos/monócitos ativados responsáveis por amplificar a resposta local. Devido ao fato de que as células T necessitam ser re-estimuladas *in situ*, é provável que o papel de células do parênquima cerebral, como astrócitos, microglia ou *DCs-like cells*, apresentando auto-antígenos seja também de grande relevância na ativação local dos clones auto-reativos [53].

A produção de quimiocinas como CXCL12 ou CCL2, por células como astrócitos ou microglia, também possui papel importante na atração de células T encefalitogênicas

ou de macrófagos ativados para o SNC [54]. O bloqueio de CCL19 e CCL21 ou de seu receptor CCR7 é capaz de diminuir o número de células T migrantes associadas às células endoteliais da barreira hemato-encefálica e conseqüentemente a inflamação no SNC [55, 56].

A lesão em si, na qual a desmielinização e a morte neuronal são os piores agravantes, são mediados por uma série de fatores, sejam estes do sistema imune inato ou adaptativo. Além das células T citotóxicas, como já mencionado, a produção excessiva de NO (óxido nítrico) por macrófagos ativados, assim como a presença de MMPs (*Matrix Metallo Proteinase*), a despeito destas terem mostrado efeitos tanto lesivos como reparativos são alguns exemplos. Drogas como a minociclina, a qual já é usada na prática clínica, parece reduzir os níveis de MMP-9 diminuindo a severidade da EAE. Tal achado se dá devido aos domínios quelantes de Zn^{2+} presentes nesta droga [57].

A despeito da ampla discussão existente acerca da importância ou não das células T $CD4^+$ dentro do SNC durante a EAE, cada vez mais vem se supondo a irrelevância destas no início da doença. Isso porque novos dados tem demonstrado que nos casos crônicos, uma ativação do compartimento inato do sistema imune parece ser de grande importância. Além disso, o surgimento de uma nova população de células T, chamadas Th17 tem ganhado destaque no estudo das auto-imunidades como revisto recentemente [58].

1.4 Células Th17 e a Auto-imunidade

Não é de hoje que tem se questionado muito o papel do $IFN-\gamma$, assim como de outras citocinas pró-inflamatórias na patogenia de doenças auto-imunes, principalmente na EM e seu modelo murino a EAE. Isso devido ao fato de que camundongos $IFN-\gamma$ KO apresentam níveis de doença tão graves quanto animais selvagens, demonstrado tanto no modelo de EAE [59] como de EAU [60]. Mais interessante ressaltar, que já se demonstrou em 2003 que animais deficientes para a cadeia p19 da IL-23 eram mais resistentes à EAE, devido ao fato de tal peptídeo pertencer exclusivamente à esta

citocina. Além disso, animais deficientes para a cadeia p35, que pertence somente à IL-12 apresentavam uma EAE similar aos grupos controle. Desde então demonstrou-se o papel relevante soberano da IL-23 sobre a IL-12 na patogenia da EAE [61].

Atualmente se tem descrito a importância de uma nova população de células T capazes de secretar grandes quantidades de IL-17 dependente de TGF- β + IL-6 [62]. Sendo os fatores de transcrição STAT-1 e T-bet importantes na geração de células Th1, e STAT-6 e GATA-3 na geração das Th2, ficou demonstrado que o comprometimento de células Th0 para Th17 fica às custas do receptor órfão de ácido retinóico ROR γ t [63]. Vale ressaltar o quão interessante foi este dado, uma vez que tal fator era anteriormente descrito como sendo encontrado somente no timo e nos intestinos, em regiões chamadas LTi (*Lymphoid Tissue-inducer*), ou seja, indutoras de tecido linfóide [64].

Sendo geradas na periferia na dependência da produção de IL-6 e TGF- β , tais células são facilmente encontradas após a indução não só de EAE, mas também de outros modelos de auto-imunidade. Utilizando camundongos transgênicos para TGF- β , demonstrou-se que *in vitro*, células T *naive* se diferenciam reciprocamente em Tregs ou Th17, dependendo da presença ou não de IL-6 no meio [65]. Mais tarde mostrou-se que outros fatores, dentre eles a IL-1 em humanos [66] e a IL-21 em camundongos [67] também podem ser responsáveis para a geração e expansão dessas células.

Foi a partir deste conhecimento então que podemos compreender a importância da IL-23 sobre a IL-12 na patogenia da EAE [61]. A IL-23, a qual pertença à família da IL-12, e por sua vez compartilha a cadeia peptídica p40 desta citocina, também tem apresentado papel relevante, tanto na EM como na EAE. Hoje sabe-se que a IL-23 provinda de células da imunidade inata tem papel fundamental na manutenção das células Th17. Todavia esta não participa na geração das mesmas [68, 69]. Demonstrou-se por exemplo que a IL-6 *in vivo*, induz secreção de IL-21 e 23 as quais induzem a síntese de seus receptores o que culmina na expressão de STAT-3 e ROR γ t e então secreção de IL-17 [70].

Além desta, um grupo que também trabalha com o modelo de EAE demonstrou que a IL-21 também parece ter papel relevante neste fenômeno. Tal dado foi obtido de animais IL-6 KO que apresentavam uma maior concentração de células T reguladoras Foxp3⁺ e eram quase ausentes de células Th17 após imunização. Todavia, quando esses mesmo animais eram depletados de Tregs e imunizados para EAE, a produção de IL-17 era retomada, e o fenômeno se dava de forma dependente de IL-21 [67].

Mais interessante, recentemente demonstrou-se que os fatores que regulam a produção e expansão da população Th17⁺ são as citocinas IL-25 [71] assim como a IL-27 [72]. A relevância desta contra-regulação está no fato de que pesquisadores demonstraram que a despeito do acúmulo de células T reguladoras no SNC durante a EAE, estas não conseguem suprimir a proliferação de células T efetoras também presentes no SNC. Isso se dá devido ao fato de que estas células secretam grandes quantidades de IL-6, tornando-as refratárias à supressão; uma vez que células efetoras retiradas de órgãos linfóides e não do SNC são perfeitamente suprimíveis [73]. Sendo assim, fica clara a relevância destas citocinas supressoras de Th17. É interessante mencionar porém, que esta não fora a primeira vez que tal fenômeno é observado. O grupo do prof. Medzhitov já demonstrara anteriormente que, ensaios de supressão de proliferação com células T reguladoras não funcionavam na presença de células apresentadoras de antígenos (APCs) estimuladas com LPS. Tal fato se dava pela presença de IL-6, porém agora sendo produzidas pelas APCs [74].

Em um trabalho recente com células humanas, demonstrou-se que a IL-17 é abundantemente encontrada em lesões de pacientes com EM, e além disso esta é responsável por promover a quebra da barreira hematoencefálica. Provou-se que receptores tanto para IL-17 como para IL-22, uma citocina também produzida pelas células Th17 [75] são amplamente encontrados no tecido endotelial da mesma. Sendo assim, demonstrou-se que a IL-17, não só é importante na ativação do sistema imune na periferia, mas também no órgão alvo, sendo responsável por facilitar a entrada de células com potencial lesivo para dentro do SNC [76]. Além disso, vários grupos têm demonstrado recentemente a importância de citocinas como IL-6 e IL-17 na EM e também na EAE. Estudos demonstraram que as células agora chamadas Th17, possuem

grande importância, tanto na periferia como no SNC. Pacientes com EM ativa, apresentam grandes quantidades de mRNA para IL-17 no sangue periférico assim como no LCR [77]. Esses dados se repetem para a IL-6 [78].

Afora os mecanismos imunológicos, tais como o papel de citocinas e mediadores inflamatórios, mecanismos bioquímicos também são também possuem grande relevância nas lesões ocorridas durante a EAE. Com a morte de astrócitos, o qual possui grandes quantidades de glutamina sintetase, responsável por converter glutamato em glutamina, uma grande quantidade de glutamato é acumulada no parênquima cerebral. Tal fato culmina na morte neuronal por excitotoxicidade, uma vez que o glutamato, como um importante neurotransmissor excitatório é ligante de receptores NMDA (*N-Methyl-D-Aspartic Acid*). Estudos utilizando o Riluzole, o qual impede a liberação de glutamato e modulando a expressão de receptores de glutamato, têm demonstrado efeitos positivos nas lesões mediadas por esses mecanismos [79]. Porém, não podemos excluir a possibilidade de que este déficit na atividade desta enzima aconteça às custas da presença de IL-17 ou IL-22.

Sendo assim, através da análise de todos estes dados, percebe-se que a EM, assim como a EAE, são regidos por mecanismos finos e rebuscados de regulação. Fica claro que, se quisermos lançar mão de ferramentas efetivas no tratamento desta e de outras doenças, precisamos compreender melhor esses mecanismos. Mais interessante ainda seria manipularmos ou utilizarmos estes no combate às doenças auto-imunes. Em nosso trabalho visamos entender melhor os mecanismos envolvidos na tolerância oral, e como esta é capaz de regular a resposta imune observada durante a EAE, principalmente em relação a esse novo eixo IL-17/ IL-23.

1.2 Tolerância Oral

Dentre as possibilidades terapêuticas existentes hoje na clínica, talvez a indução de tolerância oral seja uma das mais interessantes. Isso devido ao fato de ser uma terapia antígeno específica que permite que o resto do sistema imune não seja afetado, diferente

das terapias imunossupressoras com glicocorticóides ou ciclosporina por exemplo, que acarretam em uma grande queda da resposta imune como um todo. Além disso, é de fácil administração, e como já discutido anteriormente, não apresenta as dificuldades encontradas na terapia celular por exemplo.

Vários autores têm demonstrado que a tolerância oral é um processo ativo, aparentemente regido por pelo menos dois grandes mecanismos distintos, dependendo da concentração do antígeno administrado [80]. Altas doses de antígenos sendo administradas de uma só vez tendem a induzir a deleção ou anergia dos clones de células T [81, 82], enquanto que baixas doses administradas repetidamente induzem uma resposta caracterizada por supressão ativa e produção de citocinas com caráter supressor, principalmente IL-10 e TGF- β [83-85]. Dados que corroboram esta hipótese foram obtidos através de experimentos com animais tratados ou não com ciclofosfamida e submetidos a tolerância oral. Os animais apresentaram tolerância ao Ag utilizado, porém esta não era transferível. Isso porque o efeito tóxico da droga acarretava na morte dos linfócitos T que por sua vez não eram mais capazes de suprimir ativamente a resposta imune [86].

Com dependência esplênica [87] e independência de células T CD8+ [88], a tolerância oral se caracteriza pela introdução de antígenos específicos pela via oral e pela posterior diminuição da resposta celular, no título de anticorpos antígeno específico [89] e na patogenicidade [90] frente ao mesmo antígeno quando este é re-introduzido por via parenteral.

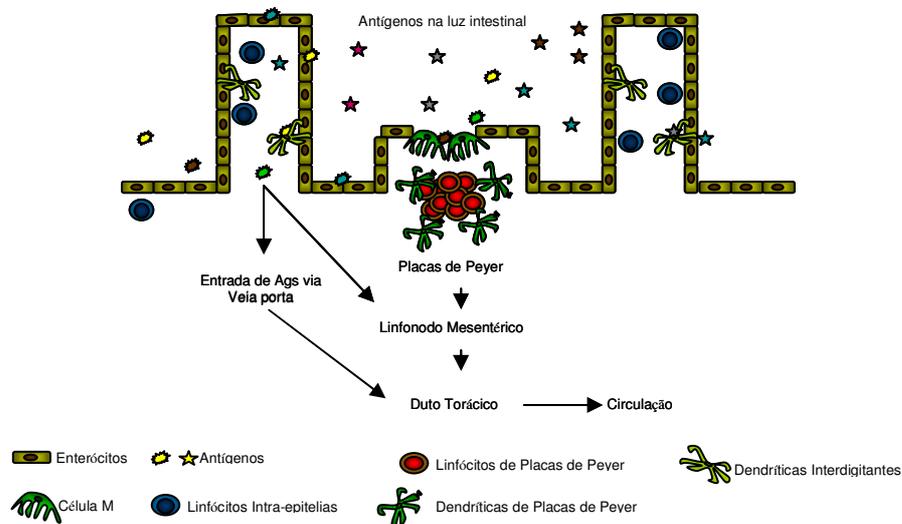
Todavia, a despeito do grande número de trabalhos realizados, ainda hoje se especula qual o mecanismo preponderante na indução de tolerância oral. Para entendermos realmente quais os mecanismos presentes, devemos conhecer a anatomia e os fenômenos celulares encontrados durante a entrada dos antígenos após a ingestão oral.

Substâncias que adentram o organismo pela via oral, encontram um compartimento complexo de células e estruturas pertencentes ao sistema imune chamado

GALT (*Gut Associated Lymphoid Tissue*). Este é composto por estruturas complexas, como as Placas de Peyer e por células com características singulares, como linfócitos intra-epiteliais, células dendríticas interdigitantes e células da lâmina própria [91]. Além disto, células B e macrófagos também são amplamente encontrados [92].

A primeira via de entrada dos Ags, se dá por estruturas celulares chamadas células M que são células sem vilosidades que se encontram sobre o domo das placas de Peyer, e são de grande importância para o transporte de antígenos particulados para dentro das mesmas. Antígenos solúveis por sua vez podem ser absorvidos diretamente através das vilosidades encontradas nos enterócitos. Como podemos observar nos esquema abaixo, os Ags absorvidos alcançam a circulação através dos linfonodos mesentéricos e posteriormente através do ducto torácico. Após a entrada destes Ags, seja através das células M, encontradas nos domos das placas de Peyer, ou mesmo diretamente através da mucosa, o fato é que invariavelmente tais eventos culminam em geração de tolerância contra os mesmos quando são administrados por via parenteral [35].

Aparentemente as DCs, sabidamente as melhores APCs do organismo, possuem papel muito importante nos mecanismos envolvidos na tolerância oral. Um dado que corrobora tal teoria foi obtido quando animais tratados com Flt-3 ligante durante o tratamento oral apresentaram uma maior supressão quando comparados aos animais somente tolerados. Tal resultado se deu pelo aumento da população de DCs capazes de apresentar o tolerógeno utilizado[93].



Estudos demonstraram que a capacidade estimuladora das DCs de Placas de Peyer e da lâmina própria é bastante diminuída quando comparada a DCs de baço e linfonodo. Tais resultados foram obtidos utilizando DCs isoladas desses órgãos como APCs em MLRs. Além disso, DCs de placas de Peyer induzem a produção de IL-4 enquanto aquelas isoladas de baço induzem a secreção de IFN- γ por células T co-cultivadas [94].

APCs residentes da lâmina própria são também capazes de apresentar Ags de forma relevante durante a tolerância oral. Utilizando um modelo de transferência passiva de células de lâmina própria para animais com TCR transgênico, demonstrou-se a capacidade destas células em primar as células T a fazerem muito IFN- γ e TGF- β . Porém quais subtipos celulares presentes na lâmina própria que eram responsáveis por tal estimulação não foram capazes de serem identificados[95].

A presença de moléculas co-estimuladoras também apresenta papel relevante durante a indução de tolerância. Utilizando anticorpos bloqueadores, demonstrou-se que CD80 mas não CD86 são importantes na indução de tal fenômeno durante o tratamento

oral. Logo, podemos especular que vias distintas de sinalização são utilizadas neste fenômeno [96].

O CTLA-4 também demonstrou suma importância neste fenômeno [97]. É possível relacionarmos este dado com outro gerado pelo mesmo grupo alguns anos mais tarde onde células T reguladoras são geradas nos linfonodos mesentéricos e Placas de Peyer de camundongos alimentados com MOG 35-55, sendo estas células CTLA-4^{high} [98].

Ainda discutindo a importância das DCs durante a tolerância oral e a homeostase do epitélio intestinal, ficou claro o papel de DCs presentes na lâmina própria na geração periférica de células T reguladoras Foxp3⁺. Resultados demonstraram que DCs de lâmina própria quando colocadas *in vitro* em contato com células T *naive* na presença de ácido retinóico, estas se tornavam Tregs Foxp3⁺. Além disso a presença de TGF- β foi capaz de potencializar o fenômeno [99]. Após estes achados, uma série de outros trabalhos mostrando a importância das DCs e do ácido retinóico na tolerância oral apareceram.

Um deles demonstrou que após o tratamento oral de camundongos DO11.10 (TCR específico para OVA) com OVA (*Ovalbumina*), observa-se um aumento na população de DCs CD103⁺ as quais são capazes de quebrar o ácido retinóico em seus metabólitos. Tal fenômeno é responsável por converter células T CD4⁺Foxp3⁻ em CD4⁺Foxp3⁺ sendo este também dependente de TGF- β [100].

Aparentemente os Ags que adentram o organismo pela via oral são apresentados pelas DCs às células T, principalmente CD4⁺ e CD8⁺ presentes nas Placas de Peyer e linfonodos mesentéricos, sendo que, a despeito de ser independente de CD8, como já citado, ambas quando presentes podem mediar a supressão [101].

Talvez um dos achados mais interessantes e singulares da tolerância oral é a grande quantidade de TGF- β secretada pelas células T após o tratamento oral. Tal resultado foi obtida pela primeira utilizando um modelo com ratos Lewis onde após o

tratamento oral, grandes quantidades de células T CD8⁺ secretoras de TGF-β eram encontradas, embora alguns grupos acham irrelevante o papel de células T CD8⁺ em camundongos como já citado. Além disto, de forma interessante a supressão era transferível a outros animais [102].

Estudos posteriores corroboravam a hipótese de anergia clonal, onde estas células eram isoladas após o tratamento e re-estimuladas *in vitro*. Como esperado, estas não proliferavam após estímulo com MBP, porém eram capazes de produzir grandes quantidades de TGF-β [103].

Mais tarde, estes estudos foram também realizados em camundongos e, da mesma forma que para os ratos Lewis, grandes quantidades de TGF-β eram encontradas, porém sendo produzida principalmente pelas células T CD4. Além do TGF-β, IL-4 e IL-10 também são secretadas preferencialmente por células T CD4 destes camundongos tratados oralmente com o Ag pela via oral [101].

Vários grupos já têm demonstrado o papel da IL-10 na manutenção da integridade intestinal, haja vista que animais IL-10 KO desenvolvem colite espontaneamente com quatro semanas de idade. Utilizando um modelo com beta lactoglobulina (BLG), [104] demonstrou a presença de células específicas para tal antígeno que eram IL-10⁺. Tal população era capaz de suprimir a proliferação de células T *in vitro* e além disso de inibir inflamação *in vivo*.

A eficácia da tolerância oral também já foi demonstrada no modelo de EAU. Tanto tratamentos de alta como de baixa dose foram capazes de suprimir a doença a despeito de terem sido regidos por mecanismos distintos. Os resultados demonstraram que o tratamento de baixa dose era dependente de IL-4 e IL-10, enquanto que os de alta dose independiam das mesmas [105]. Porém outro grupo demonstrou que a supressão presente no modelo de EAE era independente de IL-10 [106].

Vários grupos já têm relacionado as células T reguladoras à tolerância oral. [98] Resultados demonstraram que células T CD4⁺CD25⁺ são induzidas pelo tratamento oral e estão presentes nas Placas de Peyer já 48 horas após a administração oral do antígeno [107]. Porém desaparecem após certo tempo e são então detectadas no baço. Talvez isso se relacione com a importância esplênica na tolerância oral como já demonstrado [108]. Além disso, podemos especular que estes dados corroboram a importância da recirculação linfocitária nesse fenômeno.

Foi demonstrada também a importância das células reguladoras T CD4⁺CD25⁺ na tolerância oral induzida em modelo de artrite. Os resultados apresentaram, além da presença de uma população de células de fenótipo CD4⁺CD25⁺ e altamente produtoras de IL-10, um certo desvio de resposta que melhorava o quadro da doença. Logo, também se percebe a importância das citocinas no processo oral de tolerância. Porém, se estas células são as mesmas CD4⁺CD25⁺ geradas no timo, mais experimentos ainda devem ser realizados [109].

O mesmo grupo em trabalho posterior demonstrou que o tratamento com baixa dose era otimizados pela administração concomitante de IL-2. Haja vista os trabalhos publicados atualmente na área de células T reguladoras, tal resultado pode nos evidenciar a importância destas no fenômenos de tolerância oral, uma vez que IL-2 é de suma importância para tal população celular [110].

Só para citar a complexidade dos fenômenos presentes durante a tolerância oral, além de camundongos deficientes para células T $\gamma\delta$ não serem passíveis de tolerância oral, a transferência destas células de animais *wild type* alimentados foi capaz de restabelecer a tolerância nos animais deficientes [111]

Todavia, embora novos trabalhos tenham sido feitos com intuito de melhor compreender os fenômenos envolvidos no processo de tolerância oral, esses ainda não foram totalmente esclarecidos. Em nosso trabalho visamos compreender um pouco mais esses mecanismos, relacionando-os ao processo de supressão de células patogênicas,

como linfócitos Th17 atualmente tão importantes na imunobiologia de doenças auto-imunes. Além disso, ainda não encontramos na literatura pesquisas que demonstrem que o fenômeno da tolerância oral é capaz de suprimir tal população.

2 OBJETIVOS

Haja vista o importante papel do eixo IL-6 + TGF- β / IL-17 na patogenia de doenças auto-imunes, dentre elas a EAE, resolvemos estudar o efeito da indução de tolerância oral sobre tal população. Sendo assim, em nosso trabalho visamos avaliar a secreção de IL-17 por células de linfonodos drenantes, baço, assim como de células mononucleares extraídas do SNC dos animais submetidos à tolerância oral comparados ao grupo controle.

Além da IL-17, nosso objetivo era comparar a secreção de outras citocinas, tanto pró, como anti-inflamatórias por células mononucleares extraídas do SNC. Dentre elas avaliamos IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13, IFN- γ e TNF- α assim como a quimiocina CCL2 também bastante importante no recrutamento de macrófagos para dentro do SNC durante a EAE [112].

Com relação à infiltração no órgão alvo, ou seja, o SNC, era nosso objetivo avaliar se o a tolerância oral alterava a porcentagem ou a cinética de infiltração. Para tanto, focamos nas porcentagens de células consideradas mais relevantes durante a EAE. Dentre elas, avaliamos linfócitos (CD11b⁻CD45⁺), macrófagos (CD11b⁺CD45^{high}) e microglia (CD11b⁺CD45^{low}). Como a tolerância oral é sabidamente responsável por induzir anergia ou deleção de clones de células T CD4 [82], resolvemos também avaliar a porcentagem destas e também de monócitos no sangue periférico dos animais tolerados e comparados aos controles.

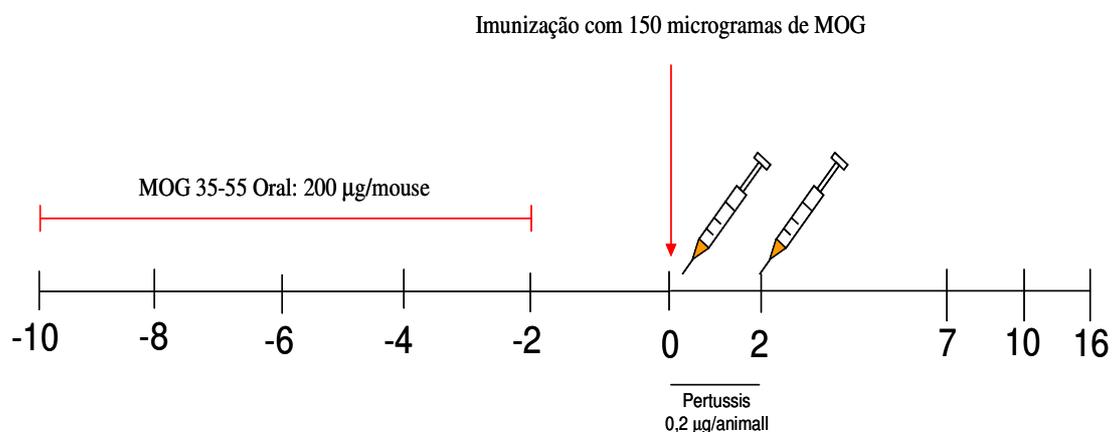
3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos C57Bl/6 foram mantidos no biotério de experimentação animal do Instituto de Ciências Biomédicas IV da Universidade de São Paulo. Camundongos C57BL/6 também eram mantidos em biotério de experimentação animal do Center for Neurological Diseases, Harvard Medical School, Boston, MA segundo as leis de experimentação da instituição. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA). Para todos os experimentos foram utilizados animais machos de 6-8 semanas.

3.2 Indução de EAE e Tolerância Oral

Para indução da EAE os animais foram imunizados por via subcutânea com 150 μg de MOG 35-55 emulsificados em CFA (v/v) com um total de 400 μg de BCG (*Bacillus Calmette-Guérin*). Além disso, foram dadas duas doses de 0,2 μg de toxina de *Bordetella pertussis* 0 e 48 horas após a imunização. Para indução de tolerância oral os animais receberam 200 μg de MOG 35-55 em 200 μL de PBS administrado em 5 dias alternados. Os animais foram seguidos diariamente e o grau de doença distribuído da seguinte forma: 0) sem doença 1) perda do tônus de cauda 2) flacidez ou fraqueza de membros posteriores 3) paralisia de membros posteriores 4) fraqueza de membros posteriores 5) paralisia de membros posteriores ou morte.



3.3 Ensaio de Linfoproliferação

Células de baço e linfonodos foram obtidas dos animais após sacrifício em câmara de CO₂. Os órgãos foram macerados e a suspensão celular lavada em PBS. Os baços foram submetidos à lise de hemácias com 1 mL de tampão de lise durante 2 minutos. As células foram então lavadas em PBS e ressuspensas em DMEM suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de vitaminas, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de gentamicina, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, USA) e 5% de soro fetal bovino (Hyclone, USA). As células foram então plaqueadas a 5×10^5 células/ poço em triplicatas e estimuladas com MOG 35-55 a 1,10 e 100 µg/ mL ou 1 µg/ mL de anti-CD3. Após 48 horas de cultura as células foram pulsadas com 1µCi de timidina-H³ por poço por mais 12 horas. Ao fim do ensaio as células foram coletadas em *cell-harvester* e lido através da emissão de radiação gama em um β-counter da marca Coulter ®.

3.4 Dosagem de Citocinas

As células de baço, linfonodos e SNC foram obtidas como descrito, lavadas em PBS e ressuspensas em DMEM suplementado com 0,1mM de aminoácidos não essenciais, 0,1mM de vitaminas, 2mM de L-glutamina, 100µg/ml de gentamicina, 0,05mM de 2-mercaptoetanol, 1mM de piruvato de sódio, todos da Gibco BRL (Rockville, USA) e 5% de soro fetal bovino (Hyclone, USA). As células foram então plaqueadas a 5×10^5 células/ poço para linfonodos e baço e 2×10^5 / poço para o SNC em triplicatas e estimuladas com MOG 35-55 a 10 e 100 µg/ mL ou 1 µg/ mL de anti-CD3. Após 48 horas de cultura os sobrenadantes foram coletados e utilizados para dosagem de citocinas. Para IL-6 e IL-17 foram utilizados kits de ELISA da eBioscience® e seguido o protocolo segundo o fabricante. Para as demais citocinas dosadas nos sobrenadantes de cultura de células do sistema nervoso central foi utilizado o ensaio de CBA. Brevemente, sobrenadantes de cultura, puro ou diluídos 1:20 eram colocados em placas de fundo V e incubados por duas horas a temperatura ambiente com os coquetéis contendo beads de captura + anticorpos marcados. Após duas horas as placas foram centrifugadas a 450 X g durante 5 minutos e lavados 2X com o diluente

presente no kit. Após a última lavagem os *beads* foram ressuspensos em diluente e levadas ao citômetro de fluxo e adquiridas 2500 eventos segundo fabricante.

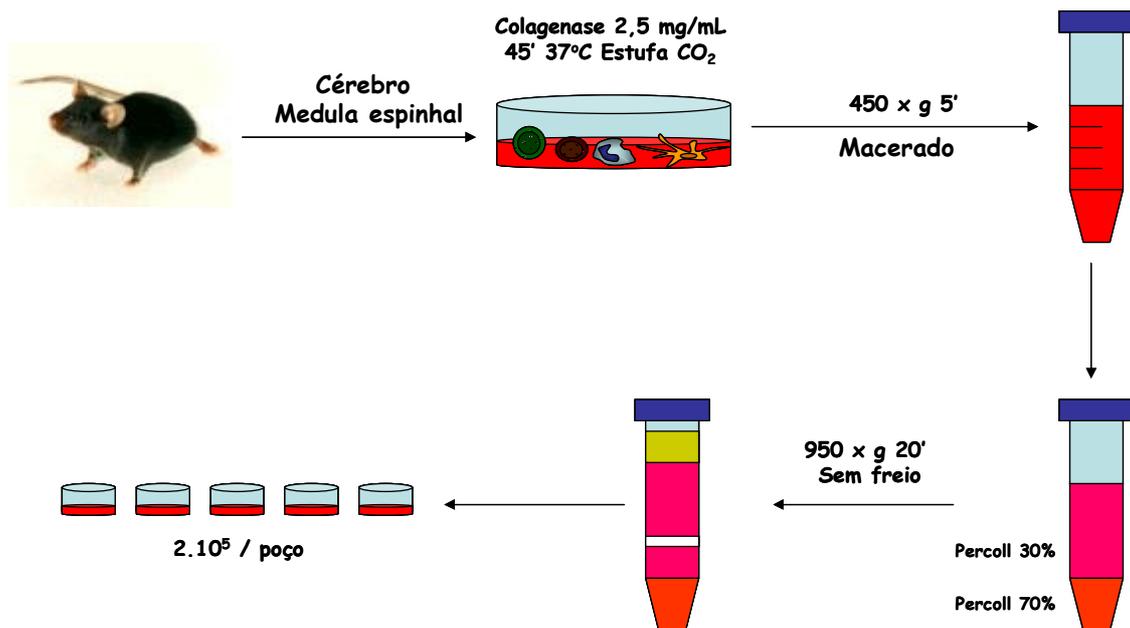
3.5 Citometria de Fluxo

Para avaliar a expressão de moléculas de superfície, as células obtidas foram incubadas com 1:100 de anticorpo monoclonal anti-CD16/32 eBioscience® durante trinta minutos a 4°C. A seguir, as células foram incubadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromo (FITC, PE ou APC) específicos para as moléculas de superfície de interesse por 30 minutos também a 4°C. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais da marca ebioscience® para a marcação das populações desejadas: anti-CD4 (0,5µg/10⁶ células), anti-CD11c (0,5µg/10⁶ células), anti-CD11b (0,5µg/10⁶ células), anti-CD25 (0,5µg/10⁶ células), anti-CD62L (0,5µg/10⁶ células), anti-CD45 (0,5µg/10⁶ células), anti-CD103 (0,5µg/10⁶ células), anti-PD1 (0,5µg/10⁶ células), anti-GITRL (0,5µg/10⁶ células), anti-GITR (0,5µg/10⁶ células). Para as marcações anti-LAP foram utilizados anticorpos monoclonais anti-human LAP biotinizados com reatividade cruzada para camundongos (0,25 µg/10⁶ células) R&D System®. Foram utilizados os anticorpos monoclonais dos seguintes isótipos: IgG2a e IgG2b de rato e IgG1 e IgG2 de hamster. Para a análise da expressão de Foxp3 intracelular pelas células T CD4+CD25+ foi utilizado o kit comercial anti-mouse/rat Foxp3 (eBioscience®) clone FJK- 16s (0,75µg/10⁶ células). Após o período de incubação, as amostras foram lavadas com PBS contendo 3% de soro fetal bovino (SFB) e ressuspensas em 300µl do mesmo tampão. A aquisição e análise das amostras foram realizadas em citômetro de fluxo FACScalibur (Becton & Dickinson, Mountain View, CA), utilizando-se o software CellQuest (Apple). Para citometria de fluxo das células de sangue periférico os animais eram sangrados pela cauda e cerca de 2-4 gotas de sangue eram retiradas em tubos eppendorf contendo citrato de sódio. O sangue era então centrifugado a 450 X g 5', o sobrenadante descartado e as hemácias lisadas com 200 µLs de tampão de lise durante 5 minutos. As células eram então lavadas e centrifugadas novamente e as células ressuspensas em 25 µL de solução contendo os anticorpos desejados em uma diluição

1:500 durante 30 minutos a 4°C. As células eram então lavadas novamente e levadas ao citômetro de fluxo.

3.6 Obtenção de Células do SNC

As células mononucleares infiltrantes do SNC foram obtidas segundo esquema abaixo. Brevemente, após sacrifício dos animais em câmara de CO₂, cérebros e medula espinhal foram retirados, cortados com tesoura e colocados em placas de Petry contendo 2,5 mg/mL de colagenase D (Roche®) em 4 mLs de HBSS mantidos durante 45 minutos em estufa de CO₂ a 37°C. Após este período de incubação as amostras foram processadas em *cell strainers* e transferidas para tubos de com 15 mLs de HBSS. Os tubos então foram centrifugados a 450 X g 5' a 4°C. O pellet então foi ressuscitado em 6 mLs de Percoll (Sigma®) a 37%. Esta suspensão foi então adicionada lentamente sobre Percoll 70% em tubos de 15 mLs e centrifugados a 950 X g 20' a 4°C em centrífuga com o freio desativado. Ao fim da centrifugação a fase superior contendo grande concentração de mielina é coletada por sucção e desprezada. O anel contendo células mononucleares é coletado e transferido a tubos de 15 mLs adicionadas de HBSS gelado. As células foram então centrifugadas a 450 X g 5' a 4°C. O pellet foi ressuscitado em 1 mL de meio DMEM completo. As células foram então contadas e utilizadas como desejado.



3.7 PCR em tempo real

Para realização do PCR em tempo real as células de linfonodo, baço ou SNC foram obtidas e 1×10^6 células foram colocadas em tubos eppendorfs DNase RNase free. As células foram então submetidas ao protocolo de extração de RNA da marca Qiagen®. Brevemente as células foram lisadas com 600 µL de tampão RLT fornecido pelo kit. As amostras foram então colocadas em colunas de sílicas e rodadas a 10 000 X g por 2 minutos. O *flow-through* é descartado e então adicionado à coluna etanol 70%. Os tubos são então homogeneizados vigorosamente e novamente centrifugados a 10 000 X g durante 10s. Novamente o *flow-through* é descartado e às colunas é adicionado 600 µL tampão RW1 e centrifugadas nas mesmas condições. O *flow-through* é novamente descartado e 500 µL de tampão RPE é adicionado às colunas e estas centrifugadas a 10000 X g por 2 minutos. As colunas são agora transferidas a um novo tubo coletor. Às colunas é acrescentado 40 µL de água e centrifugadas a 10 000 X g por 1 minuto. Agora o *flow-through* contendo o RNA é coletado. Para síntese do cDNA as amostras contendo o RNA foram dosadas sendo utilizadas 400µg de RNA por amostra para a síntese de cDNA. As amostras foram submetidas ao protocolo de síntese de cDNA one-step RT-PCR da Applied Biosystems® segundo fabricante. Para a realização do PCR em tempo real, foi utilizado o kit Taqman Fast Universal Master Mix, também da Applied Biosystems ®. 1µL de cada primer, 3 µL de amostra contendo o cDNA, 5µL de água e juntamente com 10µL de *master mix* Taqman® eram colocados em placas de 96 poços, seledas e levemente centrifugadas. As placas eram então levadas ao termociclador Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR System® onde as reações levavam 30 minutos para ficarem prontas. As curvas eram então normalizadas à expressão de GAPDH e utilizadas como desejado.

Foram utilizados os seguintes pares de *primers* da Applied Biosystems®.

IL-6- Ref Mm 00446190_m1

IL-10- Ref Mm00439616_m1

IL-17- Ref Mm00439619_m1

3.8 Análise Histopatológica.

Animais de ambos os grupos foram sacrificados ao dia escolhido e as medulas espinhais foram extraídas e colocadas em paraformaldeído 4% durante 24 horas. Após esse período, as medulas eram então extraídas manualmente de dentro das vértebras. Estas eram posteriormente mantidas em álcool a 70% até serem processadas. Para o processamento e corte, as amostras eram colocadas em suportes plásticos e submetidas ao congelamento em nitrogênio líquido mantidas em matriz O.C.T. que permitia o congelamento e corte ao micrótomo. Após o congelamento as amostras eram cortadas ao micrótomo em cortes de 7 μ m, colocadas sobre a lâmina e submetidas à coloração por hematoxilina e eosina.

3.9 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do *software* computacional *Graphpad Prism* (*Graphpad Software Incorporation*[®]) versão 4.0. Os testes t-Student e ANOVA foram utilizados, seguidos pelo teste de Tukey ou Mann-Whitney. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Os dados foram apresentados como média \pm desvio padrão ou média \pm erro padrão nas curvas de doença.

4 RESULTADOS

4.1 Tolerância Oral Suprime o Grau de EAE em Animais C57Bl/6.

Resolvemos iniciar nossos estudos através da análise do grau de EAE presente em nossos animais C57Bl/6 tratados ou não oralmente com MOG 35-55 e posteriormente imunizados com o mesmo antígeno, de acordo com materiais e métodos. Como esperado, podemos observar na figura 1 que a indução de tolerância oral foi capaz de suprimir o grau de EAE quando comparamos as curvas de ambos os grupos (Two-way ANOVA $p < 0,01$). Além disso, percebe-se que os animais tratados oralmente com MOG 35-55 nunca alcançam os mesmos níveis de EAE que os animais controle, mesmo durante o pico da doença (Controle = $3,0 \pm 0,5$ Vs. Tolerados = $2,0 \pm 0,5$). Além disso, após análise histopatológica ao dia 16 pós-imunização, podemos também observar na figura 2 que os animais tratados com PBS apresentam focos de infiltrado inflamatório, os quais não são observados nos animais tratados com MOG 35-55 pela via oral.

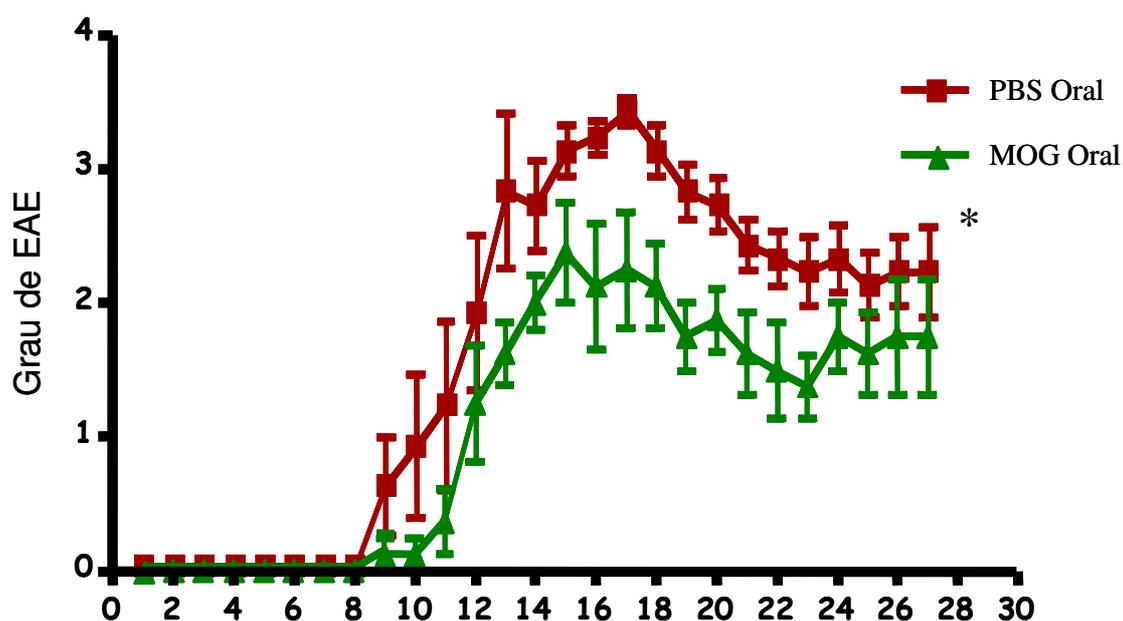


Figura 1: Curva de EAE. Animais C57Bl/6 foram tratados ou não oralmente com MOG 35-55, imunizados e acompanhados diariamente por 27 dias e graduados segundo materiais e métodos. $n=5$. Os dados mostram média \pm EP. * Two-way ANOVA $p < 0,01$.

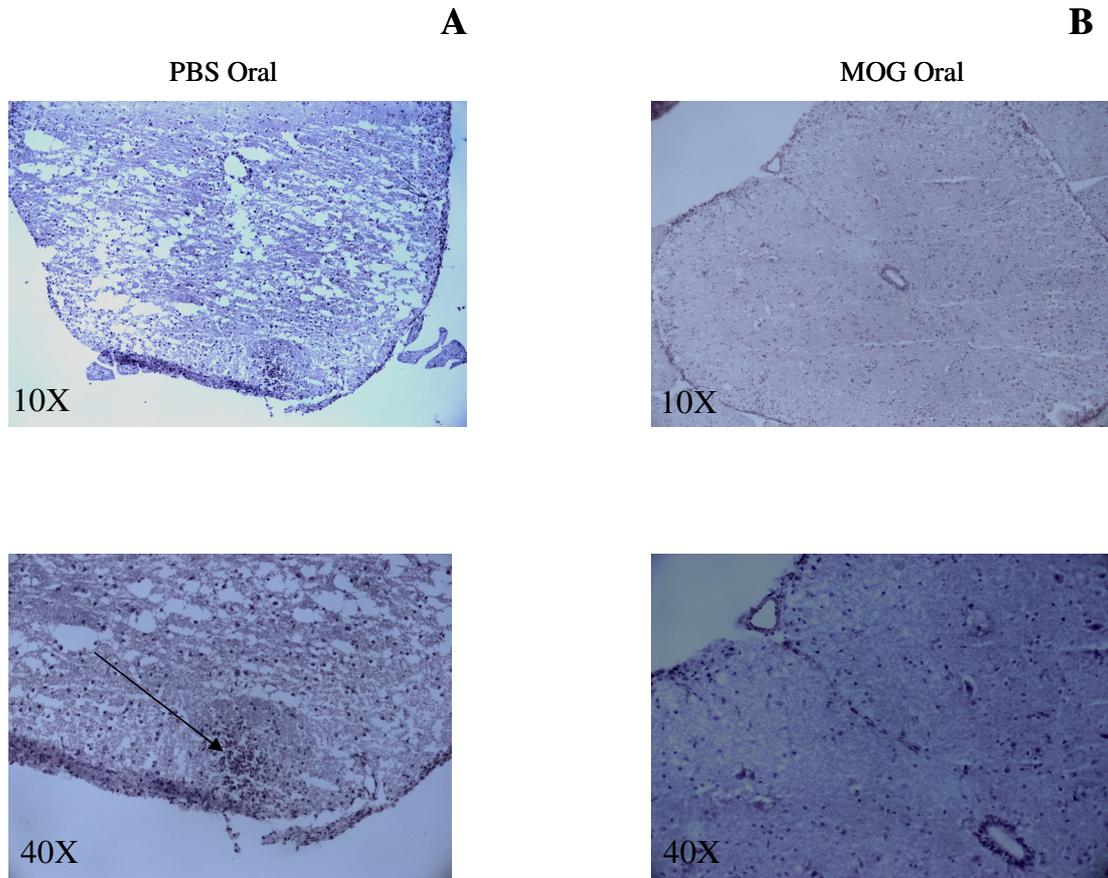


Figura 2: Análise histopatológica ao dia 16 pós-imunização. Animais C57BL/6 foram tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos. Ao dia 16 pós-imunização os animais foram sacrificados e as colunas cervicais obtidas, processadas e coradas com hematoxilina e eosina. n=5. Em A animais controle e em B animais submetidos a toerância oral. A seta indica infiltrado inflamatório.

4.2 Tolerância Oral Suprime a Linfoproliferação de Células de Baço e Linfonodos de Animais com EAE.

Como já descrito na literatura, a tolerância oral é caracterizada pela ausência de resposta imune a um determinado antígeno quando este é introduzido pela via oral e posteriormente utilizado como imunógeno pela via parenteral. Já tem sido descrito que a tolerância oral não só é capaz de suprimir a proliferação de células T [105], como também suprimir de forma hierárquica a produção de anticorpos, como IgG e IgE em modelo de asma experimental [113]. Sendo assim resolvemos realizar concomitante aos outros experimentos, ensaios de linfoproliferação no baço e linfonodos dos animais submetidos ou não ao tratamento oral. Juntamente dos dados de linfoproliferação, avaliamos as curvas de EAE, a qual nos mostra que os animais tolerados apresentam uma doença mais branda quando comparados aos animais controle (Figura 1). Sendo assim temos dois parâmetros distintos para confirmarmos que nossos animais estavam realmente tolerizados.

Como demonstrado na figura 3A, a capacidade linfoproliferativa das células obtidas dos linfonodos drenantes, assim como do baço dos animais submetidos ao regime de tolerância oral esta diminuída ao dia 10 pós-imunização. Os dados foram obtidos através da re-estimulação *in vitro* com 0, 10 e 100 µg/mL de MOG 35-55. Todavia, quando avaliamos esse fenômeno ao dia 16 pós-imunização, não observamos mais diferença entre os grupos. Podemos observar também na figura 3B que esses dados se repetem quando re-estimulamos as culturas *in vitro* com 1µg/mL de anti-CD3.

Sendo assim, nossos dados são corroborados pelos da literatura, que mostram que a tolerância oral é capaz de suprimir a proliferação de linfócitos T de forma antígeno específica no caso do estímulo com MOG 35-55, mas também de forma policlonal, quando estimulamos com anti-CD3. Além disso, nossos dados nos mostram que, ou esse mecanismo supressor se perde ao dia 16 pós-imunização.

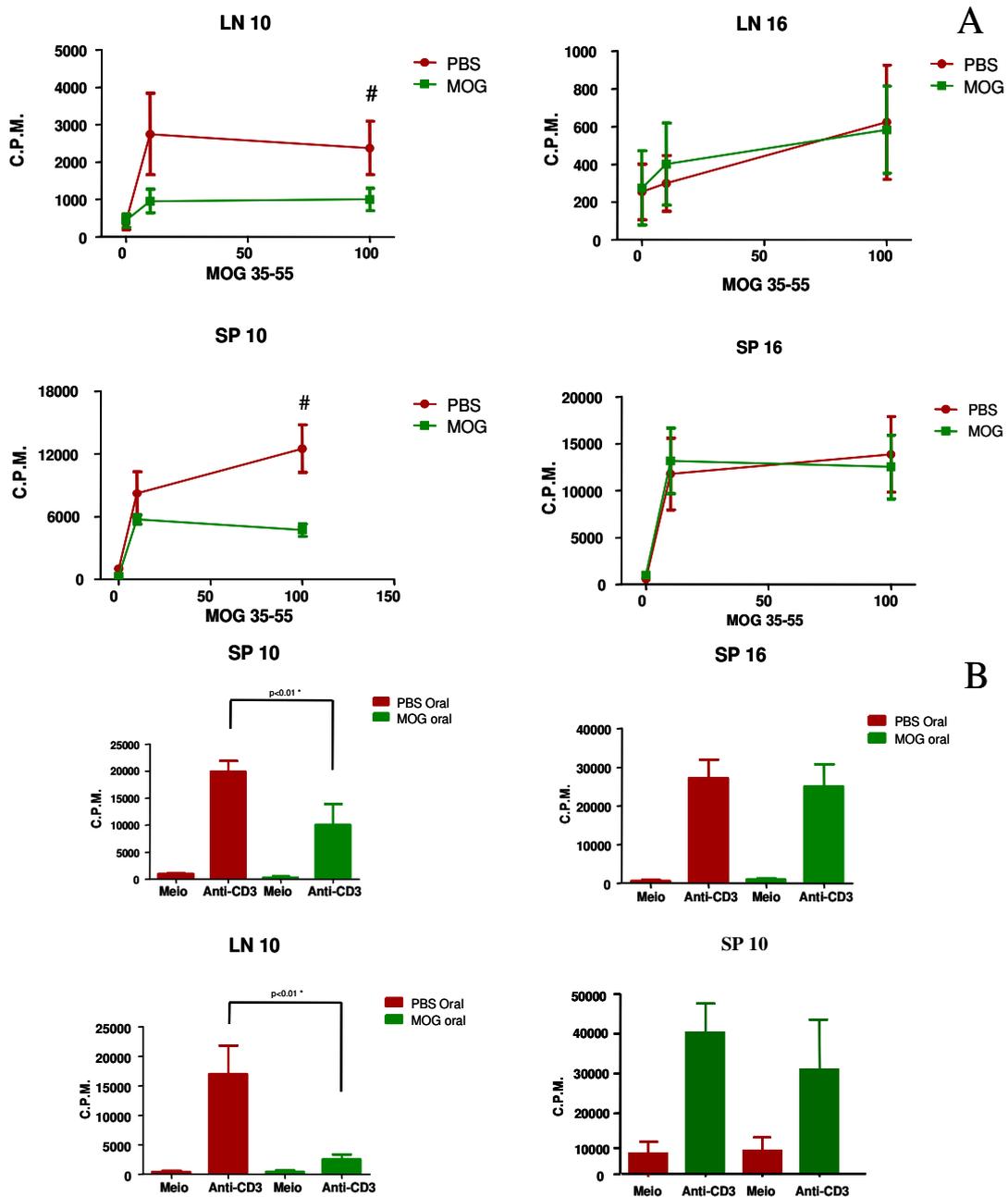


Figura 3: Resposta linfoproliferativa em linfonodos e baço de animais com EAE aos dias 10 e 16 pós-imunização. Animais C57BL/6 foram tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos. Aos dias 10 e 16 pós-imunização os animais foram sacrificados e células totais de linfonodo e baço foram plaqueadas para avaliação da resposta linfoproliferativa frente a estímulo com MOG e anti-CD3. n=5. Os gráficos mostram média \pm DP. * test-t de Student #Two-way ANOVA. * # p<0,01.

4.3 Tolerância não Altera a Porcentagem de Linfócitos Totais, T CD4⁺ e Monócitos no Sangue Periférico de Animais com EAE.

Como pouco tem se descrito sobre alterações nas populações celulares do sangue periférico em animais imunizados com MOG 35-55 que sofreram ou não a indução de tolerância oral, resolvemos iniciar nossos estudos avaliando por citometria de fluxo alterações nas populações de linfócitos e monócitos nesses animais ao dia 5 e 8 pós-imunização. Tais pontos foram escolhidos por se tratarem daqueles nos quais os linfócitos T ativados nos linfonodos drenantes do sítio da imunização estão emigrando para o órgão alvo.

Através da citometria de fluxo, baseado nas características de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC), analisamos as populações de linfócitos e monócitos. Como ilustrado na figura 1, porém, não observamos alteração na porcentagem de linfócitos totais quando comparamos os animais que sofreram o tratamento oral com aqueles do grupo controle ao dia 5 pós-imunização. Da mesma forma, tal parâmetro não se alterou ao dia 8, a despeito de ambos os grupos apresentarem uma menor porcentagem de linfócitos circulantes nessa data.

Quando a população de monócitos é avaliada (Figura 1), da mesma forma que para a população de linfócitos, não observamos alterações significativas nas concentrações desta população, tanto para o dia 5 como para o dia 8 pós-imunização.

Devido à importância das células T CD4 tanto na EAE como no processo de tolerância oral, resolvemos também avaliar as porcentagens de células T CD4 nas mesmas datas pós-imunização. Nossos resultados não mostraram alterações significativas na concentração desta população quando comparamos os grupos. Todavia, da mesma forma que para os linfócitos totais, observamos uma ligeira queda na porcentagem de CD4 em ambos os grupos ao dia 8 pós-imunização (Figura 2).

Nosso próximo passo foi avaliar também a expressão de marcadores de ativação na população de linfócitos T CD4, como ilustrado nas figuras 3. Para tanto, utilizamos o CD62L (L-Selectina). CD62L é uma molécula de adesão que possui implicação em uma série de eventos celulares, entre eles o de migração e manutenção de células T *naive* dentro de linfonodos, apresentando por isso papel bastante importante na indução de EAE. Um exemplo disso é o fato de que camundongos CD62L KO não são capazes de desenvolver uma EAE clássica. Isso devido a um número diminuto de células T na periferia [114]. O intuito era observar se há diferenças no estado de ativação das células T CD4 entre os grupos avaliados, observando por citometria de fluxo a diminuição na média da intensidade de fluorescência do CD62L que é característica de células T ativadas.

A despeito de acharmos possível encontrarmos alterações na expressão desta molécula, nossos resultados não apresentaram diferenças significativas na ativação das células T CD4, sendo que tanto para o dia 5 como para o dia 8 pós-imunização a expressão de CD62L entre os dois grupos não foi diferente. Todavia observamos que essas células se apresentavam mais ativadas ao dia 8 em relação ao dia 5 (Figura 3).

Em suma, nossos dados nos mostraram que o fenômeno da tolerância oral não é capaz de alterar as porcentagens de linfócitos totais, T CD4, tampouco de monócitos no sangue periférico dos animais após imunização para EAE. Sendo assim, aparentemente a análise do sangue periférico através de citometria de fluxo não um bom parâmetro para avaliarmos o fenômeno da tolerância oral.

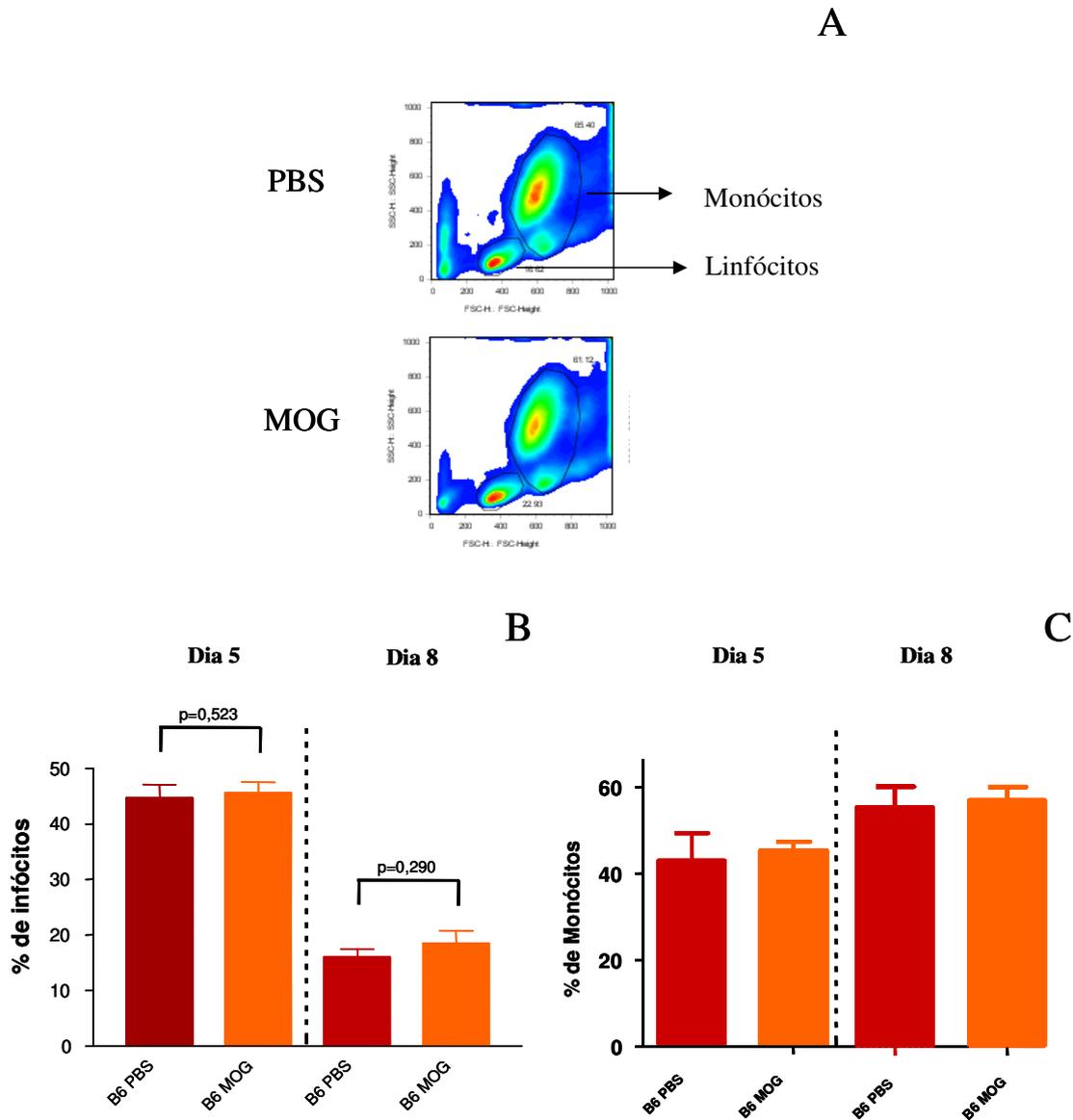


Figura 4: Porcentagem de linfóclitos e monóclitos no sangue periférico ao dia 5 pós-imunização. Animais C57BL/6 foram tratados ou não oralmente com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos. Ao dia 5 e 8 pós-imunização animais foram sangrados pela cauda e gotas de sangue foram utilizadas para análise por citometria de fluxo da população de linfóclitos e monóclitos segundo FSC X SSC. Em **A** pseudo-color plots representativo mostrando os respectivos gates. Em **B** as porcentagens de linfóclitos totais e **C** as porcentagens de monóclitos. Gráfico representativo de 2 experimentos independentes. n=5. Os gráficos mostram média \pm DP. Teste t-student.

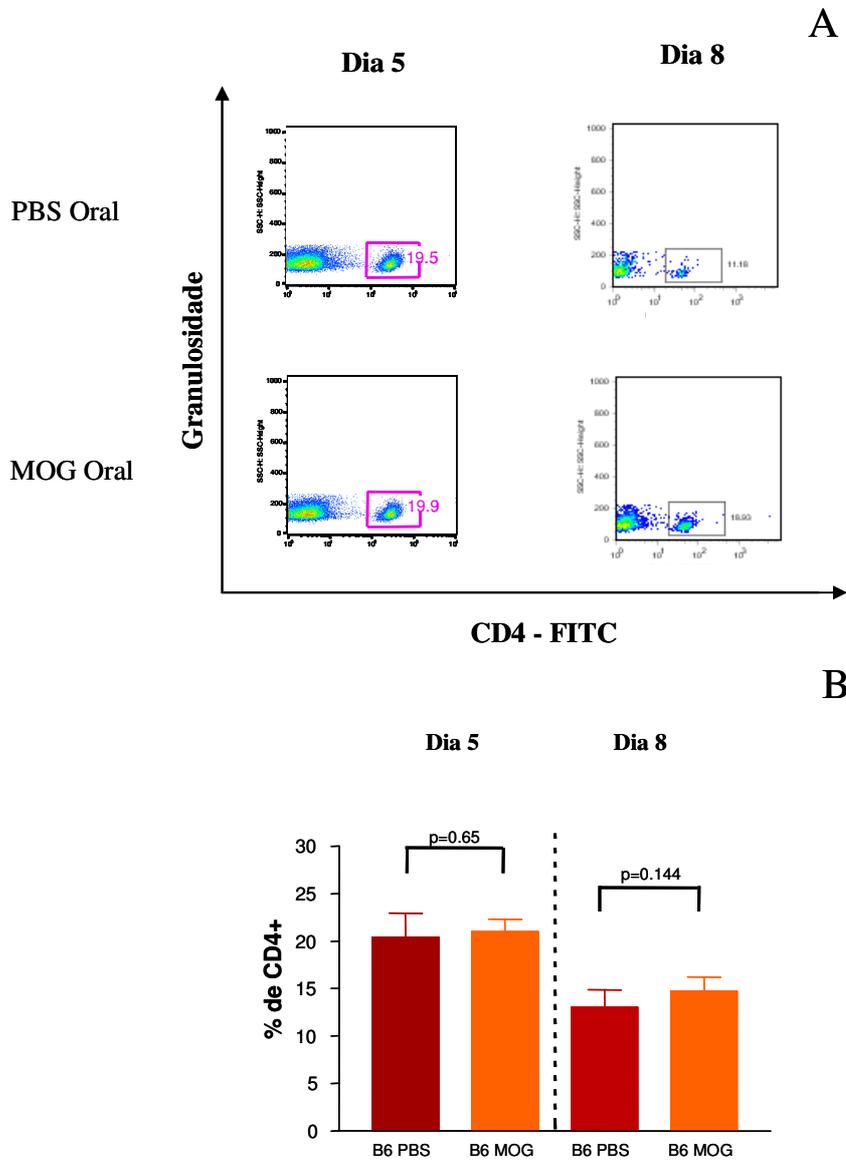


Figura 5: Porcentagem de linfócitos T CD4 ao dia 5 e 8 pós-imunização. Animais C57BL/6 foram tratados ou não oralmente com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos. Ao dia 5 e 8 pós-imunização animais foram sangrados pela cauda e gotas de sangue utilizadas para análise por citometria de fluxo de acordo com a expressão de CD4 (anti-CD4 FITC). Em A pseudo-color plots mostrando gate em CD4. Em B gráfico representativo de 2 experimentos mostrando a média das porcentagens de linfócitos T CD4. $n=5$. Os gráficos mostram média \pm DP. Teste t-student.

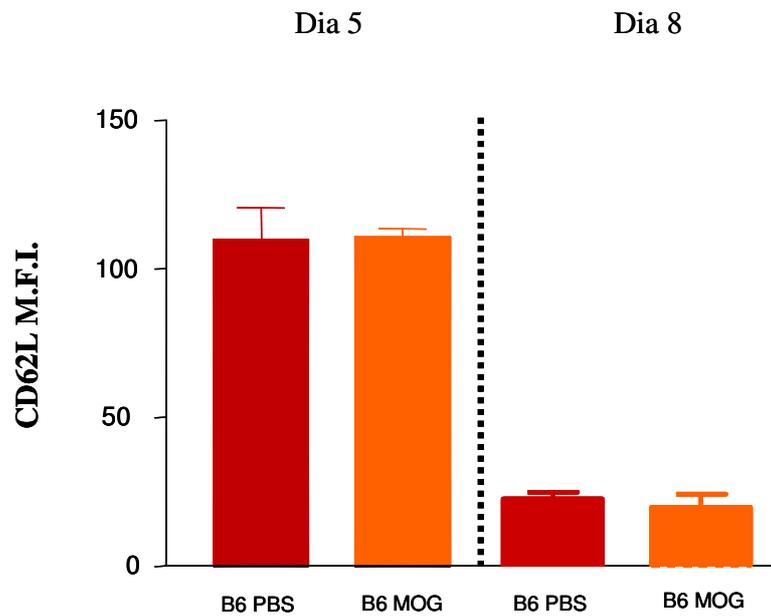


Figura 6: Expressão de CD62L por células T CD4 ao dia 5 e 8 pós-imunização. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos. Ao dia 5 e 8 pós-imunização animais foram sangrados pela cauda e gotas de sangue utilizadas para análise por citometria de fluxo de acordo com a expressão de CD62L (anti-CD62L FITC). Em A gráfico representativo de 2 experimentos mostrando a média das intensidades de fluorescências. n=5. Os gráficos mostram média \pm DP. Test-t student.

4.3 Análise por Citometria de Fluxo em células de Baço e Linfonodo Mesentérico

Na busca por alterações nas populações celulares, assim como em marcadores de ativação que possam estar presentes após indução de tolerância oral, resolvemos avaliar através de citometria de fluxo a análise de alguns desses fatores em células de baço ao dia 10 pós-imunização. Escolhemos o dia 10 pós-imunização por se tratar de um ponto no qual há diferenças significativas, tanto no *score* de EAE como nos dados de linfoproliferação, sendo assim um ponto no qual o fenômeno de tolerância se encontra no seu auge.

Dentre os marcadores de ativação, resolvemos avaliar novamente a expressão de CD62L assim como a expressão de CD25, a cadeia alfa do receptor de IL-2. Quando analisamos a expressão de CD25, não observamos diferenças entre os grupos, sendo que ambos apresentam cerca de 10% de células T CD4 positivas para CD25. Da mesma forma que para o sangue periférico, não encontramos diferenças nas médias de fluorescência da expressão de CD62L agora nas células obtidas do baço. Em suma, não são observadas alterações significativas nos níveis de ativação de células T CD4 entre os grupos (Figura 7).

Um outro marcador celular que tem sido amplamente estudado recentemente e tem sua expressão relacionada à supressão da resposta imune é o PD-1 (*Programmed Cell-Death 1*) [115]. Tendo em vista a capacidade supressora do fenômeno da tolerância oral, especulávamos que tal receptor pudesse ter relevância durante esse processo. Nossos dados nos mostraram não haver diferenças entre os grupos, a despeito de uma sutil tendência de haver mais PD-1 expresso nas células T CD4 dos animais tolerados oralmente (PBS=41,0 Vs. MOG 35-55=49,04) (Figura 7). Todavia como não testamos funcionalmente o papel deste receptor, não podemos descartar a relevância do mesmo durante o fenômeno.

Tendo em vista também a importância das células dendríticas durante a tolerância oral, como já citado anteriormente [93, 94], resolvemos avaliar a expressão de GITRL em

tal população. O GITRL é ligante de uma molécula da superfamília do TNF chamado GITR (*Glucocorticoid-Induced TNF Receptor*), e que possui papel importante na atividade das células T reguladoras, sendo também uma molécula importante na manutenção da auto-tolerância [30,31]. Após avaliarmos nossos dados observamos que a tolerância oral não acarreta em diferença na expressão de GITRL nas células dendríticas extraídas do baço ao dia 10 pós-imunização (Figura 8). Apesar da importância de células macrofágicas CD11b⁺ no fenômeno de tolerância como tem sido demonstrado atualmente[116], não observamos alterações em suas porcentagens no tempo por nós avaliado.

A despeito de um grande número de trabalhos terem demonstrado aumento de algumas populações celulares após o tratamento oral, não observamos grandes diferenças ao dia 10 pós-imunização. Dentre estas populações já descritas como importantes durante a tolerância oral, podemos citar as células CD4⁺LAP⁺ [98]. A molécula LAP (*Latency Associated Peptide*) é uma molécula precursora de TGF- β presente na superfície de algumas células T e tem papel importante em alguns fenômenos de tolerância, dentre eles o de tolerância oral [80]. Todavia, quando avaliamos a expressão desta nas células T CD4 de baço ao dia 10 pós-imunização, não observamos diferença entre os grupos avaliados (Figura 8). Provavelmente esta diferença se explica pelo fato dos animais estarem imunizados, além disso, é provável que ao dia 10 pós-imunização as células já tenham recirculado.

Além destas, também avaliamos a presença de células T reguladoras utilizando animais Foxp3–GFP KI. Os animais seguiram o mesmo protocolo dos animais *wild-type*, sendo imunizados ao dia 0 e sacrificados ao dia 10 como descrito nos materiais e métodos. Nossos resultados carecem de diferenças na porcentagem de células Foxp3 – GFP⁺ no baço dos grupos avaliados (Figura 8). Todavia, assim como já demonstrado na literatura, observamos nos linfonodos mesentéricos um aumento significativo desta população após o tratamento oral com MOG 35-55 ao dia 0. Nesse experimento utilizamos camundongos convencionais (Figura 9).

Recentemente tem-se descrito a importância de células CD103⁺ tanto no fenômeno da tolerância oral [100] como na conversão de células T *naive* em células T reguladoras na periferia em um mecanismo dependente de ácido retinóico [99]. Nesse contexto, resolvemos comparar diferenças nas células TCD4⁺CD103⁺ entre os grupos. Contudo, a despeito de acharmos que a tolerância oral seria capaz de induzir a expressão de CD103 em células T CD4, tal especulação não se concretizou, sendo que de forma diferente que para os linfonodos mesentéricos, não observamos diferenças entre os grupos (Figura 8).

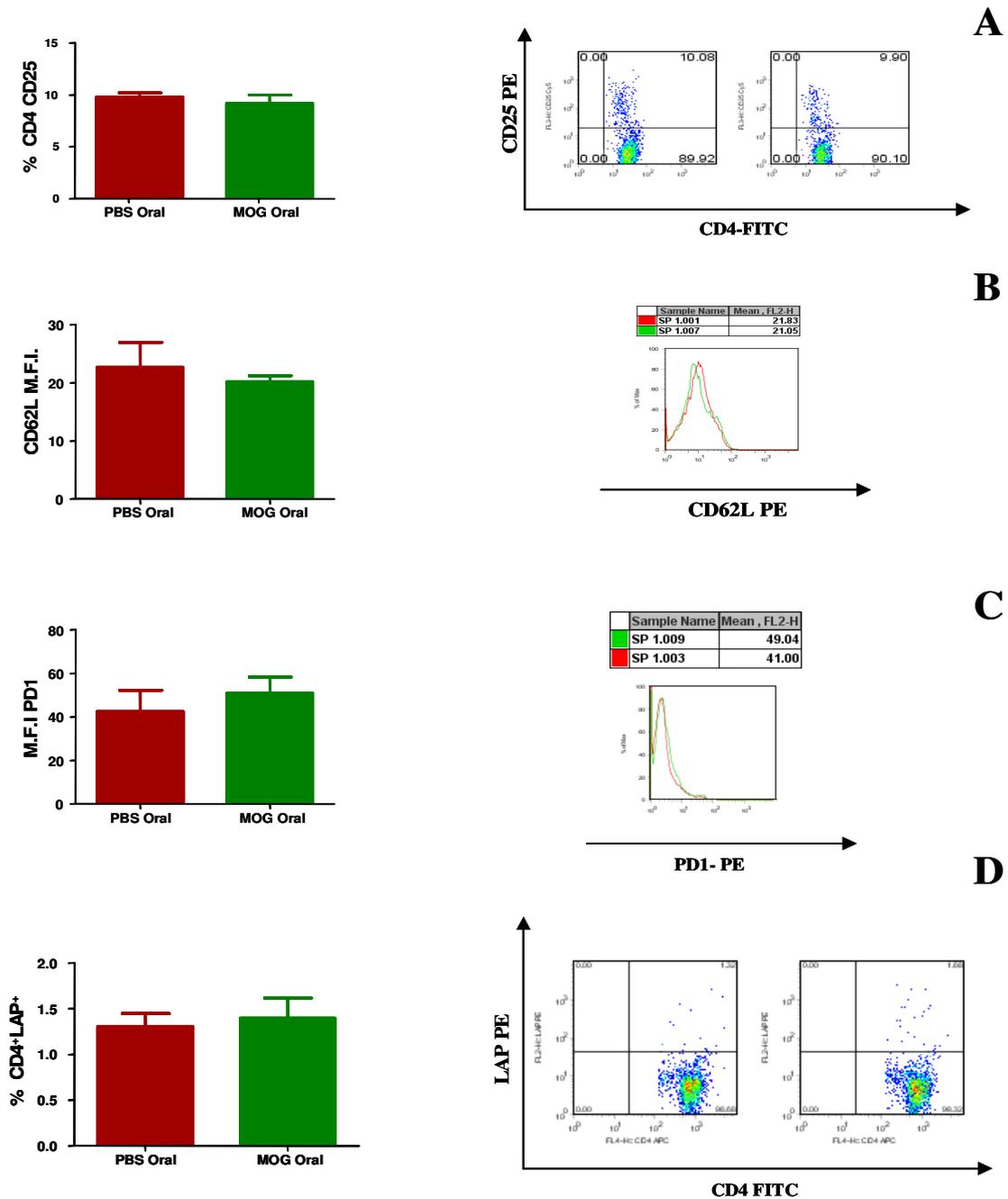


Figura 7: Citometria de fluxo de esplenócitos dos animais com EAE ao dia 10 pós-imunização. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células de baço foram obtidas e avaliadas quanto à expressão de: A) CD4CD25, B) CD62L, C) PD1, D) CD4LAP. *Pseudo-color plots* de um experimento indicando os *gates* utilizados. n=5. Dado representativo de 3 experimentos independentes. Test t de Student.

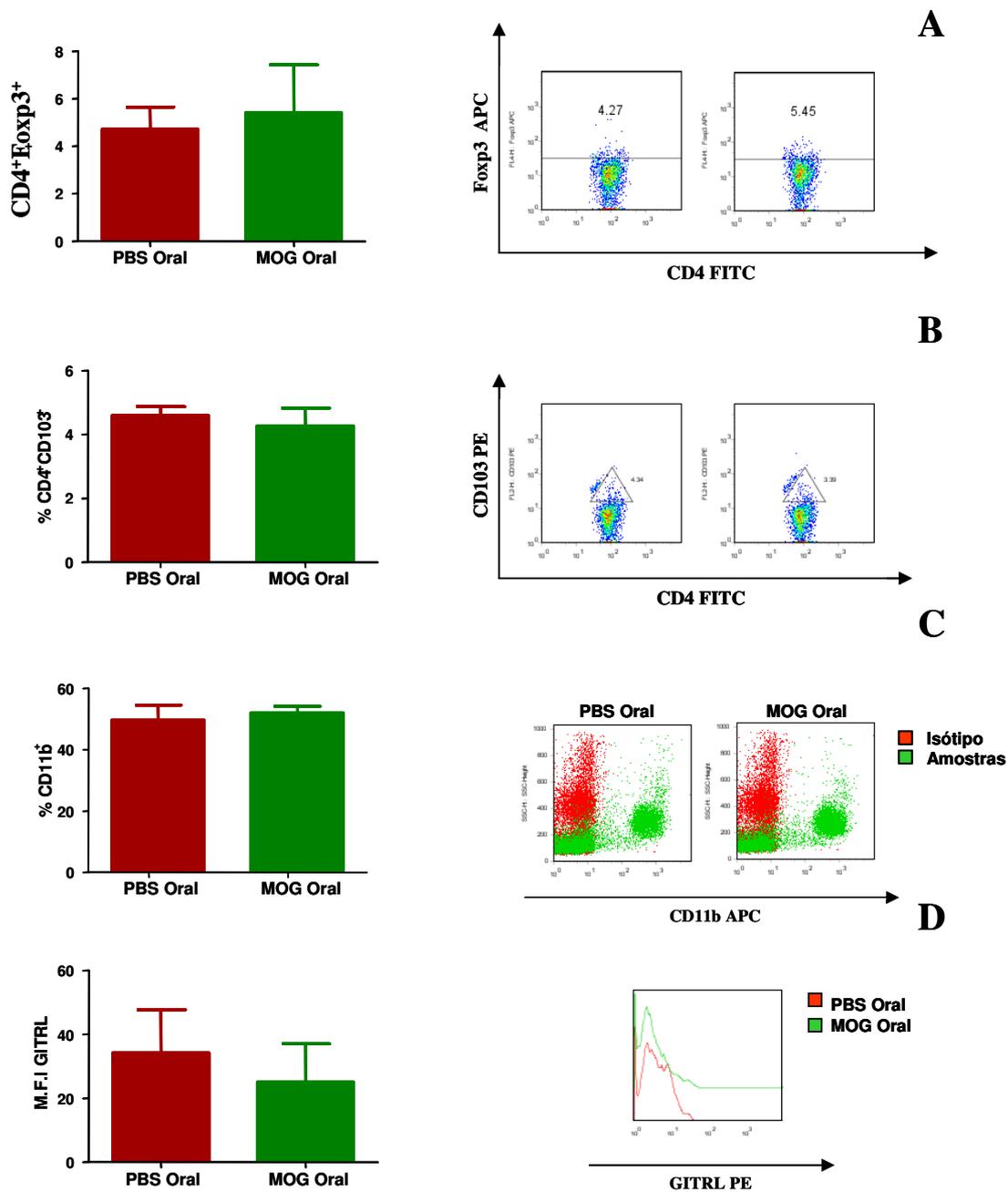


Figura 8: Citometria de fluxo no baço dos animais com EAE ao dia 10 pós-imunização. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células de baço foram obtidas e avaliadas quanto à expressão de: A) CD4Foxp3, B) CD4CD103, C) CD11b, D) GITRL. *Pseudo-color plots* de um experimento indicando os *gates* utilizados. n=5. Dado representativo de 3 experimentos independentes. Test t de Student.

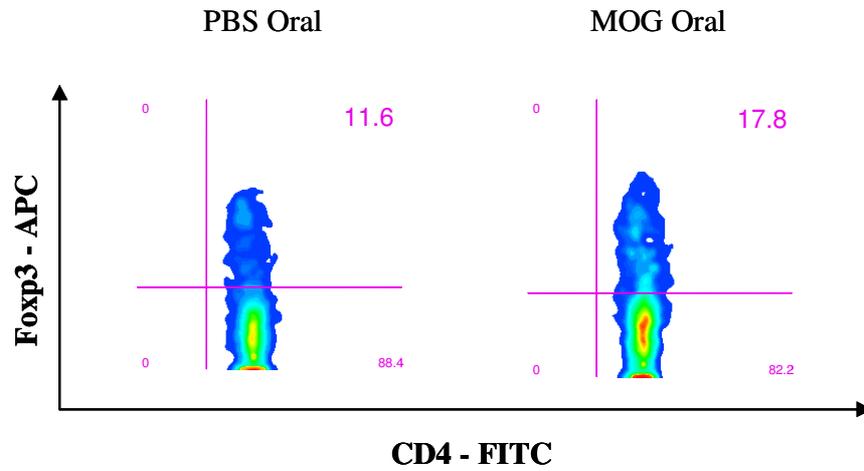


Figura 9: Citometria de fluxo em células de linfonodo mesentérico de animais tratados ou não com MOG 35-55 após o tratamento. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 foram sacrificados após o tratamento no dia em que seriam imunizados. Células de linfonodo mesentérico foram obtidas analisadas por citometria de fluxo segundo expressão de CD4 (anti-CD4 FITC) e Foxp3 (anti-Foxp3 APC). Dado representativo de 3 experimentos independentes. n=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Test t de Student.

4.4. Tolerância Oral Suprime a Transcrição e a Secreção de IL-17 nos Linfonodos Drenantes Além de Suprimir a Secreção de IL-6, CCL2 e IL-17 no SNC.

Devido à importância de uma série de citocinas descritas recentemente na patogênica da EAE, dentre elas a IL-6 e a IL-17 [63, 117], resolvemos avaliar como se encontra a produção destas citocinas nos animais tolerados oralmente comparados com os animais controle.

Como podemos observar na figura 10B, as células de linfonodo dos animais tratados com MOG 35-55 pela via oral apresentam uma menor quantidade de mRNA para IL-17 ao dia 10 pós-imunização. De forma interessante, não observamos diferenças nas mensagens para IL-6 ou IL-10. Quando avaliamos esses mesmos parâmetros agora em células extraídas do baço (Figura 10A), não observamos diferenças nas quantidades de mRNA para IL-17 tampouco para IL-10, a despeito de percebermos uma tendência de aumento desta citocina nos animais tolerados. Obtivemos, porém, um dado inesperado, no qual observamos um aumento na mensagem de mRNA para IL-6 no baço dos animais tolerados.

No intuito de confirmar esses dados, uma vez que sabemos que alterações pós-transcricionais podem ocorrer, o que significa que nem todo mRNA venha a ser traduzido em proteína, resolvemos avaliar através do método de ELISA as concentrações de IL-17 em células de baço e linfonodos também extraídas ao dia 10 pós-imunização e estimuladas *in vitro* com 50 µg/mL durante 72 horas. Nossos resultados confirmaram aqueles observados através do PCR em tempo real, sendo que observamos uma menor secreção de IL-17 pelas células obtidas dos linfonodos mas não naquelas obtidas do baço.

Nossos resultados nos mostram que, associado aos dados de linfoproliferação, onde os animais tratados com MOG 35-55 apresentam uma menor capacidade linfoproliferativa, estes também secretam menos IL-17 nos linfonodos drenantes, sendo então um fator de suma importância para se justificar a diminuição nos graus de EAE observados nesse grupo.

Com o objetivo de melhor compreender quais alterações ocorrem no órgão alvo durante a EAE após a indução de tolerância oral, decidimos avaliar em células mononucleares extraídas do SNC a produção de uma série de citocinas, tanto de padrão Th1 como Th2. Utilizando o método de *cytometric bead array*, avaliamos a secreção de citocinas como IL-4, 5, 10, IL-12p70, 13, IFN- γ , TNF- α e da quimiocina CCL2 *in vitro* após estimularmos as células com 1 μ g/mL de anti-CD3..

Nossos dados nos mostram, a despeito de acharmos que encontraríamos mais citocinas inflamatórias nos grupos controle, que não há diferença na produção de IL-10, IL-12p70, TNF- α e IFN- γ , quando comparamos os grupos. Mais interessante notar que as concentrações dessas citocinas não atingem níveis muito elevados. Além disso, não conseguimos detectar a presença de IL-4, 5 e 13 em nenhum dos grupos. Talvez pelo fato da EAE se caracterizar por uma doença com padrão classicamente Th1 (Figura 12).

De forma interessante porém, utilizando o mesmo método citado, encontramos uma menor produção espontânea de IL-6 pelas células extraídas do SNC (Figura 13). Quando comparamos as culturas estimuladas com anti-CD3 porém, não encontramos diferença. Tal resultado pode ser explicado pelo fato que as células T efetoras presentes no SNC durante a EAE são grandes produtoras de IL-6 [73]. Sendo assim, podemos inferir que a diferença observada entre os grupos, jaz no compartimento inato presente no local e não devido a produção de IL-6 pelas células T CD4.

Um outro fator de grande importância produzido tanto por células infiltrantes como por astrócitos e microglia, é a quimiocina CCL2, a qual é responsável por atrair principalmente macrófagos para dentro do sistema central, sendo importante na amplificação da inflamação *in situ*. Como demonstra a figura 13, as células extraídas do SNC dos animais tratados oralmente com MOG 35-55 secretam menos CCL2. O dado se confirmou tanto para a produção espontânea como após o estímulo com anti-CD3. De forma diferente que para a IL-6, é provável que CCL2 seja produzido somente pelo compartimento inato, justificando o fato da ausência do aumento desta após estímulo com anti-CD3.

Devido a grande importância já discutida anteriormente da IL-17 durante a EAE, e além disso, devido ao fato de termos observado uma menor produção da mesma por células de linfonodos drenantes dos animais tratados com MOG 35-55 oral, resolvemos também avaliar a produção desta citocina pelas células extraídas do SNC.

Como ilustrado pelo gráfico da figura 14, da mesma forma que para a IL-6 e CCL2, novamente observamos uma menor secreção de IL-17 pelas células extraídas do SNC dos animais tolerados oralmente quando re-estimuladas *in vitro* com doses crescentes de MOG 35-55. Vale ressaltar que as quantidades produzidas pelas células destes animais é cerca de 10-15 vezes menor daquelas produzidas pelo grupo controle. Vale ressaltar também que, diferente da IL-6 e CCL2, não observamos secreção espontânea de IL-17, demonstrando que essa é mesmo uma citocina derivada do compartimento específico do sistema imune, ou seja, linfócitos T. Logo, podemos perceber que o fenômeno de tolerância oral é capaz também de diminuir a quantidade produzida de IL- 17 tanto na periferia como no órgão alvo.

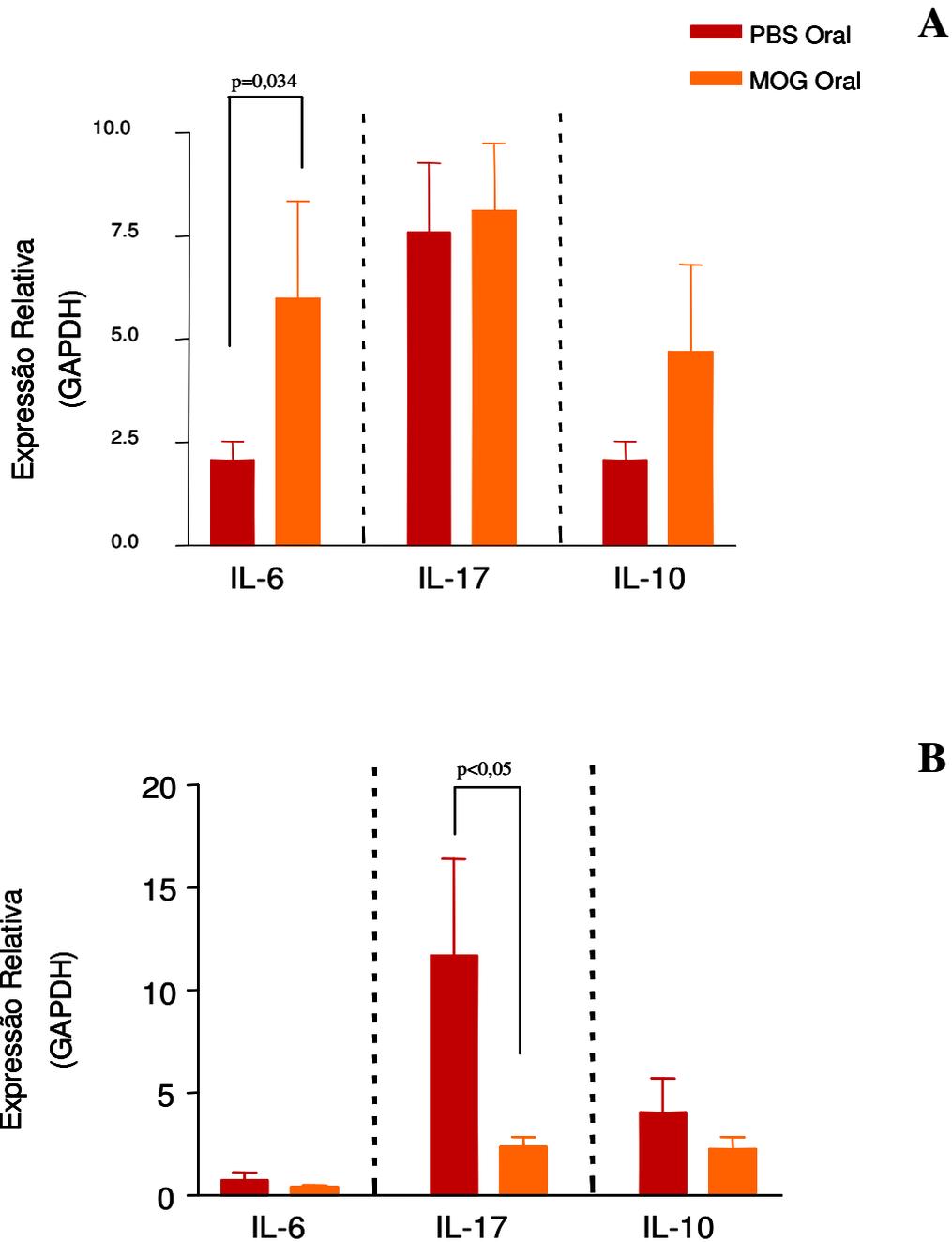


Figura 10: Dosagem de citocinas através de PCR em tempo real em células de linfonodo e baço ao dia 10 pós-imunização. Camundongos C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 pela via oral e imunizados segundo material e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização. Células de linfonodos e baço foram obtidas e submetidas a PCR em tempo real para análise das citocinas indicadas. n=5. Os gráficos mostram média \pm DP. Teste T-Student.

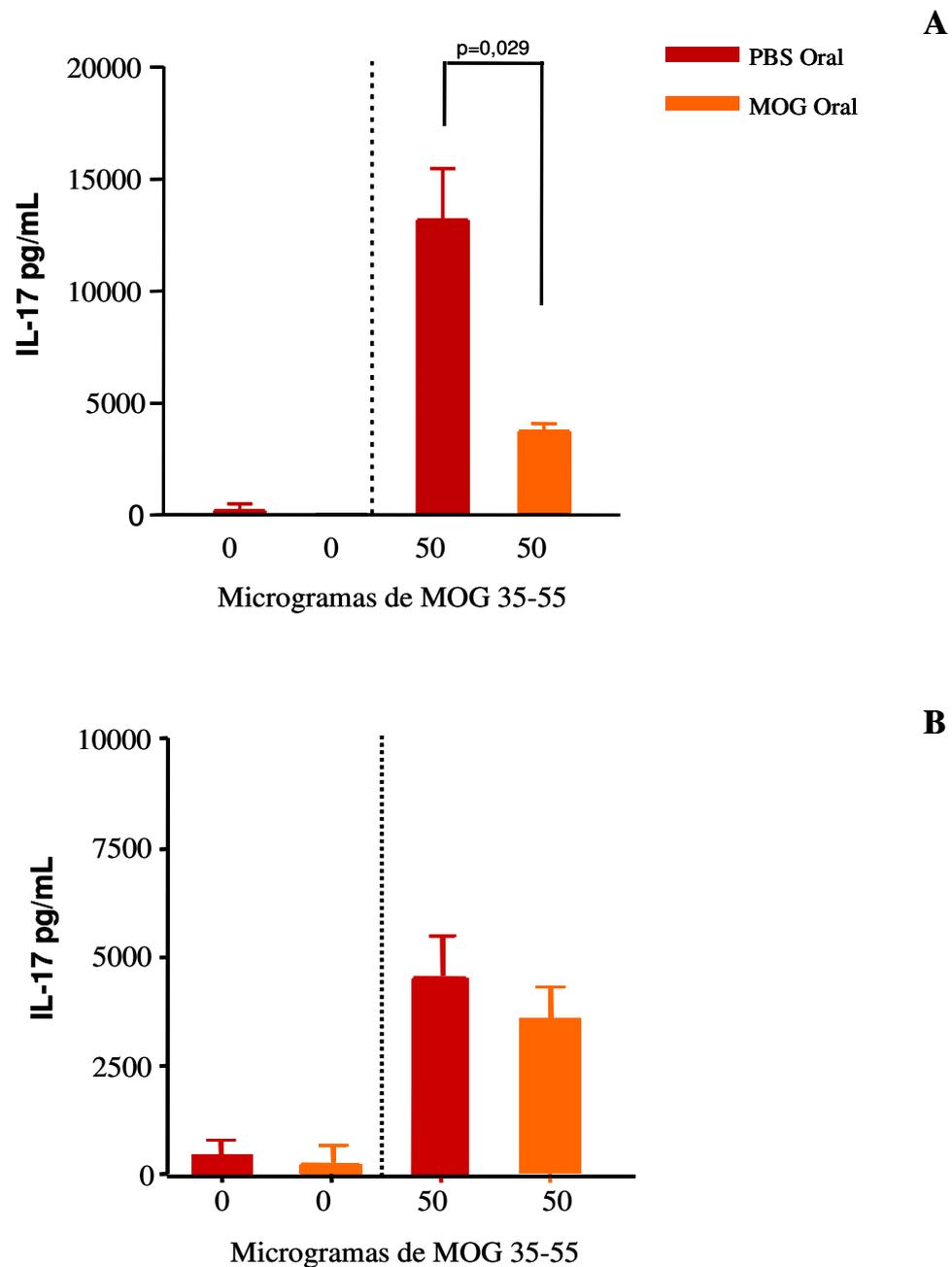
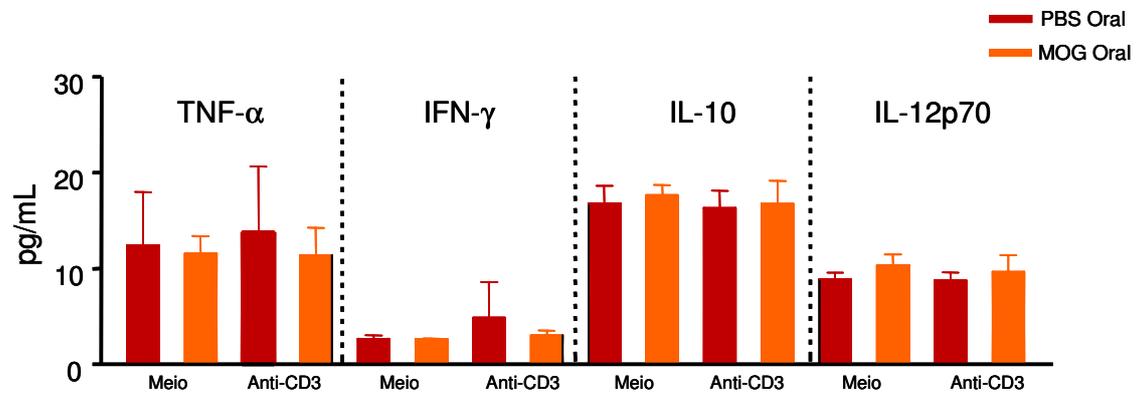


Figura 11: Produção de IL-17 por células de linfonodo e baço ao dia 10. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células de linfonodo e baço foram extraídas e re-estimuladas *in vitro* com MOG 35-55 na concentração indicada. Os sobrenadantes foram coletados após 72 horas e IL-17 dosada segundo o método de ELISA. Em A e B dosagem de IL-17 para em linfonodo e baço respectivamente. n=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t de Student.



Obs: IL-4 / 5 / 13 não foram detectadas..

Figura 12: Dosagem de citocinas produzidas por células mononucleares extraídas do SNC ao dia 10 pós-imunização. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células infiltrantes do SNC foram extraídas e re-estimuladas *in vitro* com 1 $\mu\text{g/mL}$ de anti-CD3. Os sobrenadantes foram coletados após 72 horas e as citocinas indicadas foram dosadas segundo o método de *Cytometric Bead Array*. Experimento representativo de 2 experimentos independentes. $n=5$. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t-Student.

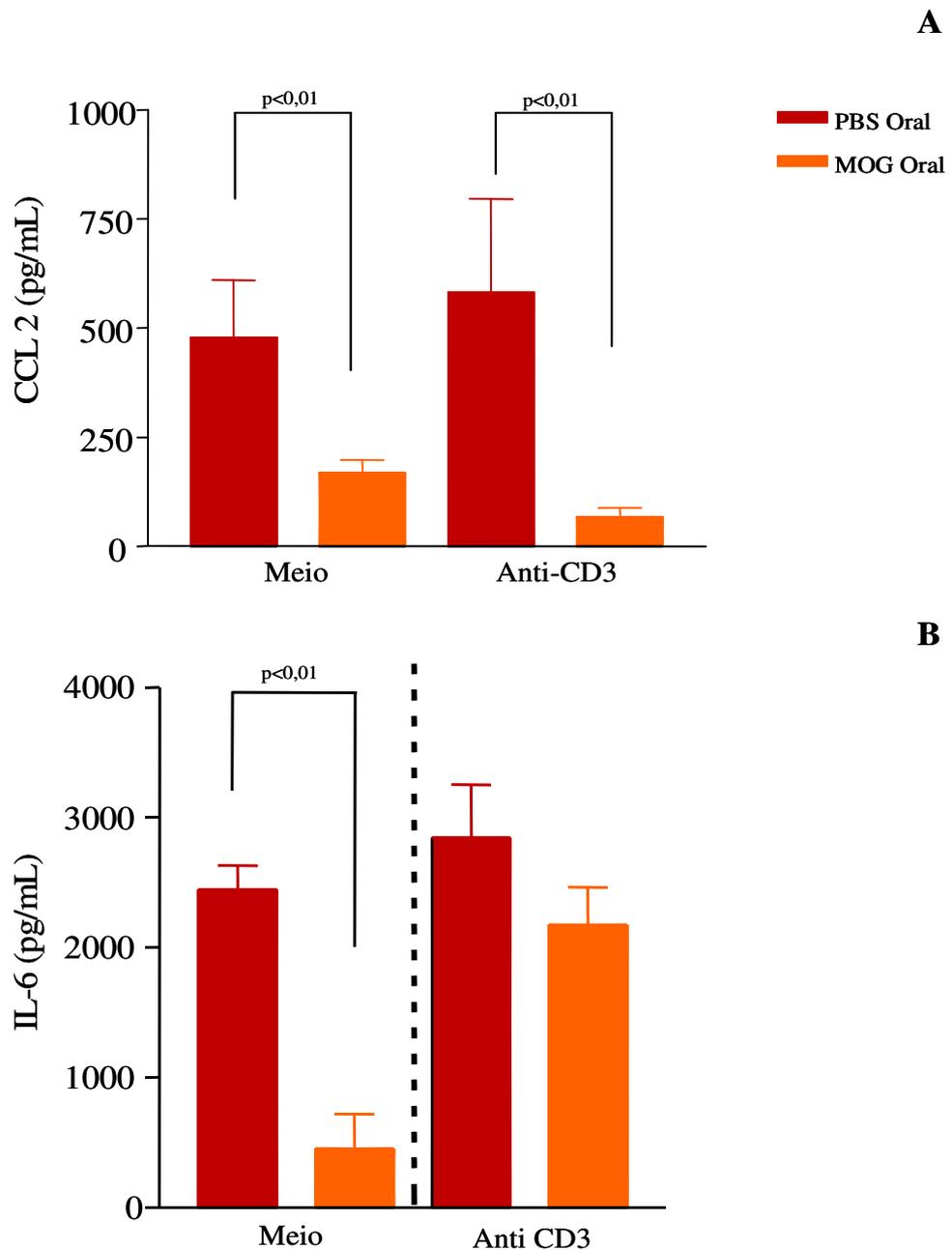


Figura 13: Produção de IL-6 e CCL2 por células mononucleares extraídas do SNC ao dia 10 pós-imunização. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células infiltrantes do SNC foram extraídas e re-estimuladas *in vitro* com anti-CD3. Os sobrenadantes foram coletados após 72 horas e as citocinas dosadas segundo o método de *Cytometric Bead Array*. Em A e B dosagem de CCL2 e IL-6 respectivamente. Dado representativo de 2 experimentos independentes. n=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t de Student.

4.5 Citometria de Fluxo de Células Extraídas do SNC

Baseado nos dados acima, onde vemos uma menor produção de IL-6, 17 e de CCL2 pelas células extraídas do SNC dos animais tolerados oralmente, resolvemos avaliar também como estavam as porcentagens de células infiltrantes no SNC em ambos os grupos. É possível que a diminuição das citocinas avaliadas se deva a uma menor infiltração de células Th17 ou produtoras destas citocinas para dentro do SNC.

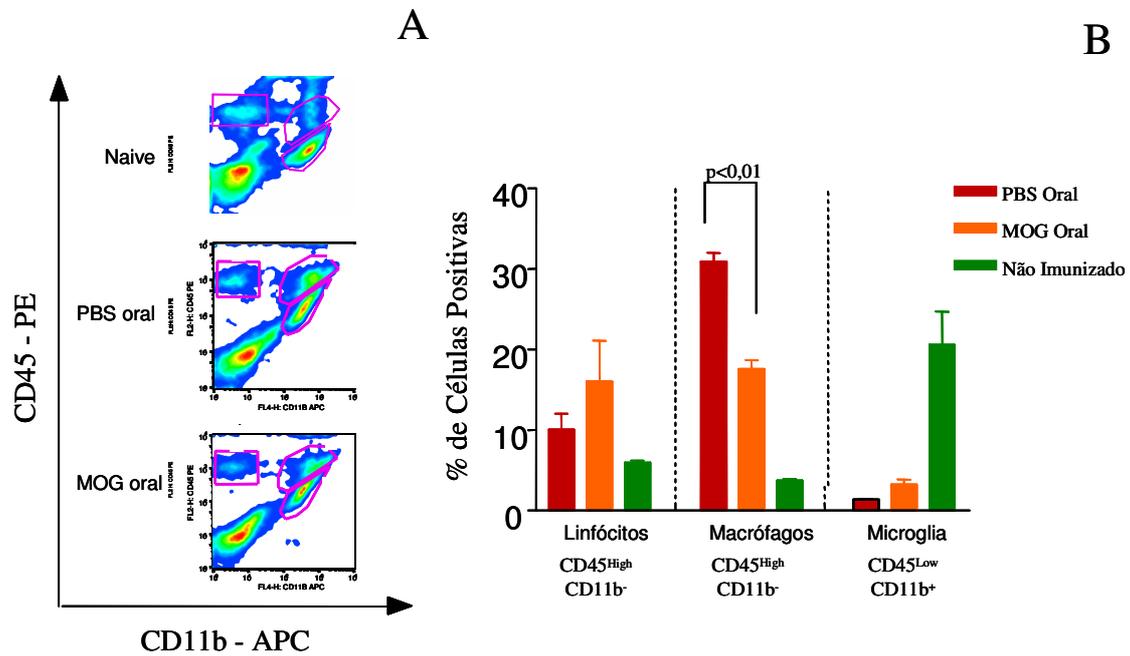
Sendo assim, resolvemos avaliar através da citometria de fluxo, as porcentagens de populações celulares importantes na patogenia da EAE. Dentre as mais relevantes, resolvemos eleger linfócitos, macrófagos e microglia como nossos alvos.

Utilizamos então a combinação de dois marcadores, no caso CD45 e CD11b. De acordo com a literatura, são considerados linfócitos as células CD45⁺CD11b⁻, macrófagos as CD45^{high}CD11b⁺ e microglia aquelas CD45^{low}CD11b⁺. Resolvemos também para este experimento realizar os experimentos em três momentos distintos, ou seja, nos dias 7,10 e 16 pós-imunização. Vale ressaltar porém que, novos dados não publicados utilizando comundongos CXCR3-GFP demonstraram que é possível que as células CD45^{low}CD11b⁺, passem a superexpressar CD45, tornando-se CD45^{high}, devido ao seu nível de ativação (Butovski O. não publicado). Todavia, uma vez que mantivemos os mesmos *gates* para ambos os grupos, não acreditamos que este novo dado venha a comprometer nossos resultados.

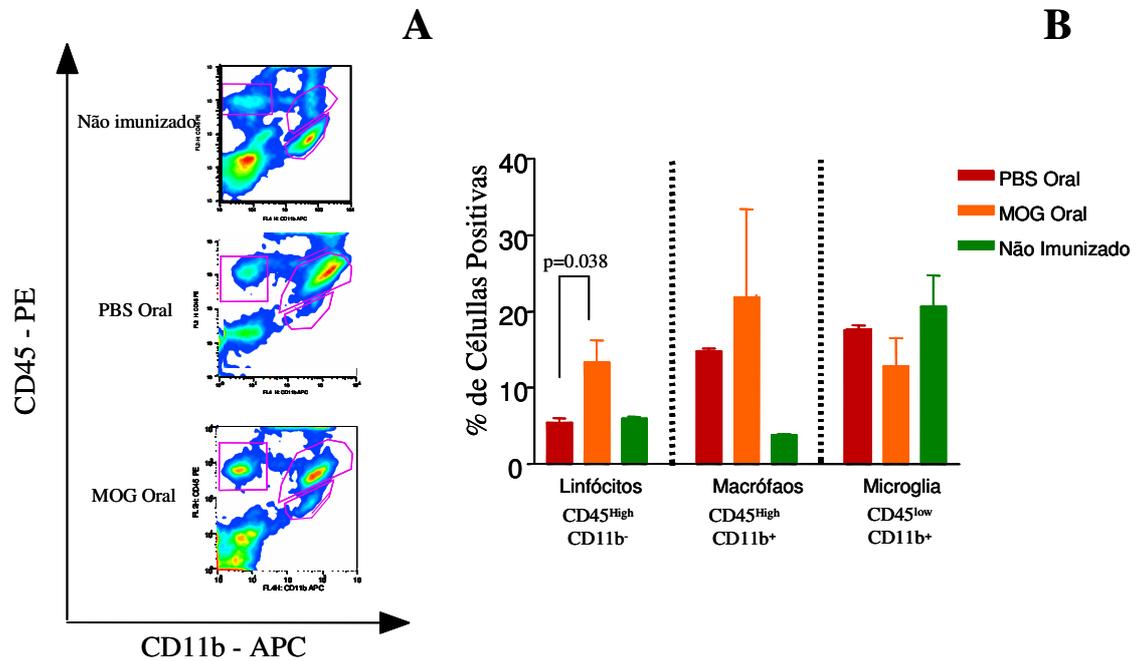
Nossos dados mostram que os animais *naive*, apresentam cerca de 5% de linfócitos, 4% de macrófagos 15% de microglia dentro do SNC. Vale ressaltar que os animais são pareados de acordo com a idade. Como ilustrado na figura 15, observamos uma menor porcentagem de macrófagos (CD45^{high}CD11b⁺) quando comparamos os animais tolerados ao grupo controle ao dia 7 pós-imunização. Todavia, não são observadas diferenças nas porcentagens de linfócitos tampouco nas de microglia.

Já ao dia 10 pós-imunização, porém, observamos um sutil aumento na porcentagem de linfócitos nos animais tolerados, enquanto que não observamos mais diferenças na porcentagem de macrófagos infiltrantes.

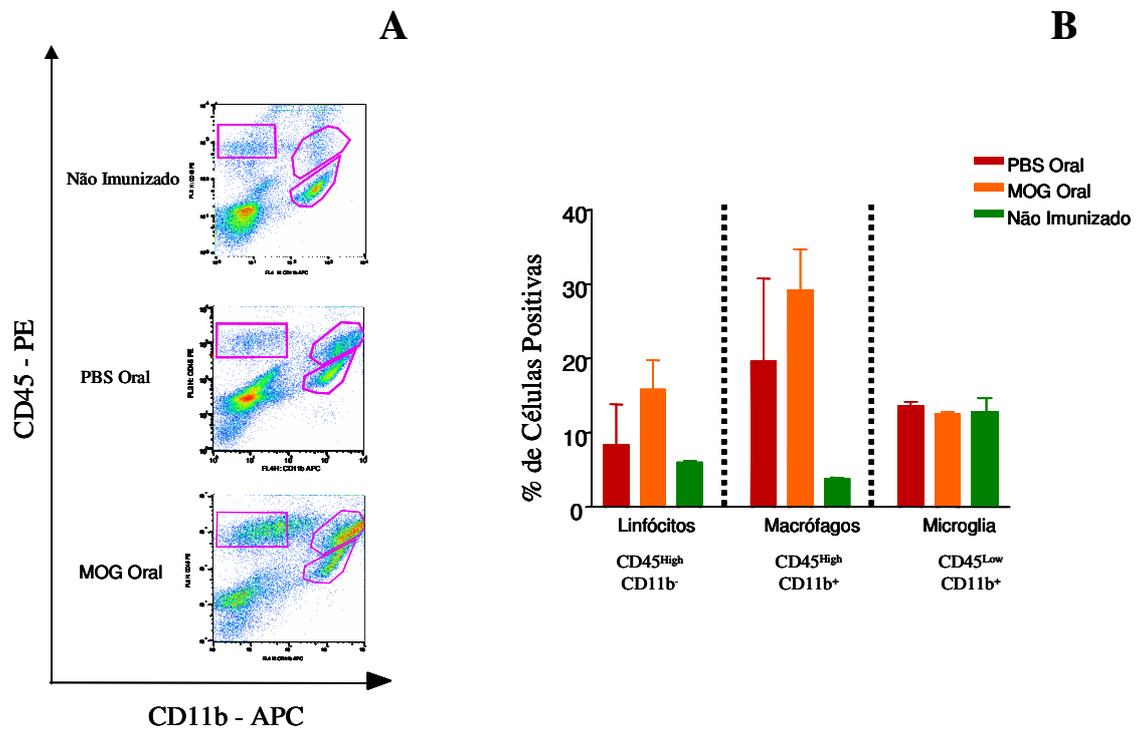
Ao dia 16 nenhuma diferença é observada quando comparamos as populações avaliadas. Vale ressaltar porém, que a porcentagem de macrófagos é sempre crescente no grupo tolerado, enquanto esta obedece a uma cinética diferente no grupo controle. Neste, observamos um pico de macrófago o qual tende a diminuir com o decorrer da doença. Vale ainda ressaltar que, as diferenças na população de microglia, observadas entre os animais não imunizados e imunizados é um achado normal. Devido a ausência de infiltrado nos animais *naive*, a porcentagem de microglia esta bastante elevada, com uma média de 15%. Todavia, quando observamos os animais imunizados, essa população que compreende cerca de 5% ao dia 7 pós-imunização, atinge níveis próximos aos animais não imunizados no dia 10 e também no dia 16. Possivelmente pelo fato de que, como já citado anteriormente, com o decorrer do tempo as células chamadas *DCs-like* estão se ativando e superexpressando CD45. Além disso, estas devem migrar da periferia e repopular o órgão alvo atingindo novamente as concentrações normais ao dia 10.



Figuras 15: Caracterização do infiltrado inflamatório no SNC de animais com EAE. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 7 pós-imunização e células infiltrantes do SNC foram extraídas e avaliadas quanto à expressão de CD11b (anti-CD11b APC) e CD45 (anti-CD45 PE). Em A *pseudo-color plots* de um experimento indicando os *gates* utilizados. Em B gráfico representativo das porcentagens observadas. Dado representativo de 3 experimentos independentes. n=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t de Student.



Figuras 16: Caracterização do infiltrado inflamatório no SNC de animais com EAE. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células infiltrantes do SNC foram extraídas e avaliadas quanto à expressão de CD11b (anti-CD11b APC) e CD45 (anti-CD45 PE). Em A *pseudo-color plots* de um experimento indicando os *gates* utilizados. Em B gráfico representativo das porcentagens observadas. Dado representativo de 3 experimentos independentes, n=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t de Student.



Figuras 17: Caracterização do infiltrado inflamatório no SNC de animais com EAE. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 16 pós-imunização e células infiltrantes do SNC foram extraídas e avaliadas quanto à expressão de CD11b (anti-CD11b APC) e CD45 (anti-CD45 PE). Em A *pseudo-color plots* de um experimento indicando os *gates* utilizados. Em B gráfico representativo das porcentagens observadas. Dado representativo de 3 experimentos independentes. N=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t de Student.

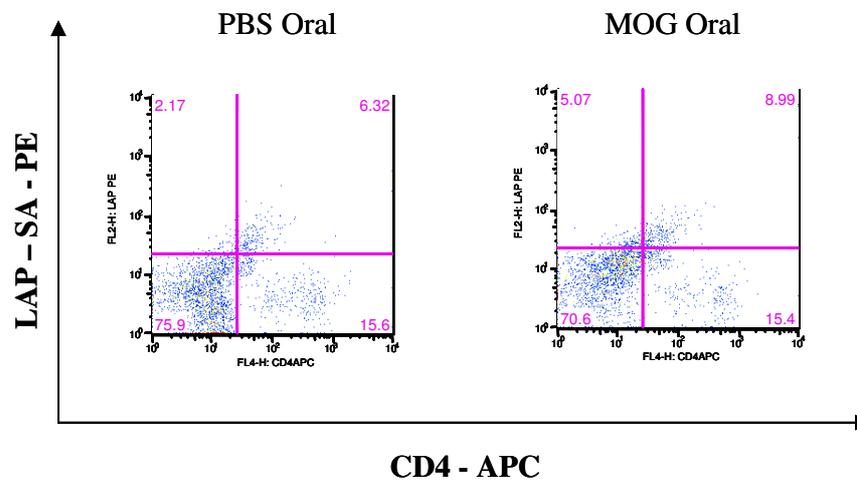


Figura 18: Caracterização do infiltrado inflamatório no SNC de animais com EAE. Animais C57BL/6 tratados ou não com MOG 35-55 e imunizados segundo materiais e métodos foram sacrificados ao dia 10 pós-imunização e células infiltrantes do SNC foram extraídas e avaliadas quanto à expressão de CD4 (anti-CD4 APC) e LAP (anti-LAP Biotinilado + Anti-IgG Streptavidina). Dado representativo de 3 experimentos independentes, n=5. Os dados mostram média \pm desvio padrão. Teste t de Student.

5 DISCUSSÃO

Os mecanismos reguladores presentes no GALT, dentre eles a produção de IL-10 e TGF- β , são de grande importância na manutenção da integridade da mucosa intestinal [118]. Como exemplo podemos citar o fato que animais IL-10 deficientes apresentam colite já no início de sua vida [119]. Mais interessante notar que, em humanos, crianças com alergia alimentar apresentam uma menor porcentagem de células T CD4⁺TGF- β ⁺ presentes na lâmina própria [120]. Neste contexto, a tolerância oral possui grande interesse clínico, podendo ser utilizada para o tratamento de doenças auto-imunes como já demonstra alguns ensaios clínicos. Além disso, o seu uso na prevenção da rejeição de transplantes também já foi descrito [80].

A despeito de muitos estudos terem sido realizados no intuito de melhor elucidar quais eventos celulares e moleculares estão presentes após a indução de tolerância oral, ainda há lacunas a serem preenchidas. Neste contexto o presente trabalho propôs avaliar se a indução de tolerância oral é capaz de modular a resposta imune induzida no modelo de EAE, principalmente a produção de citocinas inflamatórias e o infiltrado celular dentro do SNC. Utilizamos a EAE, por se tratar de um modelo clássico, com ampla ativação do sistema imune, mas por outro lado bastante suprimível após o tratamento oral. Além disso, em tal modelo podemos utilizar os parâmetros doença e linfoproliferação como controle, ou seja, acompanhando tais dados podemos ter certeza de que nossos animais estavam tolerizados frente o antígeno.

Neste contexto, nossos dados foram corroborados pela literatura, uma vez que também observamos uma menor proliferação nas células de linfonodo e baço dos animais tratados com MOG 35-55 oral ao dia 10 pós-imunização. Todavia, percebemos que tal fenômeno é relativamente fugaz, uma vez que não observamos mais diferença quando realizamos os ensaios ao dia 16 pós-imunização. A reduzida proliferação observada nos linfonodos ao dia 10 demonstra provavelmente que os clones já emigraram do linfonodo em direção ao SNC e neste ficando. Todavia, para o baço especulamos que neste ponto após imunização, a ativação do sistema imune seja tamanha que os mecanismos supressores não são mais capazes de segurar a resposta imune. Além disso, especulamos uma maior relação entre os linfonodos e a tolerância oral, do que desta com o baço,

devido ao fato de que acreditamos que a recirculação, seja de células T ou de células apresentadoras de antígenos, se dê através da linfa e não através do sangue.

Ainda tendo como base a supressão da proliferação de células T, procuramos também alterações nas porcentagens de linfócitos e monócitos circulantes após o tratamento oral e a imunização para a EAE. De forma interessante, os grupos não apresentaram diferenças entre si. Pensamos que, a despeito da diferença observada nos linfonodos e no baço ao dia 10 pós-imunização, esta não se repete no sangue periférico possivelmente por causa da presença de uma série de células T não específicas circulantes, mas além disso, pelo fato de que as células MOG 35-55 específicas que foram expandidas nos linfonodos devem muito fugazmente circular pelo sangue, uma vez que têm a tendência a infiltrarem o SNC. Concluimos que, a análise através do sangue periférico não é um bom parâmetro a ser considerado, uma vez que este nunca apresentou diferença nesses animais.

Se lembrarmos que a tolerância oral é capaz de suprimir uma série de fatores presentes na ativação do sistema imune, como produção de anticorpos [113], produção de citocinas e graus de doença [105], faz sentido pensarmos que moléculas responsáveis pela ativação do sistema imune, como as co-estimuladoras, devem estar diminuídas nos animais tolerados. Todavia nossos dados mostraram que, tanto para células T CD4⁺ de sangue periférico, como aquelas extraídas do baço, não apresentam alterações nos marcadores de ativação avaliados, dentre eles a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) e a L-Selectina (CD62L). Inferimos assim que, os mecanismos supressores gerados durante a tolerância oral são mediados mais por fenômenos dependentes de anergia das células T efetoras, assim como da produção de citocinas supressoras do que pela diminuição de moléculas co-estimuladoras. Além disso, o fato de não observarmos também alterações na expressão de PD-1 e GITRL em DCs corrobora essa nossa teoria. Isso devido às características supressoras de tais moléculas. Todavia, não estamos excluindo a relevância destas durante o fenômeno.

Atualmente tem se dado muita importância a citocinas que foram recentemente relacionadas à patogênica tanto da esclerose múltipla como da EAE. Com base nesses dados utilizamos a IL-6 e a IL-17 como principais citocinas a serem estudadas. Vale ressaltar que ainda há na literatura poucos trabalhos que demonstrem a supressão de tais citocinas após a indução de tolerância oral, tampouco os mecanismos que medeiam tal fenômeno. A proposta era avaliar se esta população estava diminuída tanto nos órgãos linfóides como no órgão alvo após a imunização com MOG 35-55 nos animais tolerados oralmente.

Como estávamos supondo, nossos dados mostraram que a produção de IL-17 esta diminuída nas células de linfonodos drenantes dos animais tratados com MOG 35-55, verificada tanto através de mensagem de RNA como dosagem da citocina propriamente dita. Sendo assim, podemos observar que os mecanismos supressores gerados durante a tolerância oral estão presentes nos linfonodos drenantes do sítio de imunização. Aparentemente, tanto a supressão da proliferação das células T CD4⁺, como a redução de citocinas estão presentes em nosso modelo. Todavia, como não realizamos ensaios para dosarmos citocinas importantes no comprometimento para células Th17, como IL-1, IL-6, IL-21 e principalmente TGF- β , não podemos afirmar o mecanismo presente. Podemos supor porém, que a IL-6 deve estar diminuída, uma vez que esta somado ao TGF- β são os fatores necessários para a geração de Th17. Vale ressaltar que já demonstrou-se que a tolerância oral induz a secreção de TGF- β [121].

Em um trabalho recente, demonstrou-se que a IL-17 possui também grande relevância na patogênica da EAE quando produzida no órgão alvo. Os dados mostraram que esta é responsável por alterar os padrões de *gap junctions* das células endoteliais da barreira-hemato-encefálica facilitando a infiltração de mais células como macrófagos e linfócitos [76]. De forma interessante nossos dados mostraram uma menor secreção de IL-17 por células mononucleares extraídas de cérebro e medula espinhal dos animais com EAE e tratados com MOG 35-55. Todavia tal diminuição é mantida somente até o dia 10 pós-imunização, sendo que ao dia 16 não é mais observada esta diferença. Propomos através destes dados, um retardo na infiltração de células T CD4⁺IL-17⁺ no SNC desses

animais, a qual vai alcançando níveis normais a medida que a doença evolui. Vale ressaltar porém que, a despeito dessa atraso na infiltração de tais células nos SNC, os animais tolerados nunca alcançam o mesmo grau de EAE dos animais controle. Sendo assim, é possível inferirmos que, a partir do dia 16 pós-imunização, no qual não observamos mais diferença na produção de IL-17, os mecanismos fisiológicos de reparo tecidual já estejam presentes naquele microambiente impedindo a amplificação da inflamação local.

Outro trabalho demonstrou o papel de células residentes no SNC na geração dessas células durante a EAE, sendo os mecanismos presentes os mesmos observados na periferia, ou seja, IL-6 + TGF- β [53]. Nesse contexto, quando avaliamos a produção de IL-6 *in situ*, percebemos que esta se encontra diminuída nos animais tolerizados. A despeito do fato de que dentre estas células, populações provindas da periferia devem estar presentes, podemos inferir que a menor produção local de IL-6 deve contribuir para uma menor taxa de conversão de células T *naive* para células T efetoras IL-17⁺ dentro do SNC.

Tal fenômeno corrobora o fato de que esses animais apresentam graus de EAE menores do que os animais controle. Vale ressaltar que citocinas da imunidade inata, como IL-12, TNF- α ou IL-10, são encontradas em quantidades semelhantes quando comparamos os grupos. Provavelmente porque grande parte dessas citocinas pode ser produzida também por células do parênquima cerebral. Da mesma forma, para CCL2, observamos que esta quimiocina é secretada espontaneamente e seus níveis não aumentam após estímulo com anti-CD3. De forma diferente, observamos que para IL-6 porém, esta a despeito de também ser produzida espontaneamente, perde a significância estatística após o estímulo com anti-CD3. Nosso dado pode ser corroborado pela literatura, uma vez que demonstrou-se que células T efetoras infiltrantes do SNC são capazes de produzir grandes quantidades de IL-6 [73].

Resta descobrir porém, se esta baixa produção de IL-6, 17 e CCL2 observada nas células mononucleares extraídas do SNC ao dia 10 pós-imunização se dá as custas de

uma menor infiltração de células provindas da periferia para o parênquima cerebral, ou se as células T se encontram em estado anérgico, secretando menos citocinas.

Através de citometria de fluxo, verificamos que os animais tolerizados apresentam uma menor infiltração de macrófagos ao dia 7 pós-imunização, que não é mais observada ao dia 10. Mais interessante porém, notar que ao dia 10, os animais tolerizados apresentam uma maior porcentagem de linfócitos. Tal dado nos surpreendeu, uma vez que ao dia 10, não somente os animais apresentam menor grau de doença, como também as células mononucleares secretam menos IL-17 quando comparadas ao grupo controle.

Tal resultado nos leva a especular que, a despeito da menor infiltração de macrófagos ao dia 7, é possível que ao dia 10 uma porcentagem de outras células, como por exemplo $CD4^+IL-10^+$ ou mesmo $CD4^+Foxp3^+$ possam estar infiltrando o SNC sendo estas as células responsáveis por essa diferença. Como também não utilizamos marcadores específicos, é possível que uma série de outras populações com importância durante a tolerância esteja presente. Demonstramos porém que tal diferença não se dá às custas de células T $CD4^+LAP^+$, as quais apresentam grande relevância após a indução de tolerância oral. Todavia tais dados foram obtidos em células obtidas da periferia.

Em suma nossos dados mostram que a tolerância oral é capaz de suprimir a expansão e geração de células T efectoras $IL-17^+$ e também de mudar o padrão da secreção de citocinas importantes durante a EAE. É exemplo disso o fato de observarmos uma diminuição na produção desta citocina por células de linfonodo de animais submetidos à tolerância oral. Mais interessante observarmos que esta citocina também está diminuída no SNC. Tal dado é bastante relevante se pensarmos no papel importante da IL-17 sobre o endotélio hemato-encefálico e na promoção da infiltração de células com potencial inflamatório para o SNC.

Podemos relacionar esses dados com a diminuição nos níveis de CCL2 e IL-6 no SNC, sendo que macrófagos são grandes produtores de CCL2. Não podemos também

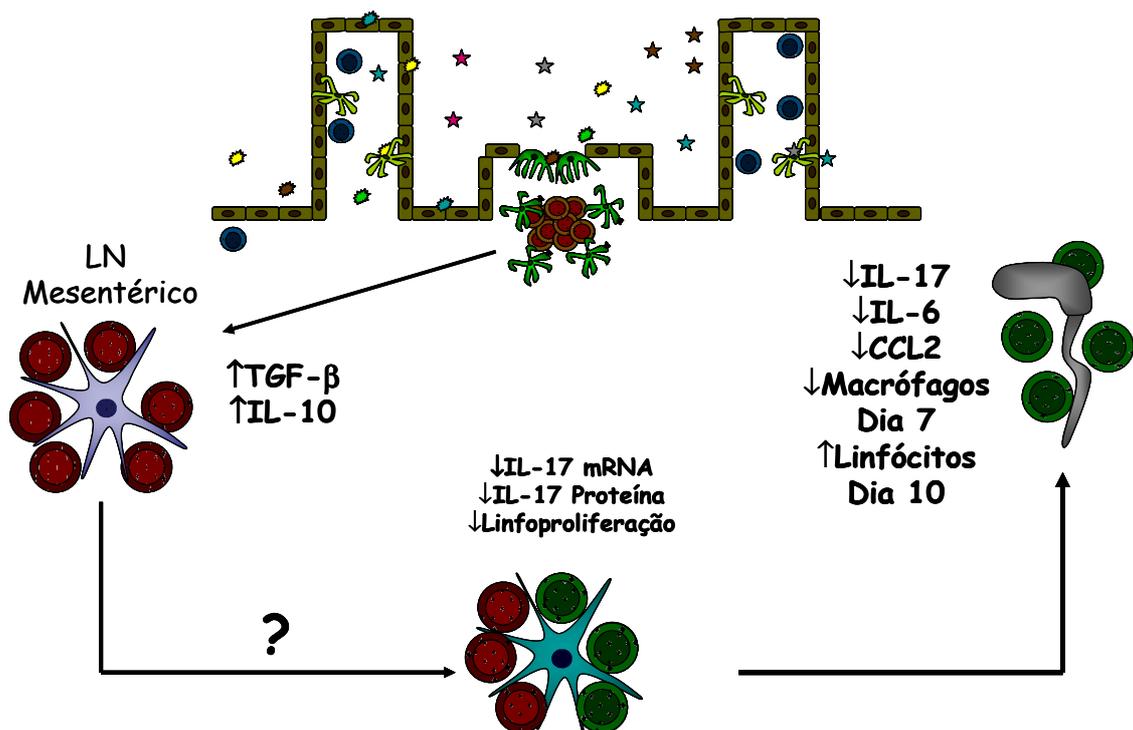
excluir a possibilidade de que a tolerância oral culmine na expansão de macrófagos com caráter M2, que apresentam importância na regulação da EAE em animais tratados com Copaxone[®] por exemplo [47]. Tais macrófagos sabidamente secretam citocinas supressoras como IL-10 e TGF- β . Todavia, resta descobrir o motivo pelo qual os animais tolerados apresentam um leve aumento na porcentagem de linfócitos ao dia 10 pós-imunização, principalmente pelo fato dos animais apresentarem menor grau de doença e uma menor secreção de IL-6, IL-17 e CCL2.

Em suma nossos dados corroboram a teoria de que o fenômeno de tolerância oral é capaz de modular a resposta imune através de mecanismos periféricos de supressão. Sendo que já se demonstrou a indução de anergia nas células T efectoras dos animais imunizados, nossos dados demonstram que, somado a esse evento, observamos a diminuição da produção de IL-17 na periferia, provavelmente devido a uma restrição na expansão da população Th17. Apesar de não termos demonstrado a produção de IL-6 na periferia, tampouco a de TGF- β , é possível pensarmos que a tolerância oral é capaz de modular a capacidade responsiva das células dendríticas na periferia a ponto de diminuir a secreção de citocinas inflamatórias como IL-6 entre outras. Isso devido ao fato de que já se demonstrou que a tolerância oral promove a produção de TGF- β [103].

Associando então a diminuição de IL-6 e IL-17 na periferia, com a anergia clonal observada, fica claro a relação destas com a menor concentração de IL-17 e também de IL-6 dentro do SNC. Haja vista a capacidade patogênica da IL-17 e também da IL-22, a qual é produzida pelas células Th17 [75], nossos dados demonstram que a diminuição no grau de EAE observada nos animais tolerizados se deve a uma diminuição na expansão de células patogênicas na periferia, que acarreta numa menor infiltração destas para dentro do SNC.

Nossos dados apresentaram mais algumas informações acerca dos mecanismos presentes após o fenômeno de tolerância oral, sendo que este se baseia principalmente na supressão da expansão de populações patogênicas, como principalmente aquelas produtoras de IL-17. Como ilustrado no esquema abaixo, é possível que células com

caráter regulador, como as $CD4^+Foxp3^+$ ou $CD4^+LAP^+$ são expandidas nos linfonodos mesentéricos e estas migraram pelos linfáticos até os linfonodos periféricos. Uma vez lá, supomos que estas mantenham as células dendríticas em *cheque* tornando-as possivelmente hiporresponsivas ao processo de imunização, sendo este possivelmente o provável mecanismo pelo qual se secreta menos IL-6 e posteriormente menos IL-17, todavia ainda precisamos confirmar tais inferências. Além destes, outros mecanismos possíveis, a expressão de moléculas supressoras da secreção de citocinas (SOCS), a produção de citocinas promotoras da manutenção da população Th17 como IL-21, 23, associada à presença de citocinas reguladoras, como IL-25 ou IL-27 ainda deve ser elucidado.



7 CONCLUSÃO

A partir de nossos dados, podemos concluir que o fenômeno de tolerância oral é capaz de suprimir os achados característicos da EAE, como o grau de doença e a resposta linfoproliferativa. Porém nossos resultados apontam para novos achados onde a resposta de células patogênicas Th17, importantes nas lesões dentro do SNC, estão suprimidas tanto na periferia como no SNC dos animais submetidos à indução de tolerância. Vale ressaltar que também encontramos menos IL-6 e CCL2 também no sistema nervoso central. Sendo assim, nossos mostram um novo mecanismo de supressão presente durante a indução de tolerância o qual resulta numa menor expansão ou manutenção da população Th17, o que pode explicar o fato dos animais tratados oralmente com MOG 35-55 apresentarem menor grau de EAE quando comparados ao grupo controle. Se tal fenômeno se dá às custas de uma menor expansão ou manutenção desta população, mais experimentos ainda deve ser realizados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Derbinski, J., Self Presentation in Thymus. An Extended View. *Natu Rev Immunol*, 2004. **4**: p. 688-699.
2. Abbul K Abbas, A.H.L., *Cellular and Molecular Immunology*. 2006.
3. Derbinski, G., Gabler J, Brors B, Tierlings S, Jonnakuty S, Hergerhahn M, Peltonen L, Walter J, Kywski B., Primiscuos gene expression in thymic epithelial cells is regulated at multiple levels. 2005. **202**(1): p. 33-45.
4. Anderson A, V.E., Chen Z, Benoist C, Mathis D., The cellular mechanism of AIRE control of T cell tolerance. *Immunity*, 2005. **23**(2): p. 227-239.
5. Doddy Avichezer, R.R., Chi Chao Chan, Mattapallil MJ, Silver PB, Raber JA, Liou GI, Wiggert B, Lewis GM, Donosco LA, Caspi RR., An immunologically privileged retinal antigen elicits tolerance: major role for central selection mechanisms. *J Exp Med*, 2003. **198**(11): p. 1665-1676.
6. Charles Egwagu, C.P., Igal Gery., Thymic expression of autoantigens correlates with resistance to autoimmune disease. *J Immunolo*, 1997(159): p. 3109-3112.
7. S., B., Interleukin-2 but not interleukin-15 is required to terminate experimentally induced clonal T-cell anergy. *Scand J Immunol*, 2004. **60**(1-2): p. 64-73.
8. Camila Orabona, B.M., Vacca C, Bianchi R, Fallarino F, Gizzi S, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P., Silencing Suppressor of Cytokine Signaling 3 Expression in Dendritic Cells Turns CD28-Ig from Immune Adjuvant to Suppressant. *J Immunol*, 2005. **174**: p. 6582-6586.
9. Murray HW, S.-S.A., Wellner D, Oca MJ, Granger AM, Libby DM, Rothermel, CD, Rubin BY., Role of tryptophan degradation in respiratory burst-independent antimicrobial activity of gamma interferon-stimulated human macrophages. *Infect Immun*, 1989. **57**(3): p. 845-849.

10. Andrew L. Mellor, C.P., Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M, David H. Munn., Induced Indoleamine -2,3- Dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol*, 2003(171): p. 1652-1655.
11. David Munn, S.M., Babac Baban, Harding HP, Zhang Y, Ron D, Andrew L. Mellor., GCN2 Kinase in T Cells Mediates Proliferative Arrest and Anergy Induction in Response to Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Immunity*, 2005. **22**(5): p. 633-642.
12. Francisca Fallarino, U.G., You S, Macgrath BC, Cavener DR, Vacca C, Camila Orabonna, Bianchi R, Belladonna ML, Volpi C, Santamaria P, Fioretti MC, Paolo Puccetti., The Combined Effects of Tryptophan Starvation and Tryptophan Catabolites Down-Regulate T Cell Receptor zeta-Chain and Induce a Regulatory Phenotype in Naive T Cells. *J Immunol*, 2006(176): p. 6752-6761.
13. Curti A, P.S., Valzasina B, Aluigi M, Isidori A, Ferri E, Salvestrini V, Bonanno G, Rutella S, Durelli I, Horestein AL, Fiore F, Massaia M, Colombo MP, Baccaranni M, Lemoli RM., Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25⁻ into CD25⁺ regulatory cells. *Blood*, 2007. **109**(7): p. 2871-2877.
14. Platten M, H.P., Youssef M, Fontoura P, Garren H, Hur EM, Guptar R, Lee Ly, Kidd BA, Robinson WH, Sobel WA, Selley, Lawrence Steinman., Treatment of Autoimmune Neuroinflammation with a Synthetic Tryptophan Metabolite. *Science*, 2005. **310**: p. 850-858.
15. GS., M., Dominant immunological tolerance. *Immunol Rev*, 1996(149): p. 1-24.
16. Kulkarni AB, H.C., Becker D, Geiser A, Lyght M, Flanders KC, Roberts, AB, Sporn MB, Ward JM, and Karlsson S., Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death. *PNAS*, 1993. **90**: p. 770-774.

17. Shull, M.M., Ormsby, I., Kier, A.B., Pawlowski, S., Diebold, R.J., Yin, M., Allen, R., Sidman, C., Proetzel, G., Calvin, D., Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. 1992.
18. Li MO, W.Y., Flavell RA., T Cell-Produced Transforming Growth Factor-b1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity*, 2007. **26**: p. 579-591.
19. Streilein JW, O.K., Mo JS, Taylor AW, Ocular immune privilege and the impact of intraocular inflammation. *DNA Cell Biol*, 2002(21): p. 453-459.
20. Streilein JW, M.S., Kezuka T., The Eye's view of antigen presentation. *Human Immunol*, 2002(63): p. 435-443.
21. Gershon., G., Cell interactions in the induction of tolerance: the role of thymic lymphocytes. *Immunology*, 1970(18): p. 723-735.
22. Shimon Sakaguchi, A.M., Itoh M, Toda M., Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alfa-chains (CD25) breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol*, 1995(155): p. 1151-1164.
23. ALAN BCB, F.J., GORDON J, HAFLER, DA., CD4+CD25+ regulatory cells in human peripheral blood. *J Immunol*, 2001(167): p. 1245-1253.
24. Brunkow ME, H.K., Paeper B, Clark LB, Yasayko S, Wilkinson E, Ziegler SF, Ramsdell F., Disruption of a new forkhead/winged-helix protein scurfy results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *NAT GENETICS*, 2001. **27**: p. 68-73.
25. Shoei Hori, N.T., Sakaguchi., Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science*, 2003. **299**(5609): p. 1030-1031.

26. E., S., CD4CD25 Immunoregulatory T Cells Suppress Polyclonal T Cell Activation In Vitro by Inhibiting Interleukin 2 Production. *J Immunol*, 1998. **188**(2): p. 287-296.
27. Angela Thornton, P.C., Shevach EM., IL-2 Is Critically Required for the In Vitro Activation of CD4CD25 T Cell Suppressor Function. *J Immunol*, 2001. **15**: p. 156-164.
28. Machugh RS, P.C., Young DA, Shevach EM, Collins M, Byrne C., CD4CD25 Immunoregulatory T Cells: Gene Expression Analysis Reveals a Functional Role for the Glucocorticoid-Induced TNF Receptor. *Immunity*, 2002. **16**: p. 311-323.
29. Jun Shimizu, T.T., Ishida Y, Sakaguchi S., Stimulation of CD4+CD25+ regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol*, 2002. **3**(2): p. 135-142.
30. Stassen M, B.T., Richter C, Muller C, Kubach J, Becker C, Knop J, Erik AH, Schmitt S, Shimitt E, Jonuleit H., Human CD25+ regulatory T cells: two subsets defined by the integrins alpha-4 beta-7 or alpha-4 beta-1 confer distinct suppressive properties upon CD4+ T helper cells. *Eur J Immunol*, 2004. **34**: p. 1303-1311.
31. Jordan MS, R.A., Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Najj A, Caton AJ., Thymic Selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self peptide. *Nat Immunol*, 2001. **2**(4): p. 301-306.
32. Grossmann WJ, B.W., Collonna M, Atkinson JP, Ley TJ., Human T Regulatory Cells Can Use the Perforin Pathway to Cause Autologous Target Cell Death. *Immunity*, 2004. **21**: p. 589-601.
33. Fontenot JD, R.J., Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudenksy AY., Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3. *Immunity*, 2005. **22**(3): p. 329-341.

34. Kim JM, R.J., Rudensky AY., Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice. *Nat Immunol*, 2007. **8**(2): p. 191-97.
35. HL., W., Oral Tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and Infection*, 2001(3): p. 947-54.
36. Matzinger, P., Tolerance, Danger and the Extended Family. *Annu Rev in Immunol*, 1994. **12**: p. 991-1045.
37. Matzinger, P., Intrudiction to the series: Disussion forum in Danger Theory. *Scand J Immunol*, 2001(54): p. 2-3.
38. Seong Seong, P.M., Hydrophobicity: an ancient damageassociated molecular pattern that initiates innate immune responses. *Nat Rev Immunol*, 2004. **4**: p. 469-479.
39. WHO, Neurological Disorders: Public Health Challenge. WHO, 2006(1-18).
40. SR., O., Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin*, 2005(23): p. 61-75.
41. MacFarland HF, M.R., Multiple Scerosis: A complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 913-919.
42. Rodriguez, M., Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathology*, 2007(17): p. 219-229.
43. Rivera-Quinones C, M.D., Schmelzer JD, Hunter SF, Low PA, Rodriguez M., Absence of neurological deficits following extensive demyelination in a class I-deficient murine model of multiple sclerosis. *Nat Med*, 1998(4): p. 187-193.
44. H, N., Molecular mechanisms of axonal damage in inflamatory central nervous system diseases. *Curr Opin Neurol*, 2003(16): p. 267-273.
45. Michael P. Crawford, S.X.Y., Sterling B. Ortega, Riyaz S. Mehta, Rachel E. Hewitt, David A. Price, Peter Stastny, Daniel C. Douek, Richard A. Koup,

- Michael K. Racke, and Nitin J. Karandikar., High prevalence of autoreactive neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood*, 2004(103): p. 4222-4231.
46. DK., T., Therapeutic induction of regulatory cytotoxic CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol*, 2006(176): p. 7119-7129.
47. Webbew MS, P.h.T., Youssef S, Dunn SE, Rundle CD, Lee EI, Patarroyo JC, Stuve O, Sobel RA, Steinman L, Zamvil S., Type II monocytes modulate T cell-mediated central nervous system autoimmune disease. *Nat Med*, 2007. **13**(8): p. 935-943.
48. Baxter, A.G., The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 2007. **7**(11): p. 904.
49. Friese MA, M.X., Willcox N, Bell JI, Martin R, Fuger L., The value of animal models for drug development in multiple sclerosis. *Brain*, 2006. **129**(8): p. 1940-1952.
50. Racke MK, H.W., Lovertt- Racke AE., PTX Cruiser: driving autoimmunity via TLR4. *Trends Immunol*, 2005. **26**(2): p. 289-291.
51. Farina C, K.M., Giese T, Aloisi F, Meinel E., Preferential expression and function of TLR3 in human astrocytes. *J Neuroimmunol*, 2005. **159**(1-2): p. 12-19.
52. Polman CH, O.C.P., Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW., A randomized placebo controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Eng J Med*, 2006(354): p. 899-910.
53. Bailey SL, S.B., Macmahon EJ., CNS Myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides preferentially polarize CD4⁺ Th17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol*, 2007(8): p. 172-180.

54. Screibert T, S.V., Cain D, Alon R, Sacksstein R., Shear flow-dependent integration of apical and subendothelial chemokines in T cell transmigration: implications for locomotion and the “multi-step paradigm”. *Blood*, 2006(109): p. 1381–1386.
55. Alt C, L.M., Engelhardt B., Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-independent lymphocyte recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*, 2002(32): p. 2133-2144.
56. B., E., Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm*, 2006. **113**: p. 477-485.
57. Brindula V, R.N., Metz LM, Bernard CC, Yong VW., Targeting leucocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis. *Brain*, 2002. **125**(6): p. 1297-1308.
58. Flavell, M.O.L.a.R.A., Contextual Regulation of Inflammation: A Duet by Transforming Growth Factor- β and Interleukin-10. *Immunity*, 2008. **28**: p. 467-476.
59. Chu CQ, W.S., Dalton DK., Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*, 2000. **192**(1): p. 123-128.
60. Jones LS, R.L., Agarwal RK, Tarrant TK, Chan CC, Wiggert B, Caspi R., IFN- γ -deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J Immunol*, 1997. **15**(158): p. 5997-605.
61. Cua, D., Sherlock J, Chen Y, Murphy Ca, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Wiekowski S, Lira S, Gormank Sa, Kasteleink Ra

- Sedgwick Jd., Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 2003. **421**: p. 744-748.
62. Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B., TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*, 2006. **24**: p. 179-189.
63. Ivanov I, M.B., Zhou B, Tadokoro CE, Leppeley A, Lafaille JJ, Cua DJ, Littman DR., The Orphan Nuclear Receptor RORgt Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell*, 2006(126): p. 1121-1133.
64. Ivanov I, D.G., Littman DR., Lymphoid tissue inducer cells in intestinal immunity. *CuRr Top Microbiol Immunol*, 2006(308): p. 59-82.
65. E., B., Reciprocal development pathways for the generation of pathogenic effector Th17 and regulatory T cells. *Nature*, 2006(441): p. 235-238.
66. Acosta-Rodriguez EV, N.G., Lanzavechia A, Sallusto F., Interleukins 1b and 6 but not transforming growth factor-b are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. 2007. **8**(9): p. 942-950.
67. Thomas Korn, E.B., Wenda Gao, Awasthi A, Jager A, Strom TB, Oukka M, Kuchroo VK., IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory Th17 cells. *Nature*, 2007(448): p. 484-487.
68. Volpe E, S.N., Zollinger R, Bogiatzi SI, Hupé P, Barillot E, Soumelis V., A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. 2008. **9**(6).
69. Iwakura Y, I.H., The IL-23/IL-17 axis in inflammation. *J Clin Invest*. 2006 May;116(5):1218-22., 2006. **116**(15): p. 1218-22.

70. Zhou L, I.I., Spolski R, Sherendoz K, Egawa T, Levy DE, Leonard WJ, Littmann DR, IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 1-8.
71. Kleinscheck M, O.A., Joyce-Shakikh B, Langrish CL, Cchen Y, Gorman DM, Blumshein WM, McClanhan T, Brambacher F, Hurst SD, Kastelein RA, Cua DJ., IL-25 regulates Th17 function in autoimmune inflammation. *J Exp Med*, 2007. **204**(1): p. 161-170.
72. Neufert C, B.C., Wirtz S, Fantini MC, Weigmann B, Galle PR, Neurath MF., IL-27 controls the development of inducible regulatory T cells and Th17 cells via differential effects on STAT1. *Eur J Immunol*, 2007(37): p. 1809-1816.
73. Thomas Korn, V.K.K., Myelin specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med*, 2007(13): p. 423-431.
74. Charles Pasare, R.M., Toll-pathway dependent blockade of CD4CD25 T cell-mediated suppression by dendritic cells. *Science*, 2003(299): p. 1033-1036.
75. Kreimborg K, E.R., Dumoutier L, Haak L, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renault JC, Becher B., IL-22 Is Expressed by Th17 Cells in an IL-23-Dependent Fashion, but Not Required for the Development of Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*, 2007. **279**: p. 809-104.
76. Kebir H, K.K., Ifergan I, Dodelet-Devillers, Bernards M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A., Human Th17 lymphocytes, promote blood brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Immunol*, 2007. **13**(10): p. 1173-1175.
77. D., M., Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler*, 1999(5): p. 101-104.
78. Lock C, H.G., Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L., Gene-microarray

- analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*, 2002(8): p. 500-508.
79. Kilestein J, K.N., Polmann CH., Glutamate inhibition in MS: the neuroprotective properties of riluzole. *J Neurol Sci*, 2005(233): p. 113-115.
80. Ana Caetano de Faria, H.L.W., Oral tolerance: mechanisms and therapeutic applications. *Adv Immunol*, 1999(73): p. 153-264.
81. Whitacre CC, G.I., Orosz EG, Bitar D., Oral tolerance in autoimmune encephalomyelitis. III Evidence for clonal anergy. *J Immunol*, 1991(147): p. 2155-2163.
82. Melamed D, F.A., Direct for anergy in T lymphocytes tolerized by oral administration of ovalbumin. *Eur J Immunol*, 1993(23): p. 935-942.
83. Miller S, H.D., Inhibition of specific immune response by feeding protein antigens. IV Evidence for tolerance and specific active suppression of cell-mediated immune responses to ovalbumin. *J Immunol*, 1979(123): p. 2344-2350.
84. Miller A, L.O., Roberts AB, Sporn MB, Weiner HL., Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vivo and in vitro immune responses by the release of TGF-beta following antigen specific triggering. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992(89): p. 421-425.
85. Anderson Friedman, H.L.W., Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994(91): p. 6688-6692.
86. Mowat AM, S.S., Drumond HE, Ferguson A., Immunological response to fed protein antigens in mice: I Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunology*, 1982(45): p. 105-113.

87. Suh EDV, C.C.C., Gery I, Nussenblatt RB., Splenectomy abrogates the induction of oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis. *CURR EYE RES*, 1993. **12**: p. 833-838.
88. Vistica BP, F.N., Caspi RR, Rizzo LV, Nussenblatt RB, Gery I., CD8+ T-cells are not essential for the induction of "Low-dose" oral tolerance. *J Immunol*, 1996. **78**(2): p. 196-2002.
89. Franco LB, F.R., Massouih E, Flo J., Priming of the B- and Th2- dependent immune response by the oral administration of OVA-DNP is determined by the antigen dosage. *Cell Immunol*, 1998. **190**: p. 1-11.
90. Rizzo LV, M.-R.R., Choi R, Wiggert B, Chan CC, Morse I, Nussenblatt RB, Caspi RR., IL-4 and IL-10 are both required for the induction of oral tolerance. *J Immunol*, 1999. **162**: p. 2613-2622.
91. Chiepa M, R.M., Huang AYC, Germann RN., Dynamic imaging of dendritic cell extension into the small bowel lumen in response to epithelial cell TLR engagement. *J Exp Med*, 2006. **203**(13): p. 2841-2852.
92. MG Bruce, A.F., Oral tolerance induced by gut-processed antigen. *Adv Exp Med Biol*, 1987(216A): p. 721-731.
93. VNEY JL, M.A., O'MALLEY JM, WILLIANSON E, FANGER NA., Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. *J Immunol*, 1998(160): p. 5815-5825.
94. Everson MP, L.D., Macghee JR, Beagley KW., FACS sorted splen and Peyer Patches dendritic cells induce different responses in Th0 clones. *Adv Exp Med Biol*, 1997(417): p. 357-362.
95. Harper HM, C.L., Williams NA., The role of small intestinal antigen presenting cells in the induction of T cell reactivity to soluble protein antigens: Association between aberrant presentation in the lamina propria and oral tolerance. *Immunology*, 1996(89): p. 449-456.

96. Freeman GJ, B.V., Anumantham A, Bernstein GM, Ke KY, Rennet PD, Grey GS, Gribben JG, Nadler LM., B7-1 and B7-2 do not deliver identical stimulatory signals, since B7-2 but not B7-1 preferentially costimulates the initial production of IL-4. *Immunity*, 1995(2): p. 523-532.
97. Samoilova EB, H.J., Zhang H, Khoury SJ, Weiner, Chen Y., CTLA-4 is required for the induction of high dose oral tolerance. *Int Immunol*, 1998(26): p. 1756-1761.
98. Xingming Zhang, L.L., Howard L. Weiner., Activation of CD25CD4 Regulatory T Cells by Oral Antigen Administration. *J Immunol*, 2001(167): p. 4245-4253.
99. Daniel Mucida, P.Y., Kim G, Turovskaya O, Scott L, Kronenberg M, Cheroute H., Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation Mediated by Retinoic Acid. *Science*, 2007(317): p. 256-260.
100. Coombes JL, S.K., Arancibia-Carcamo CV, Hall J, Sun CM, Belkayd Y, Powrie F., A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3 regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid – dependent mechanism. *J Exp Med*, 2007. **8**(204): p. 1757-1764.
101. CHEN Y, I.J., WEINER HL., Induction of oral tolerance to myelin basic protein in CD8 depleted mice: both CD4 and CD8 cells mediate suppression. *J Immunol*, 1995(155): p. 910-916.
102. Lider O, S.L., Lee CS, Higgins PJ, Weiner HL., Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen specific CD8⁺ T lymphocytes. *J Immunol*, 1989(142): p. 748-752.
103. Santos LMB, S.A., Londono A, Weiner HL., Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF- β secreting T cells in PPs of SJL mice. *Cell Immunol*, 1994(157): p. 439-447.

104. Tsuji NM, M.K., Kurisaki J., Interleukin-10-secreting Peyer's patch cells are responsible for active suppression in low-dose oral tolerance. *Immunology*, 2001(103): p. 458-464.
105. RIZZO LV, M.R., MILLER-RIVERO NE, CHOI R, WIGGERT B, CHAN CC, MORSE HC, NUSSENBLATT RB, CASPI RR., IL-4 and IL-10 Are Both Required for the Induction of Oral Tolerance. *J Immunol*, 1999(162): p. 2613-2622.
106. Gonnella PA, W.H., Kodali D, Weiner HL., Induction of low dose oral tolerance in IL-10 deficient mice with experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*, 2004. **23**(3): p. 193-200.
107. Hauet-Broere F, G.J., Hoijer M, Kraal G, Samson JN., Functional CD25- and CD25+ mucosal regulatoryT cells are induced in gut-draining lymphoid tissue within 48 h after oral antigen application. *Eur J Immunol*, 2003. **33**: p. 2801-2810.
108. Suh, E.D.V., B.P; Chan, C.C; Raber, J.M; Gery, I; Nussenblatt, R.B., Splenectomy abrogates the induction of oral tolerance in experimental autoimmune uveoretinitis. *Curr Eye Res*, 1993. **12**: p. 833.
109. Mins S, K.-S.P., Lee J, Kim K, Jung Y, Koh H, Do J, Kim H., Induction of IL-10-producing CD4+CD25+ T cells in animal model of collagen-induced arthritis by oral administration of type II collagen. *Arthritis Res Ther*, 2004. **6**: p. 213-219.
110. Rizzo LV, M.-R.N., Chi Chao Chan, Wiggert B, Nussenblatt RB, Caspi RR., Interleukin-2 treatment potentiates induction of oral tolerance in a murine model of autoimmunity. *JCI*, 1994. **94**(4): p. 1668-1672.
111. Ke Y, P.K., Lake JP, Ziegler HK, Kapp JA., Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol*, 1997(158): p. 3610-3618.
112. Rukiye-Nazan Dogan, A.E., and William J. Karpus., Production of CCL2 by Central Nervous System Cells Regulates Development of Murine Experimental

- Autoimmune Encephalomyelitis through the Recruitment of TNF- and iNOS-Expressing Macrophages and Myeloid Dendritic Cells. *J Immunol*, 2008. **180**: p. 7376 –7384.
113. Keller AC, M.D., Gomes E, Faquim-Mauro E, Faria AMC, Rodriguez D, Russo M., Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance. *J Allerg and Clin Immunol*, 2006. **117**(02): p. 283-290.
114. LI O, L.J., ZHANG H, ZHENG A, LIU Y, BAI F., CD62L is required for the priming of encephalitogenic T cells but does not play a major role in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Scand J Immunol*, 2006(64): p. 117-124.
115. Butte MJ, K.M., Phamduy TB, Sharpe AH, Freeman GJ., Programmed Death-1 Ligand 1 Interacts Specifically with the B7-1 Costimulatory Molecule to Inhibit T Cell Responses. *Immunity*, 2007. **27**: p. 111-122.
116. Ehrchiou D, X.Y., Xu G, Chen W, Shi Y, Zhang L., CD11b facilitates the development of peripheral tolerance by suppressing Th17 differentiation. *J Exp Med*, 2007. **204**(7).
117. Fitzgerald DC, C.B., Touil T, Harle H, Grammatikopolou J, Das Sarma J, Gran B, Zhang G, Rostami A., Suppressive Effect of IL-27 on Encephalitogenic Th17 Cells and the Effector Phase of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol*, 2007(179): p. 3268-75.
118. Paulo Vieira, A.O.G., Regula'ten' the gut. *Nat Immunol*, 2007. **8**(9): p. 905-907.
119. Powrie, F., Genetic and spontaneous models of inflammatory bowel disease in rodents: evidence for abnormalities in mucosal immune regulation. *Ther Immunol*, 1995. **2**(2): p. 115-123.
120. Roncarolo, M.G., Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev*, 2001(182): p. 68-79.

121. Weiner, H.L., Oral Tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells. *Microbes and Infection*, 2001(3): p. 947-54.

ANEXOS

Artigos Publicados

1. Awasthi A, Carrier Y, **Peron JP**, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol.* 2007 Dec;8(12):1380-9
2. Vallochi AL, Commodaro AG, **Schwartzman JP**, Belfort R Jr, Rizzo LV. The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007 Feb-Apr;18(1-2):135-41.

Artigos Submetidos

- 2 Kaiyong Yang, Jose L. Vega, Muhamed Hadzipasic, **Jean Pierre Schatzmann Peron**, Bing Zhu, Julia Carrier, Sharmila Masli, Luiz Vicente Rizzo, Howard L. Weiner. Thrombospondin-1 enhances the induction of Th17 cells and exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal Immunology.*

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](#)