



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE HISTOLOGIA E EMBRIOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS MORFOLÓGICAS

Linfócitos B induzem tolerância imunológica mediada por células T regulatórias

Sheila Charchat

Dissertação de Doutorado
apresentada no Programa de Pós-
Graduação em Ciências Morfológicas
da Universidade Federal do Rio
Janeiro, como parte dos requisitos
necessários à obtenção do título de
Doutor em Ciências Morfológicas

Orientadora: Adriana Bonomo

RIO DE JANEIRO-RJ

- Fevereiro 2008 -

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Linfócitos B induzem tolerância imunológica mediada por células T regulatórias

Sheila Charchat

Tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Morfológicas).

Banca Examinadora:

Dr^a. Ana Carolina Pinto (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho –
Universidade Federal do Rio de Janeiro)

Prof^a. Dr^a. Ana Maria Caetano de Faria (Instituto de Ciências Biológicas –
Universidade Federal de Minas Gerais)

Prof^a. Dr^a. Marcia Cury El-Cheikh (Depto. de Histologia e Embriologia – ICB –
UFRJ)

Dr. Martin Bonamino – Revisor e suplente externo (Divisão de Medicina
Experimental – Coordenação de Pesquisa – Instituto Nacional de Câncer)

Prof. Dr Helio Dutra – Suplente interno (Depto. de Histologia e Embriologia –
ICB – UFRJ)

Prof^a Dr^a. Adriana Bonomo (Orientadora)

Charchat, Sheila

Linfócitos B virgens como indutores de tolerância imunológica / Sheila Charchat. Rio de Janeiro: UFRJ/ICB, 2008.

xv, 133f.: il.; 27,9 cm.

Orientadora: Adriana Bonomo

Dissertação (Doutorado) – UFRJ/ ICB/ Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, 2004.

Referências Bibliográficas: f. 93-104

1. Linfócitos B virgens. 2. Tolerância. 3. Células T regulatórias.

I.Charchat, Sheila. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. III. Título

**Dedico esta tese a D-us que renova
minha vida cada dia, tornando este
sonho uma realidade.**

**“Preste atenção em seus pensamentos pois eles se tornarão sua fala;
preste atenção em sua fala pois ela se tornará seus atos;
preste atenção em seus atos pois eles se tornarão seu carácter;
preste atenção em seu carácter pois ele se tornará seu destino”.**

Provérbio do Talmud

Agradecimentos

Hoje estou realizando uma grande conquista, mas certamente não cheguei até aqui sozinha. Esta tese não é só minha, ela se tornou realidade com o apoio e colaboração de muitas pessoas que gostaria de agradecer e compartilhar este momento.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer meu marido, que da luz para a minha vida, sempre do meu lado me impulsionando, apoiando e me “aguentando” durante os momentos difíceis e de grandes conquistas e crescimentos.

Meus pais, minhas raízes, meu porto seguro. Responsáveis pela base do meu carácter e dos meus princípios para que eu pudesse encontrar meu caminho no mundo. Sempre por perto, e disponíveis para tudo.

Meus avós, meus exemplos, seus ensinamentos, força, determinação e humildade contribuíram muito para minha formação e caminhada até aqui.

Meus irmãos e meus cunhados por todo o apoio e cumplicidade em todos os momentos da minha vida. Sem contar meus sobrinhos que pela suas pureza de criança passam grandes ensinamentos.

Adriana, por ser muito mais que uma orientadora, por ter me ensinado a pensar cientificamente e a criar novas realidades; por todo o apoio e compreensão em todos os momentos; pela amizade, preocupação e participação em fases tão marcantes da minha vida, que sem dúvida contribuíram para meu crescimento, não só profissional, mas também para a pessoa que me tornei depois destes seis anos de convivência.

João Paulo, este merece todos os agradecimentos do mundo. Meu “anjo da guarda laboratorial”. Sua ajuda desde o primeiro dia em que eu cheguei ao laboratório até os últimos suspiros para a finalização do trabalho foram fundamentais para a realização desta tese. Obrigada pelas milhares de vezes que ficou comigo até altas horas da noite para injetar meus animais; pela terapia inicial quando comecei a trabalhar com camundongos e por tudo que cresci e aprendi trabalhando com você.

Rafinha e Fabrício, meus queridos alunos, com certeza me ensinaram muito e foram fundamentais na padronização e realização de inúmeros experimentos deste trabalho. Espero ter contribuído um pouco para a formação científica de vocês.

Cecília e Patrícia, chegaram no lab em uma fase muito conturbada e agitada: casamento, final de tese..., foram essenciais para os ensaios de fechamento da tese. Meninas queria ter tido mais tempo para dar atenção para vocês.

Minhas amigas Aline, Julia e Poliana, suporte amigo para os momentos de alegria e dificuldade dentro do lab. Certamente o companherismo de vocês contribuíram para que os dias de trabalho fossem mais lindos e os obstáculos mais fáceis de serem superados.

Ana Paula, nossa “technition”, sempre pronta para ajudar, organizar, chamar a atenção, ou seja, para manter a funcionalidade do laboratório.

Zilton: o disseminador da alegria e da tranquilidade no ambiente. Muito disponível, fundamental na realização das análises estatísticas feitas neste trabalho.

“OS BONOMIANOS”: como grupo, não poderia ser melhor! Sempre unido, pronto para ajudar intelectual e tecnicamente. Individualmente:

“OS AGREGADOS”: Fernando: nosso artista. Responsável por algumas ilustrações observadas em figuras da tese, me ajudando a deixar o trabalho menos confuso. João Luiz: companheiro de experimentos enormes até de madrugada e também sempre disposto a ajudar.

Dr Marcelo Barcinski, sua dedicação como chefe de grupo, proporcionando um bom ambiente para o crescimento e amadurecimento dos alunos e realização de uma boa ciência.

Martin Bonamino, sempre muito disponível e dedicado. Responsável pela difícil tarefa de revisar a tese.

Suely e Taís, sempre prontas para resolverem todos os problemas do laboratório com um sorriso e boa vontade.

Professora Maria Helena e Professora Leda Castilho que abriram seus laboratórios e se dedicaram para a realização dos processos necessários para a purificação dos anticorpos 7D-4.

Para finalizar, gostaria de agradecer todos os amigos e colegas da MEDEX pela colaboração e por tornarem o dia-a-dia no laboratório mais agradável e interessante.

Resumo:

Linfócitos B induzem tolerância imunológica mediada por células T regulatórias

Sheila Charchat

Resumo da tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Morfológicas).

Linfócitos B virgens (BN, *naive B cells*) induzem tolerância a antígenos “simples” como H-Y. Sendo assim, questionamos se estas células seriam capazes de tolerizar respostas a antígenos alogênicos *in vivo*. Para tal, camundongos C57BL/6 (B6) foram tratados, ou não, com injeção endovenosa de linfócitos BN provenientes de camundongos F1(BALB/c X C57BL/6) — chamados neste trabalho F1(bXd) —, machos e enxertados com pele de B6 macho e F1(bXd) fêmea. Como esperado, os animais tratados com BN de F1(bXd) macho foram tolerantes ao enxerto de B6 macho, entretanto, o tratamento com BN de F1(bXd) não preveniu a rejeição dos enxertos provenientes de camundongos F1(bXd) fêmeas. A incapacidade dos linfócitos BN de induzirem tolerância a antígenos alogênicos não é dependente dos antígenos específicos apresentados pela pele e pelos linfócitos BN, uma vez que linfócitos B de F1(bXd) injetados por via intraperitoneal ou enxertos de baço na cápsula renal provenientes dos mesmos animais são rejeitados de forma bastante eficiente em camundongos tratados previamente com células BN de F1(bXd). Surpreendentemente, receptores tratados com células BN de F1(bXd) fêmea e enxertados com dois transplantes — B6 macho e F1(bXd) fêmea —, **aceitaram o enxerto de B6 macho e rejeitaram o de F1(bXd) fêmea** apesar de nunca terem tido contato com antígenos de macho, sugerindo que o fenômeno de tolerância ao antígeno H-Y é secundário à tolerância induzida por

antígenos F1(bxd) e ao enxerto de pele do mesmo. A análise histopatológica das peles aceitas de B6 macho mostrou infiltrados linfocitários, indicando envolvimento de mecanismos ativos de tolerância mediada por células BN. Uma possível explicação seria a participação de células T regulatórias (Treg) pelo tratamento com linfócitos BN. De fato, o tratamento prévio com BN potencializa a função supressora das células Treg e bloqueia a proliferação no linfonodo drenante do desafio em camundongos tratados previamente com BN e desafiados com esplenócitos de F1(bxd). Ainda, o tratamento com anti-CD25 reverte a tolerância induzida pelos linfócitos B. Vale ainda ressaltar que linfócitos B ativados com LPS não são capazes de induzir tolerância no modelo de transplante de pele. Unindo as informações, nossos dados sugerem que os linfócitos BN induzem tolerância de forma dependente de Treg. As células BN estariam pré-ativando a população de células T regulatórias, estas células receberiam um segundo estímulo fornecido pelo enxerto semialogeneico de F1(bxd), tornando possível uma tolerância ao H-Y secundária à pele de F1(bxd). Por outro lado, para a aceitação do enxerto de pele, se faz necessário um equilíbrio adequado entre as células efetoras e regulatórias.

Abstract:

**Naive B cells induced tolerance is dependent of
regulatory T cells**

Sheila Charchat

Abstract da tese de doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfológicas, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Doutor em Ciências (Morfológicas).

Naive B cells (NB) can induce T cell tolerance to simple antigens, as H-Y. Here, we asked if B cells could also tolerize allospecific T cells *in vivo*. C57BL/6 (B6) female mice were pretreated with NB from (C57BL/6xBALB/c)F1 — called F1(bxd) from now — male mice and tested for skin graft tolerance. As expected, these mice accept male B6 skin grafts. However, pretreatment with F1(bxd) NB cells did not prevent rejection of F1(bxd) grafts. The failure of NB in inducing tolerance to allogeneic skin is not due to differences in the antigenic profile of B cells and skin cells, since F1(bxd) B cells injected intraperitoneally, or F1(bxd) splenocytes grafted into kidney capsule, were promptly rejected into F1(bxd) NB-treated B6 recipients. Somewhat surprisingly, when the B6 recipient was treated with female F1(bxd) NB, **male skin graft is accepted** if the same recipient receives a **F1(bxd) skin graft** (which is rejected), suggesting that tolerance to male skin was achieved secondary to F1(bxd) induced tolerance and skin graft. The histopathological analyses of the accepted male skin showed lymphocyte infiltrate, indicating an active tolerance induction. A possible explanation is the participation of regulatory T cells by NB treatment. In fact, pretreatment with NB induces an improvement in the suppressive function of regulatory T cells and blocks cell proliferation in the challenged draining lymph nodes of mice treated with these NB cells. Also, the blockade of regulatory T cells function by treatment with anti-CD25 antibody *in vivo*, broke

the tolerance induction to male skin on a female B6 mice pretreated with NB cells from male mice. Besides, LPS treated NB cells did not induce tolerance on the skin graft transplantation model. Together, our data support the idea that naive B cells induce tolerance mediated by Treg. Our data support the idea that NB can pre-activate Treg. These cells should receive a second signal given by F1(bxd) graft, resulting in a secondary tolerance of the male skin transplant. The tolerance or rejection will depend on the responder/regulatory T cells ratio.

Sumário

Abreviaturas	xv
1-Introdução	1
1.1- Tolerância Imunológica	1
1.1.1- Tolerância Central dos Linfócitos T	1
1.1.2- Tolerância Imunológica Periférica	3
1.1.2.1- Anergia	5
1.1.2.2- Células T regulatórias	13
1.1.2.2.1- Ontogenia das Células T regulatórias	18
1.1.2.2.2- Função supressora das células T regulatórias	23
1.2- Linfócitos B como indutores de tolerância imunológica	29
1.3- Alorreconhecimento pelos linfócitos T	35
2- Objetivos	39
3-Materiais e Métodos	40
3.1- Animais	40
3.2- Meios de Cultura	40
3.3- Obtenção de células	41
3.3.1- Células de Baço	41
3.3.2- Células de Linfonodos Poplíteos e Mesentéricos	41
3.3.3- Células T purificadas de linfonodos mesentéricos	41
3.3.4- Células B virgens	41
3.3.5- Células B	44
3.4- Análise fenotípica das células T por citometria de fluxo	45
3.4.1- Marcação de moléculas de superfície	45
3.4.2- Marcações intracitoplasmáticas	45
3.4.3- Anticorpos utilizados em citometria de fluxo	46
3.5- Culturas de células	46
3.5.1- Estimulação dos Linfócitos B virgens com LPS	46
3.5.2- Avaliação da capacidade co-estimulatória dos linfócitos B virgens	47
3.5.3- Ensaio de supressão	48

3.5.3.1- Células respondedoras	48
3.5.3.2- Células estimuladoras	48
3.5.3.3- Células supressoras	48
3.5.3.4- Teste da supressão	48
3.6- Transferências de células	49
3.6.1- Intraperitoneal	49
3.6.2- No Coxim Plantar	49
3.6.3- Endovenosa	49
3.7- Marcação de células utilizando CFSE	49
3.8- Enriquecimento de anticorpos anti-CD25	50
3.8.1- Cultura de células em Spinner	50
3.8.2- Ultracentrifugação em membrana de AMICON	50
3.8.3- Precipitação da proteína de interesse	50
3.8.4- Diálise das proteínas precipitadas	51
3.8.5- Centrifugação e pureza da amostra	51
3.9- Tratamento com o anticorpo 7D4	52
3.10- Transplantes	52
3.10.1- Transplante de baço na cápsula renal	52
3.10.2- Transplante de pele	52
3.11- Análise histopatológica	53
3.12 - Análise Estatística	53
4- Resultados	55
4.1- Isolamento dos linfócitos B virgens	55
4.1.1- Purificação dos linfócitos B	55
4.1.2- Ensaio funcionais <i>in vitro</i> para a avaliação da viabilidade das células B	56
4.1.3- Ensaio funcionais <i>in vitro</i> para a avaliação da capacidade estimulatória das células B	57
4.1.3.1- Células B purificadas não provêm co-estimulação aos linfócitos T estimulados com ConA	58
4.1.3.2- Linfócitos B virgens não são capazes de estimular uma MLR	59
4.2- Linfócitos B não induzem tolerância a antígenos alogênicos no modelo de transplante de pele	61

4.3- A tolerância mediada por linfócitos B virgens não é tecido-específica	65
4.4- Células BN de F1(bXd) induzem tolerância a antígenos “menores” não relacionados	73
4.5 - A análise histopatológica das peles tolerizadas por células BN apresentam infiltrado linfocitário	78
4.6 O tratamento com linfócitos B virgens inibe o aumento do número absoluto de células viáveis do linfonodo drenante, sem alterar o valor relativo das células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	80
4.7 O tratamento com linfócitos B virgens potencia atividade supressora em camundongos Marylin RAG ^{-/-} sem aumento relativo nas células T CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	83
4.8- Tratamento com anticorpos anti-CD25 bloqueia a tolerância mediada por células BN	86
4.9- A tolerância ao antígeno H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea é bloqueada com 7D-4	91
4.10- Linfócitos B ativados com LPS são incapazes de induzir tolerância no modelo de transplante de pele.	93
5- Discussão	98
6- Conclusões	115
7- Referências Bibliográficas	116

Abreviaturas:

APC - células apresentadoras de antígenos

Anti-CD25 - anticorpos específicos para a molécula CD25

AICD - morte celular induzida por ativação (*activated induced cell death*)

AIRE - gene regulador de auto-imunidade (*autoimmune regulator gene*)

c-TEC - células epiteliais corticais tímicas

BCR - receptor de linfócitos B

BN - linfócitos B virgens

B6 - camundongos C57/Bl6

CPM – contagens por minuto

ConA - concanavalina A

CTLA-4 - O antígeno citotóxico de linfócitos (*cytotoxic lymphocyte antigen 4*)

DC – células dendríticas (*dendritic cells*)

ECDI - 1-etil-3(dimetilaminopropil)-carbodiámid

F1(bxd) - camundongos F1(C57/BL/6xBALB/c)

GAT - polímero composto pelos aminoácidos glutamina, alanina e treonina)

GFP - proteína verde fluorescente (*green fluorescent protein*)

HA - hemaglutinina A do vírus influenza

HGG - gamaglobulina humana (*human gamaglobulin*)

H-Y - antígeno específico de macho

IBD - doença inflamatória intestinal (*Inflammatory Bowel Disease*)

IP - intraperitoneal

IPEX - síndrome da imuno-desregulação poliendócrina e enteropática ligada ao cromossomo X (*Immune dysregulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome*)

iTreg - células T regulatórias induzidas

IV – endovenosa

LPS - lipopolissacarídeo

MHC - complexo principal de histocompatibilidade (*major histocompatibility complex*)

MHC+pep - complexo MHC+peptídeo

MLR – reação mista leucocitária (*mix leucocyte reaction*)

m-TEC - células epiteliais medulares tímicas
NB - “Naive B cells”
NFAT - fator nuclear de ativação de linfócitos T (*nuclear factor of activating T cells*)
nTreg - células T regulatórias naturais
OVA - ovalbumina
PCC - citocromo C de pombo
PLA - peptídeos ligantes alterados
RAG - enzima ativadora de recombinação gênica
RAG^{-/-} - ausência da enzima RAG
SC – subcutânea
SFB – soro fetal bovino
TCR - receptor de linfócitos T (*Tcell receptor*)
TGF- β - fator de crescimento tumoral (*Tumor Growth factor*)
TNF - fator de necrose tumoral (*tumor necrosis factors*)
TLR – receptors tipo Toll (*toll like receptor*)
Tg - transgênico
Tr1 - T regulatória tipo 1
Treg- células T regulatórias
WT – selvagem (*wild type*)

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tolerância Imunológica

Diariamente, nos confrontamos com uma infinidade de agentes patogênicos do ambiente que invadem a integridade individual e são rotineiramente eliminados pelos agentes da resposta imune inata e adaptativa. Simultaneamente, o sistema imunológico é capaz de prevenir uma auto-reatividade patogênica: respostas danosas a antígenos presentes no próprio corpo do indivíduo. Os mecanismos celulares e moleculares responsáveis por preservar o organismo de respostas imunes dirigidas a autoantígenos são chamados **Tolerância Imunológica** ao próprio (*self*) e vêm sendo intensamente estudados.

1.1.1. Tolerância Central dos Linfócitos T

A tolerância imunológica do repertório de linfócitos T começa no timo, onde é chamada **Tolerância Central** (Scwartz, 1999). Neste órgão, ocorre o comprometimento de progenitores linfóides oriundos da medula óssea com a linhagem T e procede seu processo de maturação e diferenciação. Ao longo desses processos acima mencionados, os timócitos (precursores de linfócitos T) interagem com uma série de células presentes no microambiente tímico, fundamentais nos eventos de seleção de repertório e indução de tolerância. Estas células são as células epiteliais corticais (c-TEC) e medulares (m-TEC)

que compõe o estroma tímico, os macrófagos, as células dendríticas (DC, *dendritic cells*) e os linfócitos B (Anderson, Moore e cols. 1996).

Para completar o processo de maturação no timo, os linfócitos T em desenvolvimento precisam de estímulos que os mantenham vivos. Tal estímulo é obtido através de seus receptores para antígeno (TCR, *T cell receptor*) que reconhecem com baixa avidéz/afinidade os complexos principais de histocompatibilidade (MHC, *major histocompatibility complex*) acoplados a peptídeos (MHC+pep) expressos nas células estromais, como c-TEC e células dendríticas (Robey & Fowlkes, 1994). Dessa maneira, forma-se um repertório de células T restritas pelo MHC presente no ambiente tímico, capazes de reconhecer complexos MHC próprios existentes nos tecidos periféricos. Este processo é conhecido como **Seleção Positiva** dos linfócitos T (Hogquist, Jameson e cols. 1994). Por outro lado, se estes linfócitos reconhecerem os complexos MHC+pep presentes no microambiente tímico com alta avidéz/afinidade, estes clones auto-reativos sofrem apoptose e são eliminados por um processo conhecido como **Seleção Negativa** ou **Deleção Clonal** (Kappler, Roehm e cols. 1987). O papel do timo na tolerância central tornou-se ainda mais claro após a descoberta da existência, no micro-ambiente desse órgão, de transcritos de RNA capazes de codificar proteínas, cuja expressão acreditava-se ser restrita a tecidos periféricos (Sospedra, Ferrer-Francesch e cols., 1998; Kyewski & Derbinski, 2004). Estão ainda presentes no timo antígenos ectopicamente expressos e associados às doenças auto-imunes órgão-específicas ou não, como insulina, tireoglobulina, proteínas de mielina básica, antígenos S-retinal, proteínas de pâncreas, fígado e sistema nervoso. Curiosamente muitos destes antígenos de expressão ectópica têm sua

expressão no timo controlada por um único gene chamado gene regulador de auto-imunidade (AIRE, *Autoimmune Regulator Gene*) (Su & Anderson, 2004). Mutações neste gene levam a uma síndrome auto-immune de expressão clínica variável em humanos (Peterson, Nagamine e cols., 1998), mas que caracteristicamente tem órgãos endócrinos como alvo da auto-imunidade. Dados da literatura sugerem uma correlação entre os níveis de antígenos presentes no timo e a suscetibilidade ao desenvolvimento de doenças auto-imunes. Dependendo da dose antigênica expressa no timo pode ocorrer uma deleção apenas parcial dos clones específicos para tal antígeno (Liston, Gray e cols., 2004). Parece haver também antígenos sem representação intratímica (Bonomo & Matzinger, 1993)

Surge, então, a necessidade de processos alternativos periféricos capazes de deter esses clones de linfócitos T com potencial danoso ao indivíduo.

1.1.2 Tolerância Imunológica Periférica

Ao completar seu desenvolvimento no timo, os linfócitos T migram para a periferia, onde encontram uma variedade de antígenos próprios não expressos no microambiente tímico, ou seja, antígenos capazes de serem reconhecidos pelos linfócitos T. Estes linfócitos são controlados por mecanismos periféricos responsáveis por torná-las não responsivas a estes auto-antígenos.

Dentre os mecanismos de tolerância periférica temos a **Deleção Periférica** que ocorre por meio da indução de apoptose, em resposta a um

estímulo continuado via TCR. Estudos sugerem um importante papel da sinalização Fas-FasL neste processo. Este mecanismo é conhecido como morte induzida por ativação (**AICD**, *Activation Induced Cell Death*) (Singer & Abbas, 1994). Por outro lado, a resposta da célula T pode estar ausente pelo fato de o antígeno não estar associado a moléculas de MHC (Barcinski & Rosenthal, 1977), ou ainda seqüestrado em lugares não acessíveis aos sistemas linfático e sanguíneo, não sendo capaz de entrar em contato com as células do sistema imune. Este fenômeno é chamado **Tolerância por Ignorância** (Alferink, Tafuri e cols., 1998; Zinkernagel, 1996). Pode ocorrer também uma tolerização periférica ao próprio por apresentação cruzada realizada por células apresentadoras de antígenos (APC, *antigen presenting cells*) derivadas da medula óssea, presentes nos linfonodos periféricos. Clones citotóxicos específicos para antígenos constitutivos, expressos extratimicamente, são tolerizados pela apresentação cruzada desses antígenos em células dendríticas. A maneira como esses linfócitos são tolerizados e o subtipo de células apresentadoras envolvidos precisam ser mais bem elucidados, acredita-se na participação de mecanismos de deleção, induzidos principalmente por uma subpopulação de células dendríticas. O estado de maturação da APC e os níveis de moléculas MHC tipo I+pep apresentados parecem influenciar a indução de tolerância. Além disso, a concentração do antígeno também contribui para o processo, no qual altas doses induziriam tolerância (deleção), ao passo que baixas doses seriam ignoradas. Este fenômeno é conhecido como **tolerância cruzada** (Heath & Carbone, 2001; Melief, 2005). Outros dois importantes processos utilizados na manutenção da tolerância periférica são a **Anergia** — encontro da célula T com antígeno na

periferia, na ausência de co-estímulo, leva a inativação destes linfócitos (Jenkins & Schwartz, 1987) — e a **Supressão** - mediada por células T regulatórias (Treg) que suprimem a resposta de linfócitos T efetores (Sakaguchi S., Sakaguchi N., e cols., 1995; Takahashi, Kuniyasu e cols., 1998) . Estes dois últimos mecanismos mencionados serão explicados mais detalhadamente a seguir.

1.1.2.1 Anergia

O termo anergia foi originalmente utilizado por Von Pirquet em 1908, para descrever a ausência de hipersensibilidade à tuberculina em testes realizados na pele de indivíduos infectados com o vírus do sarampo. Em 1980, Nossal & Pike utilizaram esta mesma terminologia para descrever a inativação funcional de linfócitos B observada em experimentos *in vivo*, nos quais camundongos foram tolerizados pela injeção de antígenos de gamaglobulina humana (HGG, *human gamaglobulin*) durante a gestação, ou logo após o nascimento. Sendo este fenômeno antígeno-específico, a expressão anergia clonal foi utilizada. No início dos anos 1990, este setor da imunologia tornou-se bastante popular, e o termo anergia foi utilizado para conceituar os fenômenos relacionados com a sobrevivência de linfócitos aparentemente não-responsivos (Schwartz, 2003).

A denominação anergia passou a ser utilizada também para os linfócitos T. A definição geral para a anergia das células T é todo o mecanismo de tolerância, em que os linfócitos T são funcionalmente inativados após o encontro com o antígeno, porém permanecem vivos por um longo período em

um estado de hiporresponsividade. Esta inativação funcional é caracterizada por diversas limitações, como veremos a seguir.

Basicamente, a anergia da célula T é dividida em duas categorias: **Anergia Clonal** (análise da não-responsividade dos clones de célula T *in vitro*) e **Tolerância Adaptativa ou Anergia *in vivo*** (Schwartz, 2003).

A expressão **anergia clonal** foi adotada por Jenkins & Schwartz, 1987, na descrição de um estado de hiporresponsividade, induzido *in vitro*, em clones de linfócitos T CD4. Nos experimentos iniciais, Jenkins & Schwartz observaram que clones de linfócitos T, inicialmente estimulados com células apresentadoras de antígenos quimicamente modificadas pelo tratamento com 1-etil-3(dimetilaminopropil)-carbodiimida (ECDI), droga que altera as ligações realizadas na membrana celular através de ligações cruzadas inespecíficas, não eram capazes de proliferar e/ou produzir a citocina IL-2 frente um segundo estímulo completo, fornecido por APC intacta + peptídeo (Jenkins & Schwartz, 1987). Este grupo demonstrou ainda que tal fenômeno pode ocorrer também *in vivo*. Com a descrição das moléculas co-estimulatórias (B7/CD28) descobriu-se que o tratamento com ECDI inativa a função co-estimulatória das APC, sugerindo que a ativação de um linfócito T na presença de um estímulo via TCR (sinal 1) e na ausência de um segundo sinal fornecido pela ligação B7 com CD28 (sinal 2) gera nestas células o estado anérgico (**Figura 1**) (Schwartz, 2003).

Tais observações promovem um suporte experimental para o modelo proposto por Lafferty e colaboradores que sugere a necessidade de dois sinais para ativação da célula T. Em seus experimentos, cultivaram pâncreas e tireóide em meio de cultura por 4 dias, eliminando o componente

hematopoético. Os órgãos eram transplantados para hospedeiros alogeneicos, e não eram rejeitados, diferentemente do que acontecia quando os órgãos eram transplantados sem pré-cultivo *in vitro*. No entanto, se ao transplantar os órgãos cultivados por 4 dias, fossem injetadas células de baço, a rejeição era evidenciada (Lafferty, Warren e cols., 1978). A partir desses achados, os pesquisadores propuseram a necessidade de um outro sinal, além do reconhecimento antigênico, para que os linfócitos T pudessem ser ativados e rejeitar o enxerto. Este sinal seria fornecido por células hematopoéticas, as quais ele designou como “o leucócito de passagem” (*the passenger leukocyte*).

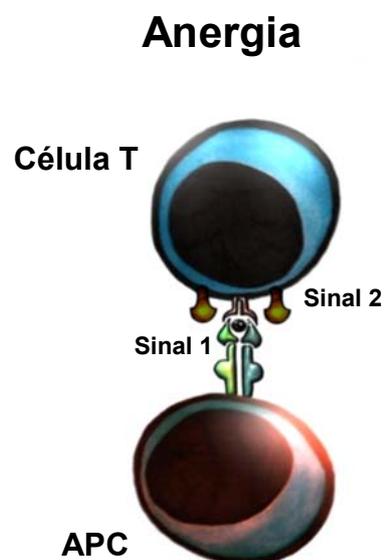


Figura 1. Anergia das Células T. A figura representa uma célula T sendo ativada via TCR (sinal 1), sem co-estimulação (sinal 2). Esta forma inadequada de ativação promove o fenômeno da anergia. (*Ilustração Real F.*).

Experimentos adicionais, também realizados *in vitro*, mostraram que outra maneira de gerar a anergia das células T é através de baixas doses de peptídeos agonistas ou de peptídeos ligantes alterados (PLA). Estes PLA são agonistas modificados que ainda possuem a capacidade de ligação ao TCR, porém não induzem ativação completa. A ligação dessas moléculas, mesmo na presença de co-estímulo, resulta em linfócitos T hiporresponsivos. Estes linfócitos mantêm este fenótipo anérgico ainda que, posteriormente, sejam ativados corretamente pelo seu agonista (Powell, 2006).

Não está claramente elucidado se os mecanismos responsáveis pela indução do estado anérgico nos diferentes modelos estudados *in vitro* são os mesmos, mas verifica-se em todos os casos um reconhecimento inadequado via TCR (ausência de co-estimulação ou sinalização inadequada dos peptídeos).

A primeira observação de **anergia de células T *in vivo*** ou **tolerância adaptativa** foi feita por Jenkins & Schwartz em 1987, como mencionado anteriormente. Em seus experimentos, camundongos receberam uma injeção endovenosa de esplenócitos tratados com ECDI e acoplados com o antígeno de citocromo C. Após o desafio com o antígeno na presença de adjuvante de *Freund*, os linfócitos apresentavam hiporresponsividade no teste *in vitro*. Em 1989, Rammensee, Kroschewski e colaboradores, demonstraram novamente este fenômeno através da transferência celular, endovenosa, de esplenócitos de camundongos C3H.CE (que expressam o antígeno Mls1^a) para camundongos C3H/HeJ (Mls1^b), que respondem muito bem ao antígeno Mls1^a. Após o desencadeamento da resposta imunológica, alguns clones específicos para o antígeno em questão permaneceram no hospedeiro, porém esses

linfócitos T recuperados apresentaram traços típicos de anergia clonal: incapacidade de proliferação e produção de IL-2 no reestímulo *in vitro* (Rammensee, Kroschewski e cols., 1989). Resultados similares foram observados com a administração de superantígenos bacterianos e em situações de infecção viral persistente. Nesses exemplos, verificou-se que os clones relevantes de linfócitos T primeiro se expandiam e, posteriormente, um grande número destas células morria. Entretanto, foi observada a permanência de uma população remanescente não-responsiva (Schwartz, 2003). Além dos estudos acima mencionados, outros modelos de tolerância adaptativa foram propostos, entretanto as observações do fenótipo anérgico (produção de citocinas, proliferação e persistência do estado anérgico) é variável entre eles (Powell, 2006).

Como mencionado anteriormente, os estudos que demonstram o fenômeno da anergia sugerem a necessidade de dois sinais para a ativação efetiva dos linfócitos T. Sendo assim, nas últimas décadas uma variedade de moléculas acessórias co-estimulatórias de células T foram descritas. A molécula CD28 é muito bem caracterizada e mostra-se como o mais efetivo agente co-estimulatório presente em linfócitos T virgens ou previamente ativados. O CD28 é uma glicoproteína de superfície celular que se liga ao B7.1 (CD80) e ao B7.2 (CD86) presentes nas células apresentadoras de antígenos. O reconhecimento do antígeno pelo TCR na ausência da ligação do CD28 resulta em apoptose ou anergia do linfócito em questão (Appleman & Boussiotis, 2003).

A segunda grande família de moléculas co-estimulatórias inclui os membros da família de fatores de necrose tumoral (TNF, *tumor necrosis*

factors), CD40, 41BB, OX40, CD30 e CD27. Acredita-se que, no caso de uma ativação completa dos linfócitos T, após o reconhecimento das moléculas MHC+pep pelo TCR, baixos níveis de B7.1 e B7.2 presentes nas APC, fornecem os primeiros sinais co-estimulatórios via CD28. Esta ativação induz o ligante de CD40 (CD40L), que por sua vez interage com o CD40 na APC, promovendo aumento na expressão de B7.1 e B7.2, dando continuidade ao processo de ativação (Appleman & Boussiotis, 2003).

No caso da anergia clonal, ou anergia gerada *in vitro*, a simples ausência do segundo sinal é suficiente para a indução de hiporresponsividade. Já, para a tolerância adaptativa ou anergia *in vivo*, se faz necessário o reconhecimento, pelos linfócitos T, de potentes sinais negativos que ultrapassem os estímulos coestimulatórios fornecidos pelas APC (Appleman & Boussiotis, 2003). O antígeno citotóxico de linfócitos T 4 (CTLA-4, *cytotoxic lymphocyte antigen 4*) (CD152) é caracterizado como potente regulador da indução de tolerância adaptativa. O CTLA-4 é uma glicoproteína presente nas células T, que assim como o CD28 liga-se às moléculas B7. Mas em vez de estimular os linfócitos T a progredirem no processo de ativação, os inibem (Greenwald, Boussiotis e cols., 2001).

A influência do CTLA-4 na determinação das células T em tomar o caminho da ativação ou da tolerização foi estudada em camundongos DO11.10⁺RAG^{-/-} — camundongos transgênicos (Tg) deficientes para a enzima RAG (RAG^{-/-}) com TCRs específicos para um peptídeo de ovalbumina (OVA) restritos por I-A^d. Estes animais foram cruzados com camundongos Tg CTLA-4^{-/-}. Linfócitos T de animais RAG^{-/-} DO11.10⁺ selvagens (WT, *wild type*) ou CTLA-4^{-/-} foram transferidos para receptores singênicos ao MHC e submetidos

a um regime de tolerização com o peptídeo de OVA endovenoso. Após o estímulo tolerogênico, as células WT foram incapazes de proliferar e produzir IL-2 no reestímulo com o antígeno *in vitro*; por outro lado, linfócitos T provenientes dos animais CTLA-4^{-/-} mostraram-se resistentes à indução de tolerância, apresentando proliferação e produção de IL-2 no reestímulo *in vitro*. A tolerância observada foi devida ao bloqueio da progressão do ciclo celular na fase G1 (Greenwald, Boussiotis e cols., 2001).

A figura 2 resume as diferentes condições de reconhecimento pelo TCR e suas possíveis conseqüências nos linfócitos T.

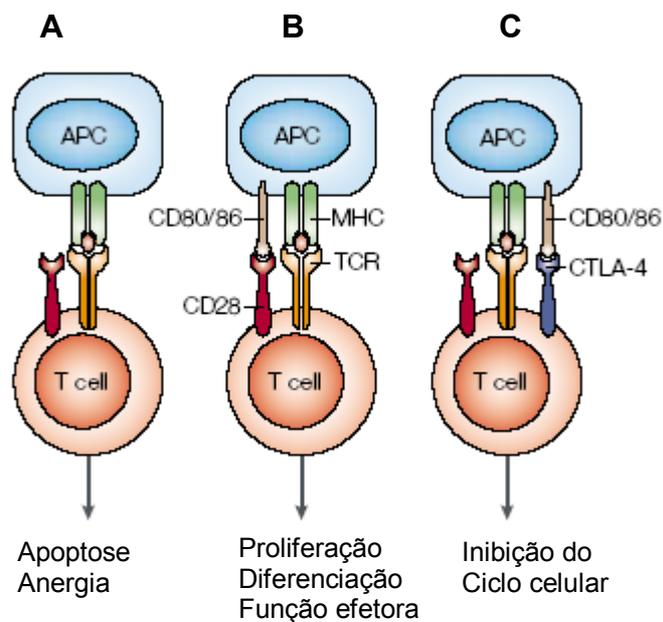


Figura 2. Mecanismos de ativação e inativação dos linfócitos T. A figura ilustra as possíveis condições de encontro de um linfócito T com seu antígeno. Na primeira situação (A), a apresentação do antígeno ocorre via ligação TCR-MHC, na ausência de co-estímulo, induzindo apoptose e anergia nestas células T. Em B, observa-se a ativação realizada em condições ideais: apresentação de antígeno via ligação TCR-MHC, na presença do co-estímulo, fornecido pela ligação das moléculas B7 com CD28. Já na letra C, verifica-se o bloqueio do ciclo celular dos linfócitos T, induzido por sinais negativos, como o fornecido pela ligação CTLA-4-B7. (Alegre, Frauwirth e cols., 2001).

Outra ferramenta importante na indução de anergia é o aprisionamento do ciclo celular. As relações entre anergia e o bloqueio do ciclo celular vêm sendo estudadas *in vitro* e *in vivo*. Em ensaios *in vitro*, foi demonstrado que o estado anérgico pode ser induzido, mesmo na presença de co-estímulo, se ocorrer a parada do ciclo celular na fase G1. Por outro lado, se o bloqueio do ciclo se der na fase S, não ocorre a anergia, apesar da incapacidade destas células de proliferarem na estimulação primária (Powell, 2006). Curiosamente, relatos da literatura mostram que linfócitos T ativados em condições ideais (TCR+CD28) proliferavam de maneira heterogênea. Cerca de 40% dessas células não são capazes de entrar em expansão clonal. Como ferramenta experimental para investigar estes dados, utilizou-se ensaios *in vitro*, analisando o comportamento individual de células TCD4⁺ submetidas a ativação policlonal. Por citometria de fluxo, as células foram separadas com base no número de divisões celulares realizadas. Cada grupo de linfócitos foi reestimulado de forma completa (TCR+CD28). Verificaram que a resposta secundária é dependente do histórico de divisões celulares anteriores (ocorridas frente ao estímulo primário), sendo que células que apresentaram um elevado número de divisões celulares na resposta primária produzem IL-2 e proliferam no reestímulo. Já as células que não foram capazes de se dividir no estímulo primário apresentaram expressiva hiporresponsividade, sendo refratárias ao estímulo TCR+CD28 e à adição de IL-2 exógena (Wells, Walsh e cols., 2000).

Com base nesses dados, fica clara a importância do processo de divisão celular e progressão do ciclo celular na indução do fenômeno da anergia. Estes

processos podem representar um direcionamento para a geração de linfócitos anérgicos ou efetores/memória.

Enquanto o verdadeiro papel das células T anérgicas continua em debate, fica claro que o estudo dos diferentes modelos de anergia permite importantes descobertas referentes à ativação e inibição dos linfócitos T. Numa perspectiva clínica, o descobrimento de alvos específicos capazes de modular a função das células T poderia ser fundamental em casos de aceitação de transplantes, tratamento de doenças auto-imunes e respostas antitumorais.

1.1.2.2 Células T regulatórias

Conforme mencionado anteriormente, existem clones de linfócitos T com elevado potencial auto-reativo que escapam da deleção tímica e migram para a periferia. Surgem então importantes mecanismos de tolerância periférica para evitar que esses linfócitos causem danos ao organismo. Além dos mecanismos passivos já citados (anergia, deleção, ignorância imunológica e tolerância cruzada), as células T regulatórias representam um agente supressor ativo desses linfócitos.

A existência de uma população de linfócitos com atividade supressora, capaz de inibir respostas imunológicas (incluindo tanto a produção de anticorpos pelas células B, quanto a ativação de outros linfócitos T) foi primeiramente descrita na década de 1970 (Gershon & Kondo, 1970). Acreditava-se que estas células eram linfócitos T CD8 supressores que exerciam suas funções biológicas através da síntese de fatores solúveis antígeno-específicos. Porém, devido ao insucesso na caracterização desses

fatores e à ausência de marcadores específicos que pudessem diferenciar essa população, os estudos baseados na supressão mediada por células T foram deixados de lado pelos pesquisadores.

Os experimentos que colocaram novamente em evidência a população de linfócitos T supressores, no início da década de 1980, provêm de estudos envolvendo a indução de auto-imunidade órgão-específica pela manipulação da homeostase dos linfócitos. Esses resultados mostraram que a remoção do timo de um camundongo no terceiro dia de vida leva ao desenvolvimento de um variado espectro de doenças auto-imunes órgão-específicas. Entretanto, se a remoção desse órgão for realizada no sétimo dia de vida desse animal, o aparecimento dessas doenças não é observado (Kojima, Tanaka-Kojima e cols. 1976; Kojima, Taguchi e cols.,1980). De acordo com os autores, o aparecimento destas doenças auto-imunes é consequência da depleção de uma subpopulação de células T com capacidade supressora, já que a transferência de linfócitos T CD4⁺ esplênicos ou timócitos de camundongos adultos normais previne a indução das doenças (Sakaguchi, Takahashi e cols.,1982). Mais tarde, as células T efectoras e regulatórias foram mais bem caracterizadas, mostrando-se CD4⁺CD8⁻ (Smith,Chen e cols., 1989).

Apesar dos experimentos iniciais sugerirem fortemente a existência de uma população composta de células T regulatórias, o progresso destes estudos foi muito lento devido à ausência de um marcador de membrana específico para esses linfócitos (Shevach, 2000). Sakaguchi e cols. foram os primeiros a propor que as células Treg poderiam ser separadas das células efectoras pela expressão relativa do antígeno Lyt-1 (CD5) (Sakaguchi, Takahashi e cols., 1982). No início da década de 1990, Powrie e Mason

contribuíram para a caracterização das células T regulatórias, demonstrando que células T $CD4^+CD45RB^{High}$ induziam doença inflamatória intestinal (IBD, *Inflammatory Bowel Disease*), quando inoculadas em camundongos imunodeficientes, enquanto os animais que recebiam linfócitos T $CD4^+CD45RB^{low}$, ou ambas as populações citadas não desenvolviam lesões intestinais (Powrie & Mason, 1990). Logo, os primeiros marcadores de superfície de Treg foram identificados, elas apresentavam $CD5^{High}$ e $CD45RB^{low}$. Entretanto esses marcadores não eram específicos desta subpopulação regulatória, estando presentes também em linfócitos T ativados.

Um grande avanço na caracterização das células T supressoras foi a demonstração por Sakaguchi S, Sakaguchi N e cols., de que as células regulatórias estavam presentes em cerca de 5% a 10 % das células $CD4^+$ e que co-expressavam o receptor da cadeia α de IL-2 (CD25). Estas células mostraram-se anérgicas, já que não foram capazes de proliferar e produzir IL-2 frente à estimulação via TCR *in vitro* (Sakaguchi S., Sakaguchi N. e cols., 1995). Além disso, a transferência de linfócitos $CD4^+$ de camundongos adultos depletados *in vitro* da subpopulação $CD4^+CD25^+$ para receptores imunodeficientes induzia o desenvolvimento de doenças auto-imunes semelhantes às observadas no modelo de timectomia no terceiro dia de vida. A transferência das células $CD4^+CD25^+$ dez dias após a transferência das $CD4^+CD25^-$ prevenia completamente a indução da doença. Apesar de nem todas as células $CD4^+CD45RB^{low}$ apresentarem o marcador CD25, Read, Malmstrom e cols., demonstraram que dentro da população de células $CD4^+CD45Rb^{low}$, somente as $CD25^+$ eram capazes de prevenir IBD quando

inoculadas em receptores imunodeficientes juntamente com os linfócitos patogênicos CD4⁺CD45RB^{high} (Read, Malmstrom e cols., 2000).

Além do CD25 e do CD45RB, outros marcadores têm sido utilizados para identificar as células Treg, entre eles, CTLA-4, CD62L, CD69 e GITR (TNFRSF18) (Shevach, 2002). Entretanto essas moléculas de superfície celular, incluindo o CD25, não são suficientes para discriminar completamente as células T regulatórias das ativadas, efetoras e de memória, uma vez que essas células também apresentam esses marcadores, ainda que transitoriamente. A busca de um marcador definitivo das Treg resultou na identificação do fator de transcrição Foxp3 (*Forkhead winged-helix transcription factor family member*) (Hori, Nomura e cols., 2003; Fontenot, Gavin e cols., 2003; Khattri, Cox e cols., 2003). Este fator de transcrição é atualmente, o melhor marcador das células T regulatórias.

A elucidação da genética ou caracterização gênica da desordem auto-imune conhecida como síndrome da imuno-desregulação poliendócrina e enteropática ligada ao cromossomo X (IPEX, *Immune dysregulation Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-linked Syndrome*) promoveu o próximo grande avanço no estudo das Treg. Mutações no gene Foxp3 foram identificadas como a causa dessa doença fatal que afeta humanos e camundongos mutantes *scurfy*. Esses camundongos, de forma similar aos humanos, apresentam uma hiperproliferação linfocitária, com doença auto-imune múltipla, órgão-específica, levando à morte dos camundongos ainda no primeiro mês de vida (Brunkow, Jeffery e cols., 2001). As evidentes similaridades entre a patologia adquirida pelas mutações no Foxp3 e manipulações de células T regulatória CD4⁺CD25⁺ promoveram a investigação

de uma possível contribuição deste gene no desenvolvimento e na função das células T regulatórias. Demonstrou-se que o Foxp3 é necessário no desenvolvimento de células Treg no timo, que sua expressão forçada em linfócitos não-regulatórios leva à indução de vários marcadores característicos de células T regulatórias (CD25^{high}, CTLA-4^{high} e GITR^{low}). Este fator também induz nestas células a um fenótipo anérgico em resposta à estimulação via TCR *in vitro* e capacidade supressora demonstrada em ensaios de proliferação *in vitro* e de transferências celulares *in vivo* (Hori, Nomura e cols., 2003; Fontenot, Gavin e cols., 2003; Khattri, Cox e cols., 2003). Uma importante evidência do papel do Foxp3 na geração das células T regulatórias foi constatada em experimentos utilizando uma quimera irradiada e reconstituída com uma mistura de células de medula óssea provenientes de camundongos deficientes para Foxp3 ou controles (camundongos selvagens). Os dados mostram que somente as células oriundas dos animais controles, cujas células expressavam Foxp3, foram capazes de gerar células T regulatórias (Fontenot, Gavin e cols., 2003).

A construção de um camundongo transgênico que expressa uma proteína verde fluorescente (GFP *green fluorescent protein*) como gene repórter sob o contexto do promotor do Foxp3 (Foxp3^{GFP}), possibilitou, através da análise da expressão de Foxp3 em nível de célula individual (*single cell*), a determinação do perfil fenotípico das células que expressam este gene. De acordo com este trabalho, 96% das células que expressam Foxp3 são CD4⁺ e, destas, cerca de 60% a 88% expressam altos níveis de CD25. Além da detecção das células T CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺, uma nova população de Treg foi identificada: CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ ou CD4⁺CD25^{low}Foxp3⁺. Estas novas

populações identificadas possuem capacidade supressora similar às $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ (Fontenot Rasmussen e cols., 2005; Khattri, Cox e cols., 2003).

1.1.2.2.1 Ontogenia das Células T regulatórias

Foi demonstrado que as células Treg se desenvolvem e adquirem o fenótipo supressor no timo, migrando posteriormente para a periferia, onde são chamadas Treg naturais (nTreg). Grande parte destas nTreg expressam CD25 constitutivamente e seu desenvolvimento e função são dependentes do fator de transcrição Foxp3.

A seleção tímica destas células T regulatórias parece fugir o padrão convencional. Ao contrário das células T $CD4^+$ efetoras, a diferenciação das nTreg é induzida pelo reconhecimento de complexos MHC+pep agonistas no timo, situação esta que normalmente provocaria a deleção das células T. Estudos envolvendo camundongos duplo-transgênicos, que apresentam TCR transgênico e seu respectivo antígeno no timo propuseram que a presença do peptídeo agonista de alta afinidade seria capaz de dirigir a diferenciação das células T $CD4^+$ para o fenótipo regulatório $CD25^+$ (Jordan, Boesteanu e cols., 2001). Van Santen, Benoist e cols., demonstraram, em 2004, dados aparentemente contraditórios com os resultados descritos anteriormente. Em seus experimentos utilizaram camundongos TCR-transgênicos em que a expressão gênica do antígeno no timo é controlada por tetraciclina. Os autores puderam analisar a diferenciação das células T regulatórias em respostas a quantidades crescentes de antígenos. Enquanto a maioria das células T foram

deletadas, quando expostas a quantidades crescentes do antígeno, o número absoluto de Treg permaneceu inalterado, dando uma falsa impressão de diferenciação induzida, sendo na verdade uma sobrevivência seletiva destas células (Van Santen, Benoist e cols., 2004). Contudo percebe-se que a presença do antígeno é determinante para a geração das Treg, porém sua concentração parece não influenciar a quantidade de células T regulatórias que é gerada. Vale ainda ressaltar que o antígeno cognato parece ser essencial na indução do gene *Foxp3* e aquisição do fenótipo regulatório das Treg. Camundongos transgênicos *RAG^{-/-}*, que não apresentam o antígeno cognato, não possuem células T *Foxp3⁺* (Apostolou, Sarukhan e cols., 2002; Fontenot, Rasmussen e cols., 2005).

Além das nTreg geradas no timo, existe outro grupo de células regulatórias, conhecidas como T regulatórias induzidas (iTreg). Essas células são induzidas na periferia na presença do antígeno e determinadas citocinas.

As primeiras evidências que sugerem a geração de células Treg na periferia vêm dos estudos de Thorstenson & Khoruts, 2001. Em seus experimentos, observaram que a transferência de linfócitos *CD4⁺CD25⁻* provenientes de camundongos DO11.10 *RAG^{-/-}* (com TCR transgênicos para OVA) para camundongos BALB/c, submetidos a protocolos de tolerização *in vivo* — baixas doses do antígeno administradas via oral ou endovenosa — resultou no aparecimento de células *CD4⁺CD25⁺* com TCR transgênico. Estas células apresentaram atividade supressora *in vitro* e incapacidade de produzir IL-2. Outra importante contribuição surgiu dos resultados de Apostolou & Von Bohemer, 2004, que mostraram que a população de iTreg pode ser estabelecida em camundongos *RAG^{-/-}* timectomizados com TCR específicos

para hemaglutinina A (HA), após uma exposição subcutânea prolongada ao seu peptídeo agonista. Estas células apresentavam fenótipo e função semelhantes aos das nTreg. Vale ainda destacar os estudos de Kretschmer, Apostolou e cols. que mostraram, em 2005, de maneira bastante elegante, que a estimulação de linfócitos T em condições imunogênicas subótimas promove a diferenciação periférica de células regulatórias. Em seus experimentos, linfócitos T CD25⁻ específicos para hemaglutinina A, foram transferidos para receptores linfopênicos e expostos a diferentes doses do peptídeo HA conjugado a um anticorpo específico para DEC-205 – molécula de superfície específica de uma subpopulação de células dendríticas. A expressão de Foxp3 foi detectada em todas as concentrações de antígeno testadas. No entanto, o maior número de células Foxp3⁺ foi detectado com baixas doses de HA. A citocina TGF-β endógena parece ser requerida para a expressão de Foxp3 neste sistema (Kretschmer, Apostolou e cols., 2005). Além desses trabalhos mencionados, outros modelos foram publicados destacando a geração extratímica das células T regulatórias (Curotto de Lafaille, Lino, e cols., 2004; Mahnke, Qian e cols., 2003).

A geração periférica das células T regulatórias é dependente de inúmeros fatores: condições imunogênicas subótimas, dose do antígeno e a influência externa de algumas citocinas. Dentre as citocinas que influenciam a indução das Treg periféricas é importante destacar o fator de crescimento e diferenciação celular, conhecido como TGF-β (*Tumor Growth factor*). Inicialmente, pensava-se que esta citocina era um regulador negativo para a proliferação e função efetora das células T. Atualmente, evidências sugerem que o TGF-β participa da geração das iTreg (Wan & Flavell, 2006). Estudos

realizados em humanos e camundongos mostraram a indução de Foxp3 em células CD4⁺CD25⁻ mediada por TGF- β (Fantini, Becker e cols., 2004 ; Chen, Cui e cols., 2004; Tran, Ramsey e cols., 2007). Apesar da grande importância do TGF- β na indução das Treg periféricas, a participação da citocina IL-2 é indispensável. A parcial neutralização da IL-2 inibe a indução de atividade supressora mediada por TGF- β (Horwitz, Zheng e cols., 2003). Conceitualmente, pode-se dizer que IL-2 e TGF- β possuem papéis diferentes mas complementares na geração das iTreg, enquanto a IL-2 promove as ferramentas metabólicas, o TGF- β mantém as propriedades regulatórias destas células (Wan & Flavell, 2006).

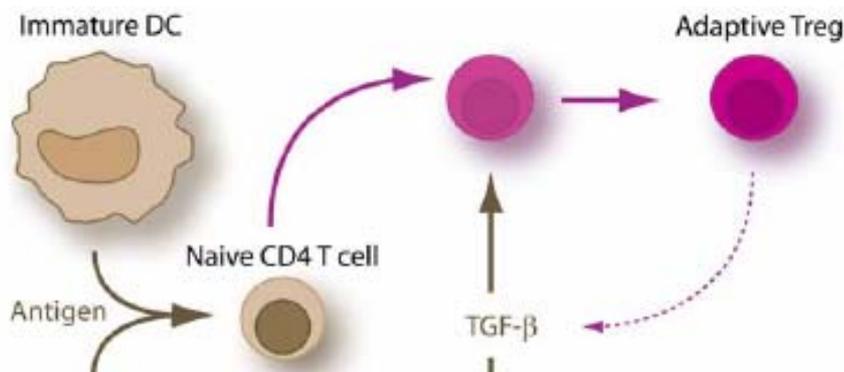


Figura 3. Geração periférica de células regulatórias. A apresentação de antígenos realizada por células dendríticas imaturas (*imature DC*) a linfócitos TCD4 virgens (*naive CD4T cell*) na presença de TGF- β pode gerar uma célula T regulatória na periferia (*adoptive Treg*). (Adaptado de Weaver, Harrington e cols., 2006)

Além do TGF- β e da IL-2, a citocina IL-10 parece também exercer um papel na geração de células T regulatórias. Modelos experimentais realizados em camundongos mostram que a IL-10, juntamente com o TGF- β , promove a indução de anergia em linfócitos T, que por sua vez tornam-se

hiporresponsivos *in vitro* e capazes de suprimir respostas imunes *in vivo* (Zeller, Panoskaltsis-Mortari e cols.,1999). A citocina IL-10 é fundamental para a indução e função das células regulatórias tipo 1 (Tr1). Estas células são frequentemente encontradas na mucosa intestinal e suprimem respostas imunológicas a uma variedade de antígenos cognatos. Ao contrário das células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, não existem ainda marcadores de superfície associados a estas células, sugerindo que as Tr1 compõem uma subpopulação distinta de Treg (Wan & Flavel, 2006).

Relatos da literatura demonstraram que células T regulatórias supressoras CD4⁺CD25⁻ podem ser geradas na periferia pela expressão do antígeno agonista em células hematopoéticas virgens, independentemente da citocina IL-10. Estes dados foram mostrados através de experimentos realizados em camundongos duplo-transgênicos, com TCR específicos para hemaglutinina A e expressando este antígeno no promotor de imunoglobulina. A geração destas células CD4⁺CD25⁻ foi possível na ausência de um timo funcional (Apostolou, Sarukhan e cols., 2002). Recentemente, Hansen, Westendor e colaboradores demonstraram no mesmo modelo que estas Treg CD4⁺CD25⁻ também não expressam o Foxp3 (Hansen, Westendor e cols., 2007).

Com base nos fatos descritos anteriormente, percebe-se que, de acordo com sua origem, as células T regulatórias podem ser divididas em dois grupos distintos: as células que se desenvolvem e adquirem seu fenótipo supressor no timo, migrando posteriormente para a periferia (nTreg); e as células T regulatórias induzidas na periferia na presença de antígeno e determinadas

citocinas (iTreg). Ambas as populações são fundamentais para a manutenção da tolerância periférica.

1.1.2.2 Função supressora das células T regulatórias

As células regulatórias representam um mecanismo negativo de *feedback* para controlar as respostas imunes. Os mecanismos propostos para a função inibitória das células Treg se baseiam em experimentos feitos *in vitro* e *in vivo*. Análises realizadas *in vitro* demonstraram que a supressão da proliferação e produção de citocinas só ocorrem quando as células supressoras e efectoras são cultivadas na presença de um estímulo via TCR, sendo que a adição de IL-2 exógena e anti-CD28 à cultura inibe estes fenômenos (Takahashi, Kuniyasu e cols., 1998; Shevach, 2000). Após esta ativação, policlonal ou antígeno-específica, as Treg podem inibir a resposta imunológica de clones de linfócitos T com especificidade diferente da sua. O experimento demonstrado na figura 4 ilustra claramente esta situação. Neste modelo, clones com especificidade para dois diferentes peptídeos de OVA, uma vez ativados antígeno-especificamente, inibem a proliferação de linfócitos com especificidade diferente da sua (Takahashi, Kuniyasu e cols., 1998). Estas células regulatórias são capazes de suprimir a ativação/proliferação de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺ e células B (Zhao, Thornton e cols., 2006).

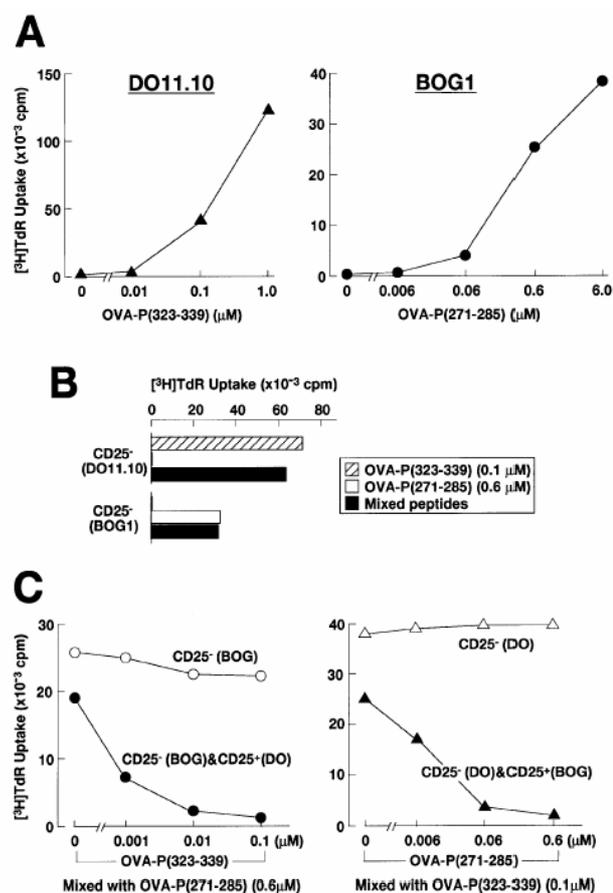


Figura 4. Células T regulatórias podem suprimir células com especificidade diferente da sua. (A) $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ foram purificadas de esplenócitos de camundongos com TCR específico para dois peptídeos de OVA: DO11.10 e BOG1 e estimuladas com diversas concentrações de antígeno de OVA por 3 dias. (B) Linfócitos T $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ de camundongos DO11.10 e BOG1 foram estimulados por 3 dias com a concentração do antígeno de OVA: OVA-P(323-339) e OVA-P(271-285) ou a mistura dos dois peptídeos indicada na figura. Observa-se que os clones DO11.10 e BOG1 não possuem reação cruzada com o outro peptídeo utilizado no ensaio. (C) Linfócitos T $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ de camundongos DO11.10 e BOG1 foram cultivados com o mesmo número de células T $\text{CD25}^+ \text{CD4}^+$ de camundongos BOG1 e DO11.10, respectivamente e estimuladas por 3 dias com a mistura de OVA-P(323-339) e OVA-P(271-285) nas concentrações indicadas. Verifica-se que a célula Treg, ativada pelo seu peptídeo específico suprime a proliferação de um linfócito $\text{CD4}^+ \text{CD25}^-$ com especificidade diferente da sua. (retirado de Takahashi, Kuniyasu e cols., 1998).

Outro dado bastante relevante em relação à função das Treg é sua capacidade de suprimir inespecificamente, *in vivo*, após uma ativação antígeno-específica. Karim, Feng e cols., 2005, demonstraram de forma muito

elegante, em estudos realizados *in vivo*, que, após um regime de tolerização capaz de induzir células T regulatórias a partir do tratamento com anticorpos anti-CD4 e estimulação com um determinado antígeno, estas células induzem a aceitação de um transplante de pele alogeneico em receptor imunodeficiente. Em seus experimentos, camundongos receptores são tratados com anticorpos anti-CD4 endovenoso na presença do antígeno de gamaglobulina humana, após um reestímulo na presença do antígeno em questão as células CD4⁺CD25⁺ foram purificadas a partir dos esplenócitos e transferidas a um receptor imunodeficiente, juntamente com linfócitos TCD4⁺ (CD45Rb^{high}). Este receptor foi capaz de aceitar um transplante de pele de um doador alogeneico. (Figura 5) (Karim, Feng e cols., 2005).

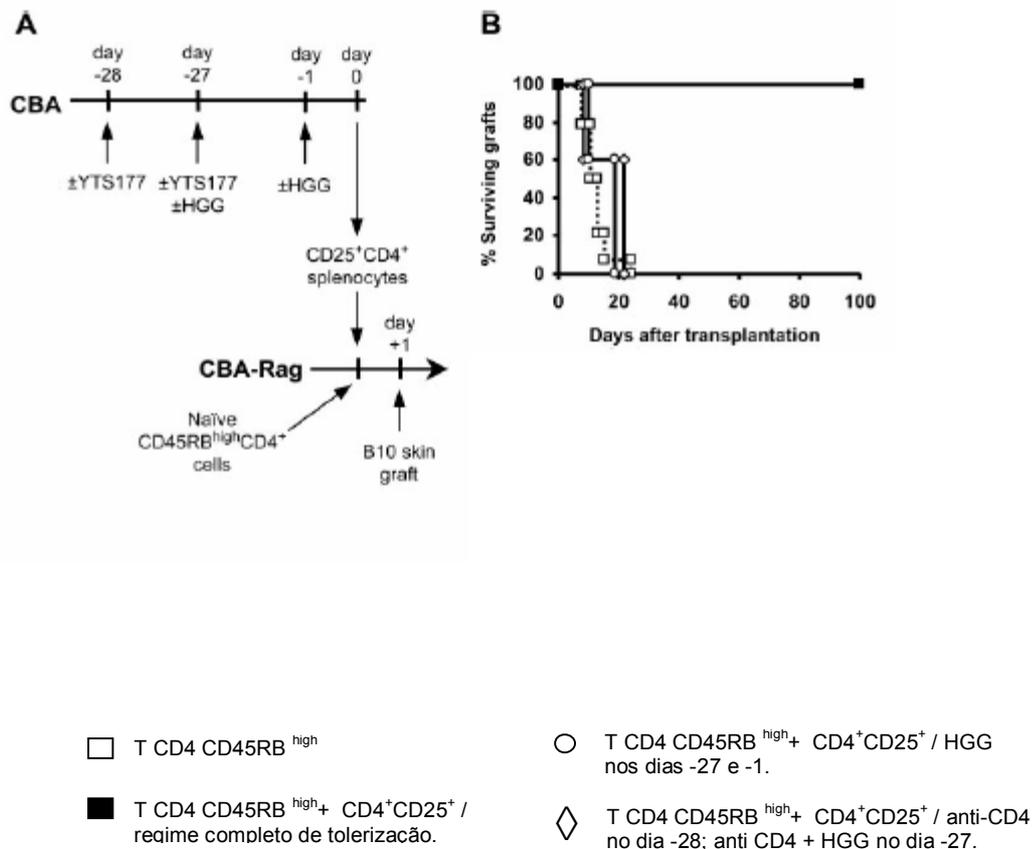


Figura 5. Uma vez estimuladas por seu antígeno específico, as células T regulatórias podem inibir respostas não relacionadas. (A) Protocolo. Camundongos CBA receberam o seguinte regime de tolerização: no dia -28 anticorpos anti-CD4 (YTS177); no dia -27 os mesmos anticorpos na presença do antígeno HGG; no dia -1 os animais foram reestimulados com o antígeno HGG. No dia zero, células CD4⁺CD25⁺ foram purificadas a partir dos esplenócitos e infundidas em camundongos CBA imunodeficientes (Rag^{-/-}), na presença de linfócitos TCD4⁺CD45RB^{high}. No dia +1 os camundongos receptores receberam um transplante de pele alogeneico de camundongos da linhagem B10. (B) Gráfico de sobrevivência dos enxertos de pele. Os grupos experimentais estão descritos na figura. Percebe-se que o transplante de pele de B10 foi aceito apesar das células Treg terem sido “primadas” por outro antígeno. Nota-se que o reestímulo no dia -1 é fundamental para que ocorra esta aceitação. (Adaptado de Karim, Feng e cols., 2005).

A supressão exercida por células Treg mostrou-se dependente de contato celular, já que era abolida quando as células regulatórias e respondedoras eram separadas por uma membrana semipermeável (Takahashi, Kuniyasu e cols., 1998; Thornton & Shevach, 1998). As moléculas de superfície CTLA-4 e GITR parecem ter importante papel na atividade

supressora dependente de contato, entretanto os mecanismos pelos quais elas atuam, se são diretamente na APC, na célula respondedora ou em ambas, ainda não estão claramente elucidados (Shevach, 2002). Gondek, Lu e cols., 2005, sugeriram, em seus estudos, que parte do efeito supressor exercido pelas Treg pode ser mediado por uma citotoxicidade perforina-independente, granzina B dependente, induzindo a morte dos linfócitos respondedores (Gondek, Lu e cols., 2005). Recentemente, Pandiyan, Zheng e colaboradores mostraram que o efeito sobre os linfócitos se dá por consumo de IL-2 pelas Treg, o que levaria a privação destas citocinas às células efetoras e conseqüente apoptose (Pandiyan, Zheng e cols., 2007). Há, ainda, evidências de que a célula Treg possa silenciar a célula apresentadora e, desta forma, todo e qualquer linfócito T que reconheça antígeno nesta mesma APC será inativado (DiPaolo, Brinster e cols., 2007).

É importante mencionar neste momento, que as Treg expressam alguns membros da família dos receptores tipo toll (TLR, *toll-like receptors*), incluindo TLR-4, TLR-5, TLR-7 e TLR-8 (Caramalho, Lopes Carvalho e cols., 2003). Os receptores tipo toll reconhecem padrões moleculares relacionados a patógenos. Sua função é fundamental para a detecção de “perigo” pela resposta inata (Janeway & Medzhitov, 2002; Matzinger, 1994). Caramalho, Lopes-Carvalho e cols., 2003, descreveram que as células T regulatórias podem ser diretamente ativadas por lipopolissacarídeos (LPS) através do TLR-4, induzindo proliferação, aumento na sobrevivência e melhora da função supressora (Caramalho, Lopes-Carvalho e cols., 2003). Entretanto, na mesma época, Pasare & Medzhitov, 2003, demonstraram que a estimulação de células dendríticas por receptores tipo toll promove a produção da citocina IL-6

por estas células inibindo a supressão exercida pelas Treg (Pasare & Medzhitov, 2003). Unindo estas informações, aparentemente contraditórias, pode-se sugerir que durante uma resposta a patógenos, as células dendríticas bloqueiam a ação das Treg, para que a resposta imunológica efetora ocorra com eficiência, porém ao final deste processo, as células regulatórias, previamente ativadas pelos seus TLR, exercem sua supressão, impedindo uma resposta exacerbada. Vale ressaltar que as células regulatórias exigem concentrações mais elevadas de LPS para serem ativadas do que as células B e células da resposta inata (Caramalho, Lopes-Carvalho e cols., 2003), o que faz todo sentido, se pensarmos que a ativação destas células deve ser dificultada inicialmente para que aconteça a resposta efetora. Quando os níveis de LPS estão bastante elevados no local afetado, as Treg são ativadas para inibir uma resposta imune inadequada.

Ao contrário dos dados obtidos *in vitro*, uma série de experimentos reporta a participação das citocinas IL-10 e TGF- β nos modelos de supressão *in vivo* (Shevach, 2002; Kretschmer, Apostolou e cols., 2005). Ainda, o comportamento dessas células *in vitro* e *in vivo* parece ser distinto. Nos testes *in vitro*, as Treg, normalmente, mostram-se anérgicas, sem capacidade proliferativa frente ao estímulo via TCR, ao passo que *in vivo* estas células proliferam, se acumulando nos linfonodos drenantes ao estímulo recebido. Uma vez ativadas pelo seu ligante agonista, as células T regulatórias são capazes de suprimir efetivamente uma resposta imune policlonal (Fisson, Darrasse-Jeze e cols., 2003; Klein Khazaie e cols., 2003; Kretschmer, Apostolou e cols., 2005). Em modelos utilizando camundongos linfopênicos, as Treg também se mostraram capazes de proliferar intensamente, provavelmente

em resposta a auto-antígenos, o que vai de encontro ao fato de essas células possuírem naturalmente um TCR auto-reativo (Jordan, Boesteanu e cols., 2001; Fisson, Darrasse-Jeze e cols., 2003; Hsieh, Liang e cols., 2004).

Tendo por base todos os estudos anteriormnete relatados, percebe-se que, apesar de existirem ainda muitas questões a serem esclarecidas, as células T possuem um papel ativo, muito importante, na manutenção da tolerância imunológica periférica.

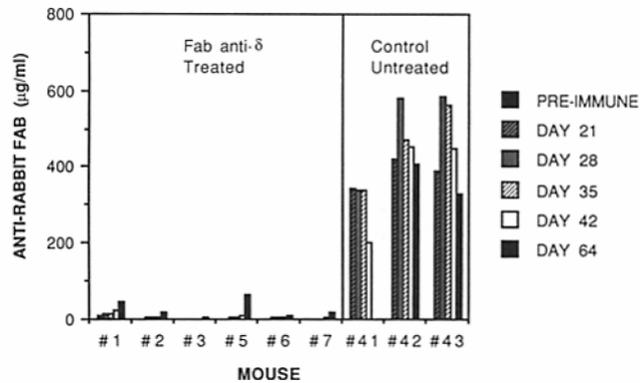
1.2 Linfócitos B como indutores de tolerância imunológica

A importância da função apresentadora de antígeno das células B tem sido bastante investigada ultimamente. Como apresentadoras, podem ativar ou tolerizar linfócitos T, participando da geração e regulação da resposta imunológica. Estas células circulam pelo sangue e pela linfa, mas residem nos órgãos linfóides secundários, onde encontram com o antígeno ao qual respondem — internalizando-o via o seu receptor (BCR), processando-o e apresentando-o de maneira bastante eficiente — e com os clones de linfócitos T específicos para estes mesmos antígenos. Alguns obstáculos, como a baixa frequência destes linfócitos B carregando um receptor particular e a ausência de atividade co-estimulatória destas células, quando virgens (antes de sua ativação), impedem que a ativação da resposta imunológica induzida pelas células B ocorra de modo tão simples como parece, ao contrário, estes linfócitos tornam-se importantes agentes indutores de tolerância das células T (Pinto, 2005).

Nas últimas décadas, muitos grupos têm se empenhado no estudo da tolerância mediada pelos linfócitos B. Em 1984, Ryan, Gress e colaboradores sugerem em seus estudos a existência de uma subpopulação celular, diferente das células acessórias, presente no baço, capaz de induzir o fenômeno de tolerância específica. Em seus experimentos, transferiram para hospedeiros alogeneicos, por via endovenosa, esplenócitos depletados de células acessórias por colunas de Sephadex G-10. A coluna Sephadex G-10 retira os macrófagos da suspensão celular. Após quatro dias, os linfócitos desses animais foram purificados a partir do sangue periférico e reestimulados *in vitro* em uma reação mista leucocitária (MLR, *mix leucocyte reaction*). Os linfócitos T foram incapazes de proliferar frente ao re-estímulo (Ryan, Gress e cols., 1984). Nesse artigo não houve um detalhamento de quais células estariam envolvidas neste processo. Posteriormente, surgiram dois trabalhos demonstrando que os linfócitos B virgens eram capazes de induzir tolerância periférica a antígenos relativamente “simples” (antígenos pouco complexos que estimulam uma pequena variedade de clones de linfócitos T). Eynon & Parker, 1992, reportaram que os linfócitos B virgens eram capazes de induzir tolerância periférica a proteínas solúveis capazes de se ligar especificamente nas células B em camundongos. Essas proteínas eram apresentadas por elas, entretanto sem ativá-las (figura 6A). De forma detalhada, camundongos receberam, via endovenosa, um ultracentrifugado de fragmentos de imunoglobulina de coelho, anticamundongo, que se ligavam especificamente aos linfócitos B, como mencionado anteriormente. Após o reestímulo *in vivo* com o ultracentrifugado na presença de alumínio, verificou-se uma profunda tolerância, analisada pela produção de anticorpos contra esta proteína. Este fenômeno mostrou-se

específico, uma vez que os animais respondiam perfeitamente ao antígeno controle (imunoglobulina de galinha), e dependente de células B específicas, já que utilizando fragmentos incapazes de se ligar nestas células (imunoglobulina antiazofenil arsenato) a resposta imune também foi evidenciada (Eynon & Parker, 1992). Na mesma época, de uma forma muito elegante, Fuchs & Matzinger, mostraram que a transferência endovenosa de células B virgens de animais machos para receptores fêmeas induz tolerância ao antígeno específico de macho – H-Y (Figura 6B). Em seus ensaios, utilizaram camundongos B10 capazes de apresentar este antígeno restrito pela molécula de MHC H-2D^b. Fêmeas B10 infundidas, por via endovenosa, com linfócitos B virgens de animais machos da mesma linhagem e transplantadas com peles destes mesmos camundongos, aceitaram o enxerto. Por outro lado, a rejeição do transplante foi observada na ausência da infusão, ou com injeção de células dendríticas (Fuchs & Matzinger, 1992). Posteriormente, outros estudos foram publicados, evidenciando a importância da tolerância mediada por célula B em diferentes modelos conhecidos. Como exemplos pode-se mencionar o modelo animal de tolerância à Esclerose Múltipla (Seamons, Perchellet e cols., 2006), a tolerância imunológica observada frente à introdução de antígenos na câmara anterior do olho (D'orazio & Niederkorn, 1998; Ashour & Nierderkorn, 2006), a tolerância nasal em modelo animal de Lupus (Wu, Monson e cols., 2006), e a tolerância a aeroalérgenos (Tsitoura, Yeung e cols., 2002).

A-



B-

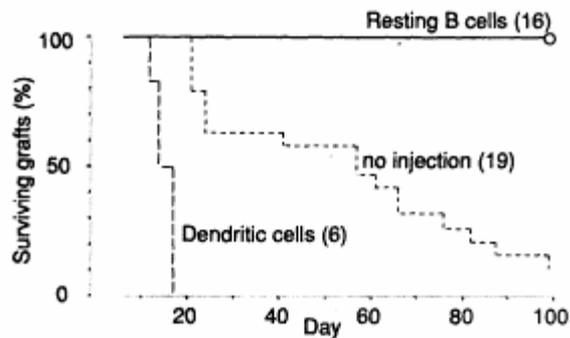


Figura 6. Os linfócitos B virgens induzem tolerância em diferentes modelos estudados *in vivo*. (A) Camundongos receberam, via endovenosa, um ultracentrifugado de fragmentos de imunoglobulina de coelho, anticamundongo (anti-*rabbit* Fab), capaz de se ligar especificamente aos linfócitos B, sem ativá-los. Após o reestímulo, verificou-se o nível de anticorpos anti-*rabbit* Fab presentes no soro desses animais nos diferentes dias após o desafio, como demonstrado na figura. Observou-se uma profunda tolerância nos animais que receberam o tratamento mencionado (Adaptado de Eynon & Parker, 1992). (B) Camundongos B10 fêmeas receberam uma injeção, endovenosa, de 10^7 células B virgens de camundongos machos da mesma linhagem, ou 3×10^5 células dendríticas purificadas também desses camundongos machos. Após uma semana, todos os animais foram enxertados com um pedaço de pele da cauda de B10 macho no dorso. Os animais tratados previamente com linfócitos B virgens aceitaram o transplante. (Adaptado de Fuchs & Matzinger, 1992).

Detalhando o comportamento das células T frente à apresentação de antígenos realizada pelos linfócitos B virgens, alguns desses trabalhos demonstraram redução de produção de citocinas e hiporresponsividade na resposta secundária (Seamons, Perchellet e cols., 2006; Raimondi, Zamoni e cols., 2006). O primeiro mecanismo proposto para explicar esta indução de tolerância mediada por células B foi anergia. Esta hipótese era reforçada pela co-estimulação deficiente desses linfócitos (Liu & Janeway., 1991).

Entretanto, mais recentemente, algumas evidências sugeriram que a tolerância induzida por linfócitos B pode estar relacionada a mecanismos de supressão, envolvendo as células T regulatórias (Treg). Células B transgênicas, ativadas com LPS, mostraram função tolerogênica mediada por células regulatórias em modelo experimental de terapia gênica para deficiência de fator VIII (Lei, Su e cols., 2005). Dentre os pacientes com hemofilia A, 30% produzem anticorpos contra o fator VIII, um importante componente da cascata de coagulação. Baseados nessas informações, Lei, Su e cols., 2005, utilizaram a ferramenta experimental, descrita anteriormente pelo mesmo grupo, como modelo de indução de tolerância em camundongos hemofílicos. Neste modelo, linfócitos B ativados com LPS, e transduzidos com um vetor retroviral carreando genes de imunoglobulinas fusionadas a antígenos relacionados com o fator VIII, induzem tolerância a estes antígenos desejados (Lei, Su e cols., 2005). Os autores sugeriram que a tolerância observada nesta situação era dependente de células T regulatórias, uma vez que o tratamento com anticorpo anti-CD25 abolia a resposta protetora ao fator VIII. Estas células tolerogênicas foram também utilizadas em modelo experimental de diabetes auto-imune. Nesta situação, o papel das Treg foi novamente evidenciado (Soukhareva,

Jiang e cols., 2006). Em outro estudo desenhado para demonstrar a geração de células T regulatórias extratimicamente, camundongos transgênicos para hemaglutinina A sob o promotor de imunoglobulina foram capazes de gerar células Treg (Apostolou, Sarukhan e cols., 2002). Suto., Nakajima, e cols., 2002, relatam a importância dos linfócitos B na manutenção das células T regulatórias na periferia, apesar de não interferirem no seu desenvolvimento intratímico. Em seus experimentos, utilizaram camundongos deficientes para células B ($\mu^{-/-}$) e observam que os timócitos $CD4^+CD25^+$ permanecem inalterados, ao passo que as células T $CD4^+CD25^+$ no baço estão reduzidas em relação ao controle (Suto., Nakajima, e cols., 2002). Vale ainda destacar ensaios realizados *in vitro*, nos quais a co-cultura de Linfócitos B virgens com células T virgens resultam na indução de Treg com fenótipo supressor *in vitro* e *in vivo*. Esse artigo mostrou que os linfócitos B virgens, utilizados na cultura como estimuladores, realizam uma sinapse madura com as células T virgens, o que promove a geração de células T regulatórias. Já no controle, que utiliza células dendríticas como estimuladoras observa-se a geração de células T efetoras (Reichardt, Dornbach e cols., 2007). Por último, os linfócitos B mostraram-se mais eficientes que as células dendríticas na indução do fator de transcrição Foxp3 em linfócitos T periféricos Foxp3⁻ purificados e estimulados *in vitro* na presença de anti-CD3, anti-CD28 e TGF- β (Kim & Rudensky, 2006).

Baseando-se nas informações descritas anteriormente, percebe-se que os linfócitos B podem agir como importante ferramenta tolerogênica. No entanto, os mecanismos pelos quais estas células realizam esta função não estão estabelecidos.

1.3 Alorreconhecimento pelos linfócitos T

Para um organismo unicelular a distinção entre próprio e não-próprio torna-se importante para a proteção da integridade *self*. Nos organismos multicelulares, a definição de próprio é um pouco mais complexa. Este conceito fica ainda mais complicado, com o desenvolvimento de tecidos e órgãos especializados, onde cada subpopulação celular expressa genes e fenótipos particulares. As moléculas de histocompatibilidade e um sistema combinado de reconhecimento para essas moléculas permitem a distinção do que é próprio e não-próprio nestes organismos. Este complexo MHC, além de ser característico de cada indivíduo, é capaz de apresentar antígenos próprios, ou não, às células do sistema imunológico, mais precisamente aos linfócitos T (Aluvihare & Betz, 2006).

Como mencionado anteriormente (item 1.1), durante sua maturação no timo, os linfócitos T que reconhecem as moléculas MHC associadas aos peptídeos próprios com baixa avidéz/afinidade sobrevivem e vão para a periferia (seleção positiva) (Hogquist, Jameson e cols. 1994). Entretanto, se estas células reconhecem com alta avidéz/afinidade as moléculas MHC+pep próprias, serão eliminadas na seleção negativa tímica (Kappler, Roehm, e cols. 1987), ou tolerizadas pelos demais sistemas de tolerância periférica. Sendo assim, os linfócitos T maduros, atuantes na periferia, reconhecem o que é próprio pois foram selecionados desta forma na seleção positiva, entretanto não reagem com estas moléculas de uma forma nociva. No caso do MHC ser alogeneico, ou estar associado a um peptídeo exógeno, alogeneico, ou de patógenos, a resposta imune mediada por estas células é ativada.

Os estudos relacionados com reconhecimento próprio e não próprio sempre receberam destaque devido ao seu papel fundamental na rejeição de transplantes alogeneicos.

No caso do reconhecimento a MHC alogeneicos (pertencentes a outro organismo), os linfócitos T podem reconhecer **diretamente** o complexo MHC-peptídeo expresso nas células dos aloenxertos. Isso ocorre de uma maneira análoga ao reconhecimento feito a antígenos ambientais (Watschinger, Gallon e cols., 1994; Reiser, Darnault e cols., 2000). O alorreconhecimento direto é um evento de alta frequência, cerca de 1% a 10% dos linfócitos T de um indivíduo são capazes de reconhecer diretamente um determinado alo-complexo (Lindahl & Wilson, 1977). A explicação para a alta frequência de clones respondedores tem sido a reatividade cruzada entre MHC diversos e peptídeos específicos, além da alta variabilidade de complexos MHC+pep apresentados numa alorresposta (Matzinger & Bevan, 1977; Ashwell, Chen e cols., 1986). As células T alorreativas podem também reconhecer e responder aos peptídeos alogeneicos processados pelas APC próprias do indivíduo, em um processo de alorreatividade **indireto** (Watschinger, Gallon e cols., 1994; Benichou, Valujskikh e cols., 1999). Este processo, assim como o anterior (direto), pode ocorrer com células T em repouso, e representa uma porção menor do repertório T alo-imune (Benichou, Valujskikh e cols., 1999). Existe uma população celular do repertório aloimune derivada da expansão clonal de células T de memória, primadas pelo ambiente, capazes de responder a aloantígenos através de reações cruzadas com antígenos ambientais. Isto é sugerido em estudos realizados *in vitro*, onde, clones de células T específicos para citocromo C de pombo, insulina de carneiro e GAT (polímero composto

pelos aminoácidos glutamina, alanina e treonina) respondem a aloantígenos diversos (Ashwell, Chen e cols., 1986).

Algumas tentativas foram feitas para induzir tolerância a aloantígenos, em ensaios clínicos. Em transplante de medula óssea, o tratamento do enxerto com CTLA-4-Ig na presença de células do receptor, gerou anergia nos linfócitos T do enxerto. Clinicamente, não se observou desenvolvimento de doença-enxerto-contrá-hospedeiro, apesar de 60% dos pacientes irem a óbito, devido a infecções ou recidiva da doença primária (Guinan, Boussiotis e cols., 1999). A indução de tolerância a aloantígenos também foi possível em estudos realizados por Blazar, Taylor e cols., 1998, bloqueando a via CD40-CD40L (Blazar, Taylor e cols., 1998). Neste caso ainda não há explicação para o fenômeno, mas com certeza não ocorre, neste sistema, a interação entre células T ativadas e células apresentadoras de antígenos. A ligação de CD40 em células apresentadoras é conhecida como um mecanismo para dar competência a estas células no que tange a ativação dos linfócitos T, especialmente os T CD8⁺ ou citotóxicos (Ridge, Di Rosa e cols., 1998). O bloqueio de CD40 pode impedir a aquisição desta competência (Bourgeois, Rocha e cols., 2002). A tolerância oral também poderia ser uma possível ferramenta para tornar o sistema imune tolerante a alo-antígenos, entretanto esta não acontece quando o indivíduo já foi primado para esses antígenos. (Vaz, Faria e cols., 1997). Como a resposta alogeneica apresenta reações cruzadas com agentes ambientais, normalmente já existe a presença de células de memória que reagem a esses antígenos dificultando o acontecimento do fenômeno.

A utilização de linfócitos B virgens para induzir tolerância a aloantígenos seria uma metodologia promissora de simples utilização e ainda com boas perspectivas de atuar especificamente. Sabe-se que as células B virgens são células apresentadoras de antígenos carentes de co-estímulos. Estes linfócitos B poderiam estar induzindo anergia nas células T capazes de se ligar a seus complexos MHC+pep. Nesse caso ficaria a dúvida se a resposta alogeneica poderia ser inibida se houvessem clones de memória participando da alorreatividade. Por outro lado, no caso de um processo ativo de regulação, mediado por células regulatórias, esta possibilidade deve ser avaliada com bastante cautela, uma vez que a supressão pode ocorrer de maneira inespecífica e ainda, devido à alta frequência dos linfócitos T alorreativos, a relação entre respondedora/supressora pode estar inadequada, resultando em resposta em vez de tolerância imunológica.

2. OBJETIVOS

1 Avaliar o potencial dos linfócitos B virgens na indução de tolerância a antígenos alogênicos em relação a seus receptores.

2 Investigar os mecanismos utilizados pelos linfócitos B virgens na indução de tolerância.

3 Estudar o potencial dos linfócitos B ativados com LPS na indução de tolerância no modelo de transplante de pele.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram utilizados camundongos isogênicos das linhagens C57BL/6 (H-2^b) (B6), F1 (C57BL/6 - H-2^b x BALB/c - H-2^d), chamados a partir de aqui F1(bxd), BALB/c (H-2^d), F1 (C3H/He - H-2^k x C57BL/6 - H-2^b) chamados a partir daqui F1(bxk) machos e fêmeas, com idades entre 6 e 8 semanas de vida. Foram ainda utilizados camundongos fêmeas, Marilyn RAG^{-/-} (H-2^b) — animais com TCR transgênico para o antígeno H-Y e com a enzima ativadora da recombinação gênica (RAG) ausente —, com idade semelhante aos demais mencionados acima, gentilmente doados por Polly Matzinger, LCMI, NIAID, NIH. Os animais foram mantidos e fornecidos pelo biotério da Coordenação de Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer, Rio de Janeiro, Brasil. Todos os animais utilizados neste trabalho foram mantidos sob as mesmas condições e manipulados segundo as normas de boas práticas para manipulação de animais de experimentação.

3.2 Meios de Cultura

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

3.3 Obtenção de células

3.3.1 Células de baço: Após eutanásia, baços foram retirados e colocados em placas de petri contendo meio DMEM. Nessas placas, este órgão foi macerado entre dois fragmentos de tecido de algodão – escaline – de textura 44, com auxílio de duas pinças curvas. As células dissociadas foram colocadas em tubos de 15 ml e centrifugadas a 450 g por 5 minutos. O precipitado celular do baço foi ressuspensão em solução de ACK¹ (10^8 células/ml) por dois minutos, para a lise das hemácias. Posteriormente, a suspensão foi lavada (centrifugação a 450 g por 5 minutos em meio DMEM) duas vezes e ressuspensa em meio DMEM com 10% de SFB.

3.3.2 Células de Linfonodos Poplíteos e Mesentéricos: Os linfonodos foram retirados e processados como descrito acima (item 3.3.1), em seguida o precipitado celular foi ressuspensão em meio DMEM com 10% de SFB. Vale ressaltar que nesse caso, por não haver hemácias na suspensão celular, a lise com ACK não foi necessária.

3.3.3 Células T purificadas de linfonodos mesentéricos: Células de linfonodos mesentéricos foram obtidas após maceração e lavagem como descrito anteriormente (item 3.3.1). As células T presentes nestes linfonodos, foram purificadas utilizando-se coluna de purificação de lã de nylon² (Fenwall Laboratories, IL EUA).

3.3.4 Células B virgens (figura 7) Células de baço de camundongos B6 ou F1(bxd) foram obtidas como descrito em 3.3.1. As células B virgens são células pequenas, de alta densidade, portanto foram obtidas através de

separação em gradiente de Percoll (Amersham-Pharmacia EUA). O gradiente de Percoll foi realizado da seguinte forma:

1. Preparo do Percoll isotônico (Percoll 100%) – Percoll estoque diluído 1:10 em PBS 10 vezes concentrado.
2. Preparo da subcamada 60% – diluiu-se o Percoll 100%, descrito acima, em meio DMEM, sem soro.
3. Preparo do gradiente – adicionou-se 2 ml de Percoll 100%, sobre este, com uma micropipeta, adicionou-se o Percoll 60% e o material celular. Foram colocados no máximo 5×10^8 células por gradiente (o Percoll 60% e a fração celular foram adicionados em frações de 200 μ l).
4. As células foram centrifugadas a 800 g durante 30 minutos a 15°C sem freio. Posteriormente coletadas na interface 100/60%, com pipeta pasteur de plástico, e lavadas duas vezes (centrifugação a 450 g por 5 minutos em meio DMEM).

Passada esta primeira etapa da purificação (gradiente de Percoll), a suspensão celular foi submetida a uma aderência de duas horas a 37°C com 5% de CO₂. Esta aderência permite a remoção das células aderentes (macrófagos e células dendríticas) presentes na suspensão. Esta incubação foi realizada em placa de petri de 6,0 cm de diâmetro (Corning, NY, EUA) numa concentração de 5×10^6 /ml, na presença de DMEM. Após a adesão as células foram cuidadosamente retiradas da placa de petri, lavadas e tratadas com sobrenadante obtido da linhagem celular GK1.5, o qual contém anticorpos anti-CD4 e da linhagem celular 53.6-72, que contém anticorpos anti-CD8. A esta solução foi adicionado soro de coelho como fonte de complemento³.

A pureza da população de células B foi constatada por citometria de fluxo (FACSCalibur®, Becton Dickinson, CA EUA). As células B foram marcadas com anticorpos monoclonais anticamundongo CD45R/B220 (RA3-6B2) PE (Pharmigen CA, EUA) e as células T com anticamundongo CD3 (2C11) FITC (Pharmigen CA, EUA). A aquisição e a análise foram realizadas no software CellQuest® Becton Dickinson, NY EUA.

Purificação dos linfócitos B (virgens)

Protocolo:

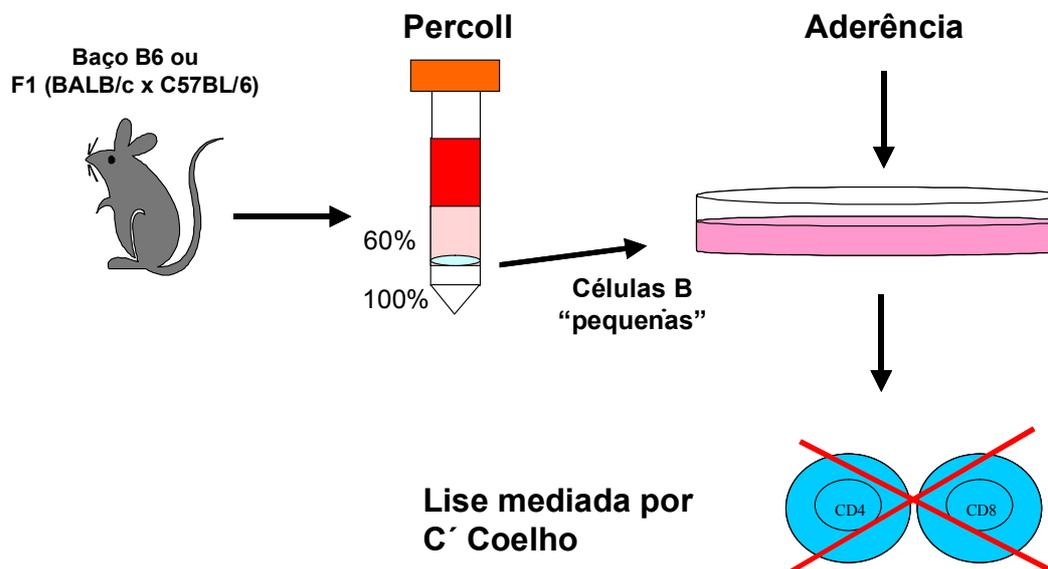


Figura 7. Esquema ilustrativo do protocolo de purificação dos linfócitos B virgens. Células de baço de camundongos B6 ou F1 (bx) foram obtidas como descrito em 3.1. Estas células passaram por um gradiente de Percoll para separação das células com diferentes densidades. Posteriormente as células aderentes foram removidas da suspensão através de uma aderência de duas horas a 37°C com 5% de CO₂. Por último ocorre a lise dos linfócitos T CD4 e CD8 utilizando-se sobrenadantes obtidos de culturas das linhagens GK1.5 (produzem anticorpos anti-CD4) e 53.6-72 (produzem anticorpos anti-CD8) seguido de soro de coelho como fonte de complemento.

3.3.5 Células B: Células de baço de camundongos F1(bxd) foram obtidas como descrito em 3.1. Esta suspensão celular foi submetida ao tratamento com sobrenadante obtido da linhagem celular GK1.5, e da linhagem celular 53.6-72. A esta solução foi adicionado soro de coelho como fonte de complemento³.

3.4 Análise fenotípica das células T por citometria de fluxo

3.4.1 Marcação de moléculas de superfície: Células foram retiradas de baço ou linfonodos das diferentes linhagens de camundongo citadas anteriormente. Estas suspensões celulares foram inicialmente lavadas e incubadas (10^6 /poço) em placas de 96 poços, fundo U (TPP, Suíça), a 4°C, com 100 µl de PBS + 2% de soro normal de camundongo (para o bloqueio de receptores FcγRI/RIII). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas (5 minutos a 450 g) e os precipitados ressuspensos na presença dos anticorpos desejados, diluídos em 10 µl na solução de bloqueio (PBS + 2% de soro normal de camundongo) por 10 minutos. Lavou-se novamente com a solução de bloqueio (5 minutos a 450 g), ressuspendeu-se em PBS e procedeu-se a leitura e análises no citômetro de fluxo (FACSCalibur® e análises, no Software CellQuestl®).

3.4.2 Marcações intracitoplasmáticas: Após a marcação de superfície com os anticorpos apropriados, foi feita a marcação intracitoplasmática para Foxp3, seguindo o protocolo descrito no *kit* para Foxp3 da eBioscience. As células previamente coradas na superfície, conforme descrito em 4.1, foram lavadas, fixadas com tampão Fix/perm (eBioscience, CA, EUA) e incubadas a 4°C por 2-18 horas. A seguir, as células foram lavadas e ressuspensas em tampão de permeabilização (eBioscience, CA, EUA), sendo novamente lavadas e, então adicionou-se a este precipitado celular 5 µl de rato anticamundongo Foxp3 APC (eBioscience, CA, EUA) diluído em tampão de permeabilização. As células foram incubadas por 30 minutos a 4°C e posteriormente ressuspensas em PBS para prosseguir o processo de aquisição e análise no citômetro de fluxo.

3.4.3 Anticorpos utilizados em citometria de fluxo: Os seguintes anticorpos foram utilizados: anticamundongo CD45R/B220(RA3-6B2) PE (Pharmigen San Diego), anticamundongo CD3 (2C11) FITC (Pharmigen, CA EUA), anticamundongo CD4 (RM4.5) FITC (eBioscience, CA, EUA), anticamundongo CD25 (PC61) PE (eBioscience, CA, EUA), Foxp3 APC (Kit eBioscience, CA, EUA), anticamundongo CD80 (16-10A1) PE (Pharmigen , CA, EUA), anticamundongo CD86 (GL1) PE (Pharmigen , CA, EUA), anticamundongo IA/IE (2G9) PE (Pharmigen , CA, EUA).

3.5 Culturas de células

3.5.1 Estimulação dos Linfócitos B virgens com LPS: Células B virgens foram purificadas como descrito em 3.3.4 e cultivadas numa concentração de 2×10^6 /ml, durante 32 horas, em placa fundo chato, 96 poços (TPP, Suíça), na presença de 15 μ g/ml de LPS. Parte destas células foram cultivadas em placas de 96 poços e pulsadas com 1 μ Ci de timidina (3 H – TdR) nas últimas 18 horas, sendo a leitura do resultado realizada por cintilação líquida de irradiação em contador β . As demais células foram cultivadas em placas de 24 poços, fundo chato (TPP, Suíça) e utilizadas para infusão endovenosa em camundongos (descrito em 3.6.3). A verificação da ativação mediada pelo LPS foi feita por citometria de fluxo, pela visualização de marcadores para classe II (anticamundongo IA/IE - Becton & Dickimson, CA, Estados Unidos) e para as moléculas B7.1 (anticamundongo-CD80, Pharmigen, CA, EUA) e B7.2 (anticamundongo-CD86, Pharmigen , CA, EUA). A aquisição e a análise foram realizadas no software CellQuest. Além disso, ensaios funcionais foram feitos,

observando-se a capacidade co-estimulatória destes linfócitos como estimuladores em uma MLR, como descrito em 3.5.2.

3.5.2 Avaliação da capacidade coestimulatória dos linfócitos B virgens:

Linfócitos T (4×10^6 /ml), purificados como descrito em 3.3.3, na presença ou não de linfócitos B virgens (4×10^6 /ml) (purificados como descrito em 3.3.4) ou células de baço total (4×10^6 /ml) (obtidas como descrito em 3.3.1), irradiados a 2.500 rad, foram incubados em placas de microtitulação de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça) em DMEM com 10% de soro fetal bovino. A estas culturas foram adicionados o mitógeno Concanvalina A (Sigma, MO EUA) a 2,5 μ g/ml. A cultura foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ durante 3 dias. Nas últimas 18 horas foi adicionado 1 μ Ci de timidina (³H – TdR) (Amershan-Pharmacia, EUA) por poço da cultura. Para a leitura do resultado as células foram recolhidas e a leitura foi feita por cintilação líquida em contador β .

Outra maneira utilizada para testar a capacidade co-estimulatória das células B virgens foi através de reações mistas leucocitárias. Células T de camundongos C57BL/6 ou BALB/c, purificadas como descrito em 3.3.3, foram utilizadas como respondedoras nas culturas mistas plaqueadas a 4×10^6 /ml em placas de 96 poços de fundo chato (TPP, Suíça). Como estimuladores foram usados linfócitos B virgens (4×10^6 /ml) (purificados como descrito em 3.3.4) células de baço total (4×10^6 /ml) (obtidas como descrito em 3.3.1), ou linfócitos B ativados com LPS (obtidos como descrito em 3.5.1) de camundongos F1 (bx_d), ou B6, respectivamente (irradiados a 2.500 rad). A cultura foi mantida a 37°C com 5% de CO₂ durante 5 dias. Nas últimas 18 horas, foi adicionado 1 μ Ci de timidina (³H – TdR) (Amershan-pharmacia EUA) por poço da cultura em

placas de 96 poços. Para a leitura do resultado as células foram recolhidas e a leitura foi feita por cintilação líquida de irradiação em contador β .

3.5.3 Ensaio de supressão

3.5.3.1 Células respondedoras: Foi utilizada uma suspensão celular composta de células totais de linfonodos mesentéricos de camundongos Marylin RAG^{-/-}.

3.5.3.2 Células estimuladoras: Esplenócitos de camundongos C57BL/6 machos, irradiados a 2.500 rad.

3.5.3.3 Células supressoras: As células supressoras utilizadas neste teste foram provenientes de: **1.** suspensão celular composta de células totais de linfonodos poplíteos de camundongos Marylin RAG^{-/-}, tratados previamente com células B virgens de F1(bxd) machos e imunizados no coxim plantar com esplenócitos de B6 também de animais machos. **2.** suspensão celular composta de células totais de linfonodos poplíteos de camundongos Marylin RAG^{-/-}, somente, imunizados no coxim plantar com esplenócitos de B6 de animais machos.

3.5.3.4 Teste da supressão: 2×10^5 células respondedoras foram co-cultivadas em placa de microtitulação, 96 poços (TPP, Suíça), com 4×10^5 células estimuladoras, na presença ou não de 2×10^5 células supressoras 1 ou 2 (descritas em 3.5.3.3). A cultura foi mantida durante 3 dias. Nas últimas 18 horas, foi adicionado $1 \mu\text{Ci}$ de timidina (^3H — TdR) em cada poço da cultura. Para a leitura do resultado as células foram recolhidas e a leitura feita por cintilação líquida de irradiação em contador β .

3.6. Transferências de células

3.6.1 Intraperitoneal: Células de baço de camundongos B6 machos, linfócitos B de B6 e F1 (bx) fêmeas foram obtidas como descrito em 3.3.1 e 3.3.5. Estas células ($10^7/200\mu\text{l}$ de PBS), foram infundidas intraperitonealmente em camundongos fêmeas B6. O tempo de imunização no caso do baço foi de quinze dias. Já no caso dos linfócitos B a análise foi feita após quatro dias.

3.6.2 No Coxim Plantar: Camundongos receberam, no coxim plantar, 10^7 células de baço, irradiadas ou não, com 2.500 rad, (em $60\mu\text{l}$ de PBS). Testes realizados *in vitro* demonstraram que após a irradiação os esplenócitos se mantiveram viáveis, entretanto não foram capazes de proliferar.

3.6.3 Endovenosa: Camundongos B6 fêmeas receberam endovenosamente 10^7 células B virgens (purificadas como descrito em 3.3.4) ou ativadas com LPS (como descrito em 3.5.1) de camundongos B6 ou F1 (bx) macho ou fêmea (em $100\mu\text{l}$ de PBS).

3.7. Marcação de células utilizando CFSE

Linfócitos B obtidos como descrito em 3.3.5, foram incubados com $1\mu\text{M}$ de CFSE (*carboxyfluoresceine-diacetate-succinimidylester*) por 8 minutos em temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram lavadas 3 vezes (centrifugação a 450 g por 10 minutos) diluídas em tampão PBS. Após as lavagens, as células foram ressuspensas novamente em PBS na concentração desejada.

3.8. Enriquecimento de anticorpos anti-CD25

3.8.1 Cultura de células em *Spinner*: Células da linhagem 7D-4 (produtoras do anticorpo anti-CD25 – 7D-4) foram cultivadas numa concentração de 2×10^5 /ml em um Spinner na presença de DMEM, a 37°C com 5% de CO₂. Inicialmente, utilizou-se 10% de SFB como complemento do meio mencionado acima. Ao longo da cultura, com a maior estabilidade das células (após aproximadamente 1 semana), a concentração do soro fetal bovino foi reduzida para 7,5% e posteriormente (novamente, após 1 semana), 5%, para facilitar a purificação do anticorpo, razão do cultivo dessas células. A cultura foi mantida até o acúmulo de um litro de sobrenadante.

3.8.2 Ultracentrifugação em membrana de AMICON: Inicialmente, os sobrenadantes da cultura foram concentrados através da célula de ultrafiltração AMICON, aplicando-se uma pressão positiva com uma bala de nitrogênio. Através de uma membrana de ultrafiltração AMICON (Millipore, CA, EUA) com poros de tamanho de 300.000 Da, os anticorpos (IgM, com alto peso molecular) foram separados de outras proteínas do SFB com baixo peso molecular, como a albumina. A membrana foi cuidadosamente manipulada com o auxílio de luvas e umedecida com água. Em seguida, foi devidamente acoplada à célula de ultrafiltração, e o sobrenadante foi concentrado passando através dessa membrana, seguido de três lavagens com PBS. A pressão máxima utilizada foi de 10 psi e o procedimento foi realizado no gelo.

3.8.3 Precipitação da proteína de interesse: Após a concentração dos sobrenadantes da cultura, o próximo passo foi a precipitação da proteína de interesse (imunoglobulina IgM) com uma solução saturada (100%) de sulfato de amônio (NH₄)₂SO₄. A proteína albumina que ainda representava o principal

contaminante do concentrado, possui maior solubilidade que a IgM nesta solução, sendo assim, esta se mantém no sobrenadante, enquanto o anticorpo desejado, IgM, fica no precipitado. A precipitação foi feita adicionando-se lentamente, 1 ml da solução mencionada acima para cada 2 ml do concentrado protéico em agitação contínua e no gelo. A solução permaneceu em agitação por duas horas e após este período foi centrifugada por 30 minutos a 1400 g, em temperatura ambiente. Este processo foi realizado três vezes e o material foi então ressuspenso em 1 ml de PBS.

3.8.4 Diálise das proteínas precipitadas: Para a retirada do sal utilizado na precipitação, fez-se a diálise desta solução. A membrana de diálise foi manipulada cuidadosamente para evitar danos e lavada com água destilada corrente. Em seguida, foi fervida por 5 minutos três vezes (o aumento da temperatura — energia cinética — promove a abertura dos poros da membrana). Posteriormente, a membrana foi lavada com água corrente e uma de suas extremidades foi bloqueada. A solução a ser dializada foi, então, adicionada, evitando a formação de bolhas. Fechou-se a outra extremidade da membrana que foi mergulhada em um bequer contendo solução de PBS 1x. Esta incubação foi mantida por 24 horas a 4°C, em constante agitação e troca do tampão PBS.

3.8.5 Centrifugação e pureza da amostra: A concentração da amostra foi verificada em aparelho Espectrofotômetro (Beckman, CA, EUA) selecionando-se o comprimento de onda de 280 nm (comprimento de onda de máxima absorção pelo triptofano). A pureza da solução foi analisada por uma densitometria protéica, realizada pelo laboratório de análises clínicas do

Instituto Nacional de Câncer do Rio de Janeiro. A concentração final do anticorpo foi 100 µg/ml.

3.9. Tratamento com o anticorpo 7D4

Camundongos C57BL/6 fêmeas foram tratados com 100 µg de anticorpo 7D-4 no dia -1 do transplante de pele, no dia +2, +5 e, depois semanalmente até o final do experimento.

3.10. Transplantes

3.10.1 Transplante de baço na cápsula renal: O transplante de baço na cápsula renal foi realizado sob anestesia geral mediada pela administração de 400 µl a 600 µl de uma solução de 12 µg/ml de 2,2,2-trobromoethanol. Os baços foram obtidos através da compressão da cápsula esplênica com auxílio de uma pinça curva. Nesta região, os baços foram cortados para posterior enxerto nos receptores. Nestes receptores foi feita uma intervenção cirúrgica, com um corte na pele próximo ao rim a ser enxertado. Neste órgão foi realizada uma pequena incisão de aproximadamente 5 mm no final da parte caudal, onde se enxertou fragmentos de baço (1-2 mm de diâmetro), originados dos doadores. Um mês depois, os animais sofreram eutanásia, e os órgãos foram analisados macroscopicamente e por histopatologia.

3.10.2 Transplante de pele: Após a anestesia geral mediada pela administração de 400 µL a 600 µL de uma solução de 12 µg/ml de 2,2,2-trobromoethanol, os camundongos receptores receberam uma incisão de aproximadamente 10 mm, removendo um fragmento de pele da cauda. Sobre esta região colocou-se um novo fragmento de pele da cauda de um

camundongo, porém oriunda do doador. A região transplantada foi coberta por 24 horas com um material circular plástico para proteger os enxertos. A sobrevivência dos transplantes foi observada de dois em dois dias, durante um período total de seis a dez semanas.

3.11. Análise histopatológica

Foi retirada a região enxertada dos rins dos camundongos transplantados com baço na cápsula renal (descrito em 3.10.1), assim como a pele enxertada no caso do transplante de pele (descrito em 3.10.2). Posteriormente, os órgãos foram fixados em formalina (PBS 10% formaldeído) por 24 horas e enviados para a preparação dos blocos parafinados, corte e coloração por hematoxilina e eosina. Foram analisados no mínimo 6-8 cortes por bloco. A análise foi feita pela presença ou não de infiltrados celulares e pela integridade do órgão em questão.

3.12. Análise Estatística

Realizada pelo método Longrank.

¹ACK: 2,24 g de cloreto de amônia (NH₄CL); 0,25 g de bicarbonato de potássio (KHCO₃); 9,25mg de EDTA; qsp 250 ml de água destilada, pH de 7,3.

²Purificação utilizando colunas de lã de nylon: aproximadamente 1 g da lã de nylon foi colocada dentro de uma seringa de 10 ml; a lã foi lavada, já na coluna por três vezes com meio DMEM 2% soro fetal bovino. Posteriormente a coluna foi incubada a 37°C por pelo menos 30 minutos. As células foram colocadas na coluna diluídas em meio DMEM 2% soro fetal bovino

também a 37°C. Após uma hora a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂, as colunas foram eluídas lentamente com meio DMEM — 2% SFB - a temperatura ambiente.

³Lise com complemento de coelho: 5x10⁷ células foram ressuspensas em 2 ml contendo 40% dos sobrenadantes das linhagens celulares acima mencionados e 20% de soro de coelho, como fonte de complemento. Esta suspensão foi incubada durante 30 min a 37°C com 5% de CO₂, posteriormente lavada com meio DMEM e novamente incubada por 30 minutos a 37°C com 5% de CO₂, só que agora ressuspensa com 20% do soro de coelho e 80% de DMEM. Após este período as células foram lavadas duas vezes com meio DMEM.

4- RESULTADOS

4.1 Isolamento dos linfócitos B virgens

O primeiro passo foi a padronização da metodologia de purificação dos linfócitos B virgens. O método utilizado foi separação por gradiente de Percoll descontínuo, seguido de aderência e lise das células T. A pureza das células foi analisada por citometria de fluxo. Além disso, ensaios funcionais, *in vitro*, foram realizados para avaliar a viabilidade e capacidade co-estimulatória desses linfócitos purificados. Segue detalhadamente cada etapa deste processo.

4.1.1 Purificação dos linfócitos B

A purificação dos linfócitos B foi feita através de um gradiente descontínuo de Percoll isotônico (os linfócitos B virgens se encontravam entre as frações 60% e 100% do gradiente). Após o Percoll, as células passaram por uma aderência de duas horas em meio DMEM-10% soro fetal bovino, a 37°C com 5% de CO₂, para a retirada de células aderentes, como macrófagos e células dendríticas. Por último, fez-se uma lise por complemento das células T CD4 e CD8. A pureza da população B foi constatada por citometria de fluxo. A purificação foi bastante eficiente, sendo que no final deste processo 85% a 95% das células presentes nesta suspensão apresentou o marcador B220, específico de células B. A figura 8 mostra um experimento demonstrativo, no

qual houve um enriquecimento de 50% (população inicial de células B presente no baço) para 95% após a purificação.

Análise da pureza dos linfócitos B por citometria de fluxo

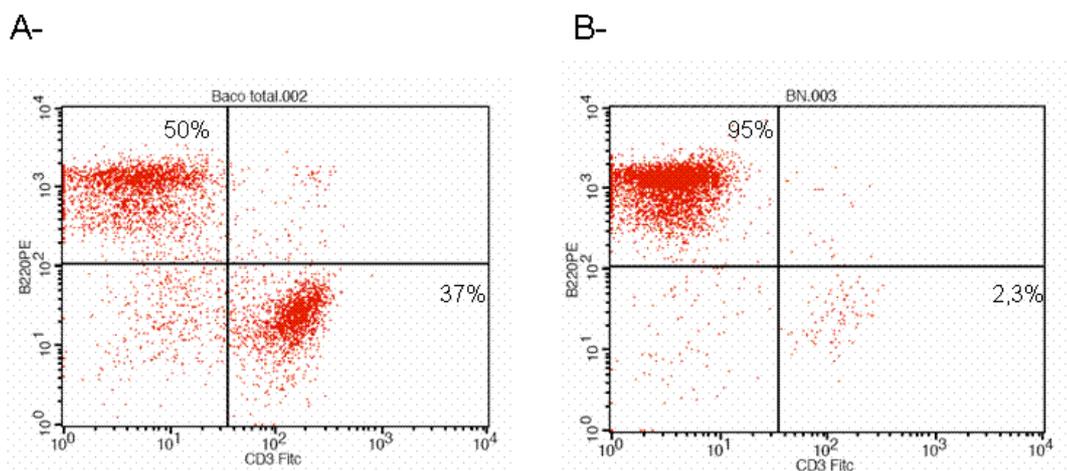


Figura 8. Pureza das células B. Esplenócitos de camundongos F1(bxd) foram retirados e os linfócitos B virgens purificados segundo a técnica descrita no item materiais e métodos 3.3.4. A pureza dessas células foi analisada por citometria de fluxo, usando anticorpos monoclonais anti-B220-PE, molécula que marca células B e anti-CD3 FITc, que marca células T. (A) análise de células de baço total e; (B) análise das células após o processo de purificação. Dados representativos de 7 experimentos.

4.1.2 Ensaios funcionais *in vitro* para a avaliação da funcionalidade das células B

Após a purificação dos linfócitos B, realizaram-se testes para avaliar a viabilidade desta população celular. Esta análise é fundamental para excluir a possibilidade de morte celular durante o processo. Para tal, verificou-se a capacidade proliferativa dessas células ante uma estimulação com LPS. A análise foi realizada pela contagem da incorporação de timidina radioativa. Na figura 9 pode-se observar um experimento representativo elucidando a eficiente capacidade proliferativa desses linfócitos após o estímulo indicado, confirmando que as células B purificadas sob o nosso protocolo mantêm-se

vivas e capazes de proliferar frente a este estímulo, após o processo de purificação.

Células purificadas respondem ao estímulo com LPS

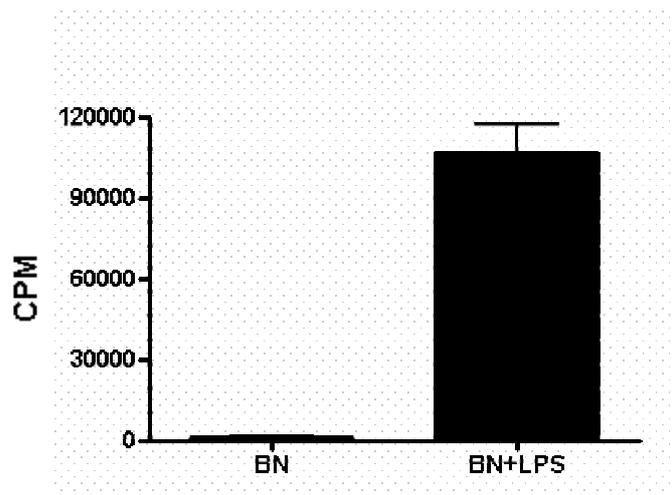


Figura 9. Capacidade proliferativa das células B purificadas ante estímulo com LPS. 2×10^5 células B virgens foram purificadas e cultivadas com $15 \mu\text{g/ml}$ de LPS. A cultura foi mantida por 48 horas. A proliferação foi avaliada por incorporação de timidina nas últimas 18 horas de cultura e a leitura do resultado feita por cintilação líquida de irradiação em contador β . Experimento realizado em triplicata e representativo de 4.

4.1.3 Ensaio funcional *in vitro* para a avaliação da capacidade estimulatória das células B

Sabe-se que a função apresentadora das células B varia de acordo com o seu estado de ativação, podendo ativar ou tolerizar linfócitos T e participando da geração e regulação da resposta imunológica. A ativação dos linfócitos T necessita de um estímulo via TCR, fornecido pelas moléculas MHC I e II (sinal

1) e um segundo sinal (co-estimulatório) fornecido pela ligação das moléculas B7 com CD28 (sinal 2) (Schwartz, 2003). As células B, quando virgens (antes de sua ativação), são pobres em moléculas co-estimulatórias, sendo assim, quando utilizadas como apresentadoras de antígenos para linfócito T, não promovem sua ativação de forma eficiente (Liu & Janeway, 1991). Tendo como base estas informações, realizamos testes *in vitro* para avaliar a capacidade co-estimulatória das células B purificadas em nossos experimentos como forma de verificar o seu estado de ativação.

4.1.3.1 Células B purificadas não provêm coestimulação aos linfócitos T estimulados com ConA

O primeiro teste funcional realizado para analisar a capacidade co-estimulatória desses linfócitos B, e conseqüentemente seu estado de ativação, foi uma co-cultura dessas células com linfócitos T na presença do mitógeno Conavalina A (ConA). Este mitógeno atua de maneira inespecífica mas dependente de TCR, fazendo-se necessário um agente co-estimulador para ativação completa dos linfócitos T. Os dados da figura 10 mostram ausência de proliferação celular na cultura onde células B purificadas e irradiadas foram usadas como co-estimuladoras. Em contrapartida, os controles, que utilizaram células de baço total irradiadas como fonte de co-estímulo, apresentaram altas contagens no mesmo ensaio de proliferação. Estes resultados sugerem que as células B purificadas em nossos experimentos são virgens e incapazes de estimular a resposta de células T.

Linfócitos B virgens não têm atividade co-estimulatória

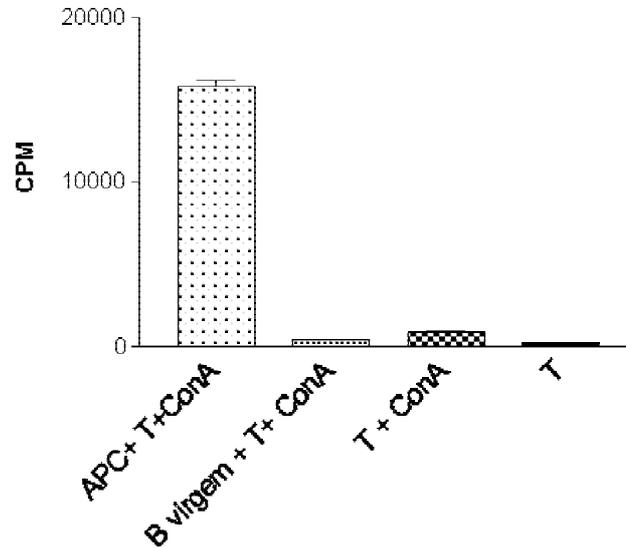


Figura 10. Potencial co-estimulatório dos linfócitos B virgens. Linfócitos T de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c (2×10^5) foram purificados a partir de duas colunas de lã de Nailon e colocados em cultura na presença do mitógeno concavalina A (ConA). A esta cultura adicionaram-se linfócitos B virgens de BALB/c (4×10^5) purificados como descrito na seção materiais e métodos, no item 3.3.4, ou esplenócitos totais (APC) (purificados como descrito no item 3.3.1) como fonte de células co-estimuladoras. A cultura foi mantida durante 48 horas e a proliferação foi avaliada por incorporação de timidina nas últimas 18 horas. A leitura do resultado feita por cintilação líquida de irradiação em contador β . Experimento realizado em triplicata.

4.1.3.2 Linfócitos B virgens não são capazes de estimular uma MLR

Visando a fortalecer a idéia de que estas células B purificadas são virgens e por tanto deficientes co-estimuladoras, realizou-se outro ensaio funcional *in vitro*. Desta vez, o teste escolhido foi uma MLR. Neste ensaio, células de linfonodos de camundongos BALB/c foram estimuladas *in vitro* na presença de células B purificadas e irradiadas, obtidas de camundongos F1 (bx_d) ou B6. Como controle experimental, utilizaram-se esplenócitos totais irradiados obtidos dos mesmos animais, ou de B6. Os dados da figura 11

mostram que na cultura onde as células B purificadas foram usadas como apresentadoras de antígenos, a proliferação foi menor ou ausente em relação à cultura que apresentava baço total como fontes de células estimuladoras.

Linfócitos B virgens são incapazes de estimular uma MLR

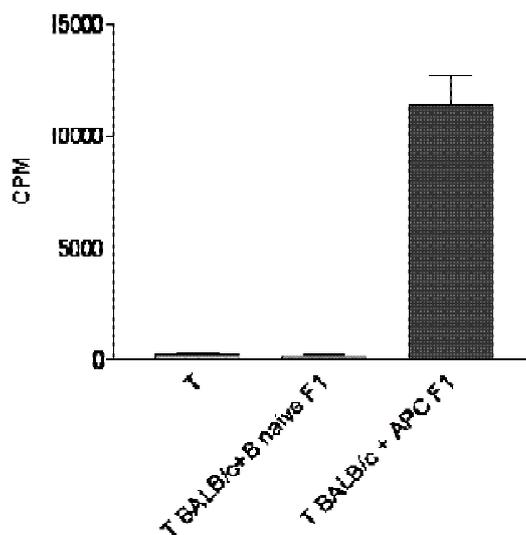


Figura 11. Linfócitos B virgens não são capazes de estimular uma MLR. Células T de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c (4×10^5) foram estimuladas *in vitro* na presença de células B purificadas e irradiadas, obtidas de camundongos F1(bxd) — 4×10^5 . Como controle experimental, utilizaram-se esplenócitos totais irradiados e obtidos dos mesmos animais F1(bxd). A cultura foi mantida durante 5 dias e a proliferação foi avaliada por incorporação de timidina nas últimas 18 horas. A leitura do resultado feita por cintilação líquida de irradiação em contador β . Resultado representativo de 3 experimentos realizados em triplicata.

Este resultado é bastante interessante, já que neste conjunto de linfócitos T utilizados na cultura podem existir células de memória para agentes ambientais que poderiam fazer reações cruzadas com aloantígenos (vide introdução item 1.3). Estas células ativadas não necessitariam de co-estimulação para proliferarem. Sugerimos neste caso que: I - as células de

memória precisam de co-estímulo para serem ativadas ou II - não há reatividade cruzada entre antígenos ambientais e os aloantígenos utilizados. De fato, há na literatura alguns relatos indicando que pelo menos em algumas condições a reatividade cruzada não ocorre ou não é evidenciada (Chen, Cui e cols., 2004; Anderson, McNiff e cols., 2003)

Uma vez padronizado o processo de purificação dos linfócitos B, chamados a partir de agora de linfócitos B virgens (BN, B *naive*), passamos para as questões principais do trabalho.

4.2 Linfócitos B não induzem tolerância a antígenos alogeneicos no modelo de transplante de pele

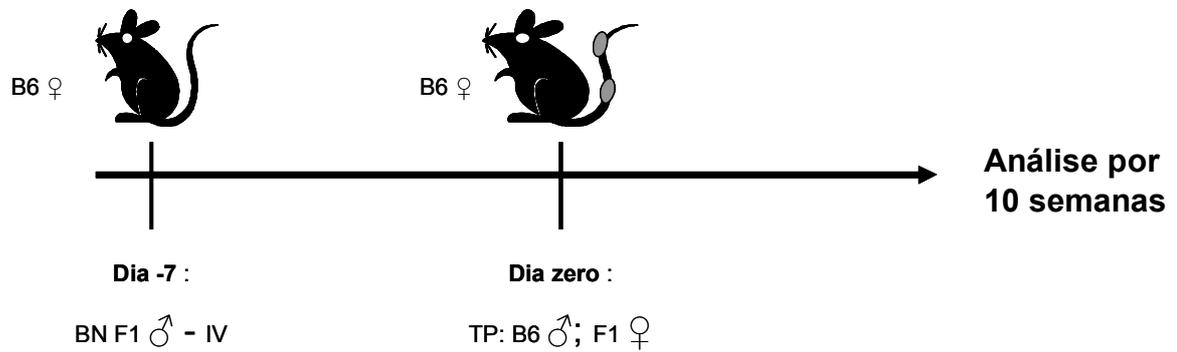
Tendo por base dados descritos anteriormente na literatura, onde linfócitos B virgens são capazes de induzir tolerância em linfócitos T virgens, questionou-se se este fenômeno poderia acontecer no caso de uma estimulação na presença de antígenos alogeneicos no modelo de transplante de pele. No início da década de 1990, Fuchs & Matzinger demonstraram que linfócitos B virgens são capazes de induzir tolerância ao antígeno de macho (H-Y) (Fuchs & Matzinger, 1992). Uma vez que o primeiro mecanismo proposto para explicar a tolerância mediada pela célula B foi a anergia e que a diferença entre estas duas respostas é a frequência dos clones respondedores envolvidos, este fenômeno poderia ser efetivo tratando-se de uma estimulação com antígenos alogeneicos. Em princípio não deveria haver dificuldade em se estimular de forma incompleta (ativação via TCR sem co-estimulação) um número grande de clones. Para testar tal hipótese, camundongos B6 foram

tratados ou não com injeção endovenosa de linfócitos BN provenientes de camundongos F1 (bx^d) machos. Após uma semana, estes animais foram testados recebendo, na cauda, um enxerto de pele de B6 macho e um de F1(bx^d) fêmea. O protocolo básico está demonstrado na figura 12 mostra. A sobrevivência dos enxertos foi analisada durante dez semanas após a realização do transplante (a aparência macroscópica dos transplantes está mostrada na figura 13). A utilização de linfócitos B virgens de camundongos F1(bx^d) machos, neste experimento, foi devido à possibilidade de construir um modelo em que a mesma célula B carregaria os complexos antigênicos H-2^b+H-Y, que é um antígeno capaz de induzir tolerância quando apresentado por células B de B6 (Fucks & Matzinger, 1992), e os antígenos alogênicos de BALB/c (H-2^d) a serem testados, permitindo um controle quanto à capacidade tolerogênica da célula B utilizada.

Como esperado, 90% dos animais tratados com BN de F1(bx^d) macho foram tolerantes ao enxerto de B6 macho (Figura 14b). Entretanto, o tratamento com BN de F1(bx^d) não preveniu a rejeição dos enxertos provenientes de camundongos F1(bx^d) fêmeas. Após cinco semanas, 100% dos transplantes semi-alogênicos foram rejeitados nos camundongos tratados com BN de F1(bx^d). Vale chamar a atenção para o fato de que há um atraso, ainda que não significativo estatisticamente pelo método Lnogrank, na rejeição dos transplantes semi-alogênicos nos hospedeiros tratados previamente com células BN em relação aos não tratados (50 % apresentam rejeição no dia 21 contra dia 13 para o controle).

A -

Protocolo Experimental



B -

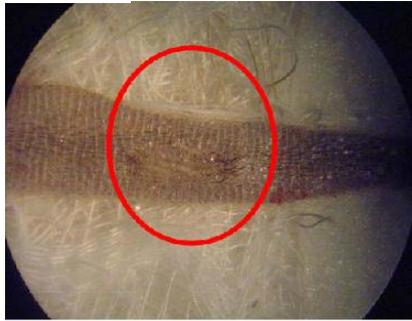


Figura 12. Protocolo Experimental. Camundongos B6 foram tratados, ou não, com uma injeção endovenosa (IV) de 10^7 linfócitos BN provenientes de camundongos F1(bxd) machos. Após uma semana, estes animais foram testados recebendo, na cauda, um enxerto de pele de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea. A análise foi feita durante 10 semanas. (A) Protocolo Experimental do grupo teste. (B) Enxertos após 24 horas.

Padrões Macroscópicos de aceitação/rejeição

A -

A1 -

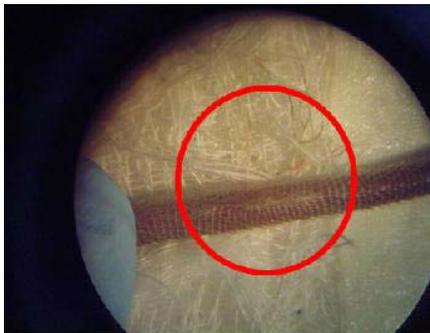


A2 -



B -

B1 -



B2 -

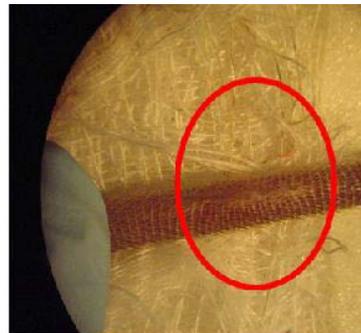


Figura 13. Padrões macroscópicos de: (A) padrão de aceitação do transplante de pele de B6 fêmea em dois diferentes animais e **(B) padrão de rejeição** do transplante de pele de F1 fêmea em dois diferentes animais. Camundongos B6 foram tratados ou não, com uma injeção endovenosa (IV) de 10^7 linfócitos BN provenientes de camundongos F1(bxd) machos. Após uma semana, estes animais foram testados recebendo, na cauda, um enxerto de pele de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea.

Linfócitos B não induzem tolerância a antígenos alogeneicos no modelo de transplante de pele

Sobrevivência dos enxertos

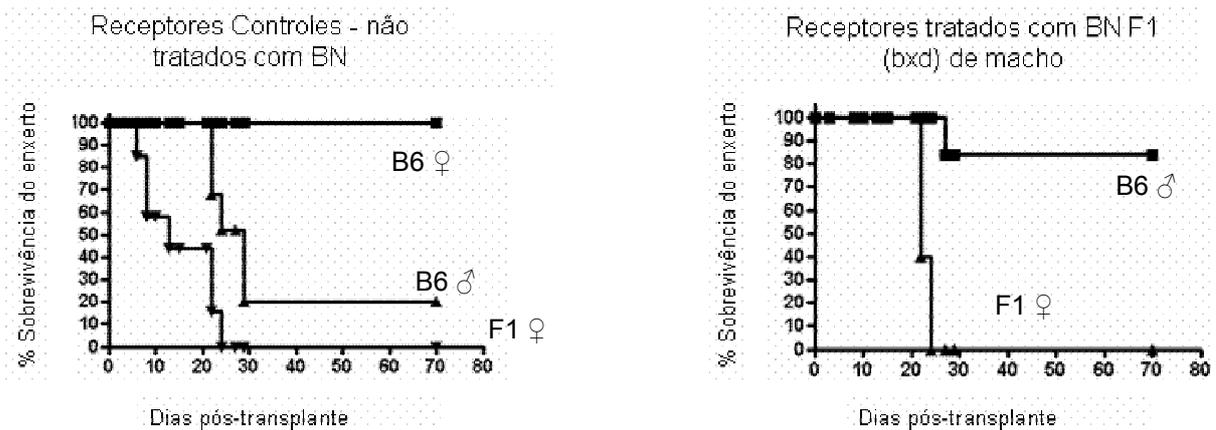


Figura 14. Linfócitos B induzem tolerância ao antígeno H-Y, mas não a antígenos semi-alogeneicos no modelo de transplante de pele. Camundongos B6 fêmea foram ou não tratados com uma injeção endovenosa (IV) de 10^7 linfócitos BN provenientes de camundongos F1(bxd) machos. Após uma semana, estes animais foram testados recebendo, na cauda, um enxerto de pele de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea (6 animais por grupo).

4.3 A tolerância mediada por linfócitos B virgens não é tecido específica

Embasados nos resultados descritos anteriormente, que demonstraram a incapacidade dos linfócitos BN na indução de tolerância em resposta a antígenos alogeneicos, começou-se a investigar se esta incapacidade era consequência de diferenças entre o repertório antigênico apresentado pelas células B (usadas como estímulo tolerogênico) e pelas células da pele (usadas como tecido teste). Em 1993, Bonomo & Matzinger mostraram que quimeras de BALB/c NUDE que recebem estroma tímico de B6 aceitam enxertos de pele

e rejeitam enxertos de baço desta mesma linhagem. Estas quimeras enxertadas com timo de B6 rejeitam o componente hematopoético mas aceitam o componente epitelial do timo. No caso de um antígeno mais “simples”, as chances de os linfócitos BN e as células da pele, apresentarem os mesmos epítomos é muito maior do que tratando-se de uma resposta complexa, com antígenos variados, como no caso dos antígenos alogeneicos do MHC. Na resposta alogeneica é provável que exista uma diferença nos epítomos apresentados (pela célula BN e pele), correspondentes aos antígenos tecido-específicos.

Para testar esta nova hipótese, avaliou-se o potencial dos linfócitos B virgens na tolerização a tecido hematopoético, mais especificamente o baço. Este novo teste foi um enxerto de baço de F1(bxd), na cápsula renal de camundongos B6 tratados previamente (no dia -7 em relação ao transplante) com células BN de F1(bxd). Um mês depois, os animais receptores sofreram eutanásia e os enxertos foram analisados macroscópica e microscopicamente. Nesta situação, o tecido utilizado para o teste foi mais próximo ao utilizado para a tolerização, uma vez que cerca de 60% das células que compõem o baço são linfócitos B. Os enxertos de baço na cápsula renal também foram rejeitados (figura 15).

Transplante de Baço na Cápsula Renal

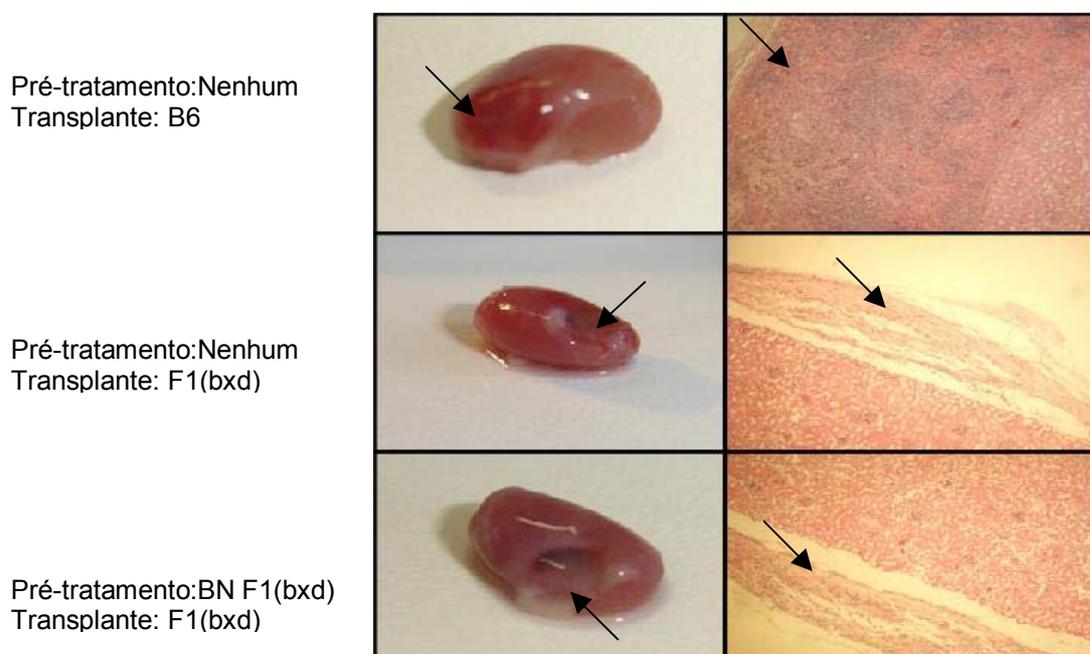


Figura 15. O tratamento com linfócitos BN não previne a rejeição de enxerto semi-alogeneico na cápsula renal. Camundongos B6 foram ou não tratados com 10^7 células BN de F1, IV. Uma semana depois, esses animais receberam um enxerto de baço singeneico ou semi-alogeneico na cápsula renal. Um mês depois, esses animais sofreram eutanásia e os enxertos foram analisados macroscopicamente e microscopicamente — aumento de 200x utilizado para a análise — (processo de preparação descrito na seção materiais e métodos, no item 3.11). Análise de um animal representativo de experimento com 4 animais por grupo analisados individualmente.

Estes achados sugerem que a incapacidade dos linfócitos BN em tolerar uma resposta alógena não é consequência da variabilidade antigênica presente nos diferentes tecidos. Mas nem todas as células do baço são linfócitos B, e é possível que os 40% de células não B sejam os responsáveis por induzir a rejeição. Optamos então por um outro ensaio, onde

as células indutoras de tolerância são muito próximas às usadas para testá-la. Para tal, linfócitos B totais purificados a partir de esplenócitos de F1(bxd) foram marcados com CFSE e injetados em camundongos B6 previamente tratados com BN também de F1(bxd). Antes da realização do teste fez-se necessária a realização de alguns controles para a padronização do modelo.

O primeiro passo para esta padronização foi avaliar o destino destes linfócitos B, infundidos por via intraperitoneal (IP), ao longo do tempo após a injeção. Assim, linfócitos B de camundongos B6 foram marcados com CFSE e infundidos em camundongos singênicos no dia zero. Após esta injeção analisou-se, por citometria de fluxo, a presença destas células no lavado intraperitoneal, no baço e no linfonodo mesentérico desses animais, nos dias +2, +4 e +6. Os dados da figura 16 mostram que as células permaneceram concentradas no líquido peritoneal, sendo possível sua análise e observação neste local até o dia +4 pós-infusão.

Localização dos linfócitos B marcados com CFSE e injetados IP ao longo do tempo

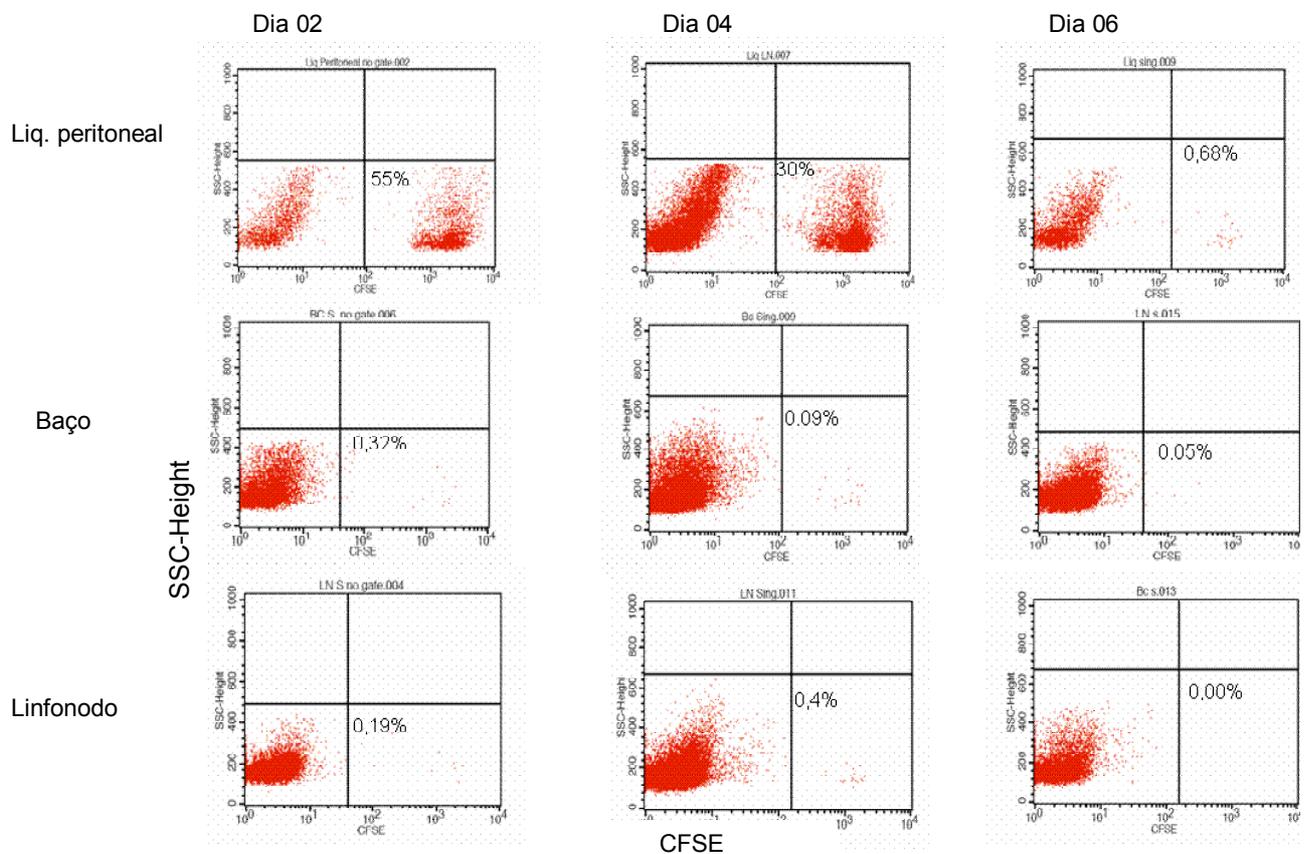


Figura 16. Localização dos linfócitos B totais marcados com CFSE ao longo do tempo. Camundongos B6 foram infundidos, via intraperitoneal (IP), com 10^7 linfócitos B marcados com CFSE provenientes de camundongos B6. Após 2,4 ou 6 dias analisou-se por citometria de fluxo a presença destas células B no lavado peritoneal, no linfonodo mesentérico e no baço destes animais. A figura mostra a análise individual de um camundongo em um experimento realizado com 4 animais por grupo.

Conhecendo a localização destes linfócitos, a próxima etapa foi avaliar qual o melhor dia para a observação da rejeição destas células nos animais não tratados com linfócitos BN. Para responder esta questão, camundongos B6 receberam, por via intraperitoneal, células B de B6, ou células B de F1(bxd). A investigação da rejeição das células B de F1(bxd) foi realizada no líquido peritoneal nos dias +2 e +4. Com base na análise dos resultados obtidos neste

experimento (figura 17), a análise do padrão de rejeição/aceitação foi possível nos dia +2 e +4. Optamos por realizar os testes no dia 4.

Cinética de tempo para melhor observação dos linfócitos B marcados com CFSE e injetados IP

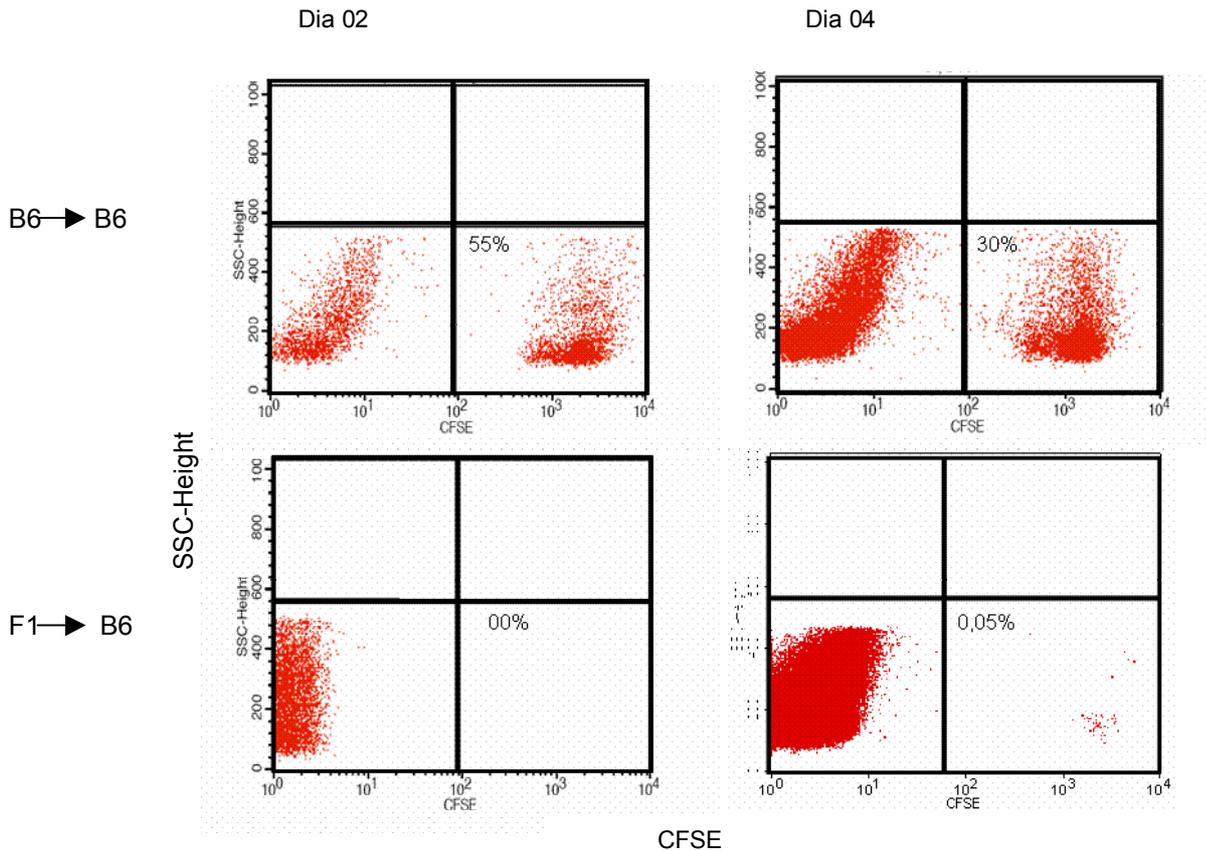


Figura 17. Cinética de tempo para melhor observação de rejeição das células B marcadas com CFSE. Camundongos B6 foram infundidos, IP, com 10⁷ linfócitos B marcados com CFSE provenientes de camundongos B6 ou F1(bxd). Após 2, ou 4 dias analisou-se por citometria de fluxo a cinética de rejeição (desaparecimento) destas células no líquido intaperitoneal. A figura mostra a análise individual de um camundongo em um experimento realizado com 4 animais por grupo.

Uma vez realizados todos os passos para a padronização do modelo, realizou-se o experimento para testar a capacidade das células BN na tolerização a linfócitos B marcados com CFSE e infundidos IP. Para tal,

camundongos B6 foram tratados com BN de F1(bxd). Uma semana depois, estes animais receberam, via intraperitoneal, células B de F1(bxd) marcadas com CFSE. Após quatro dias, as células peritoneais desses camundongos B6 foram recolhidas e analisadas por citometria de fluxo (figura 18). Nesta situação, como mencionado anteriormente, o mesmo estímulo, ou seja, células B, foi utilizado para a tolerização e para o teste. As células B de F1(bxd) foram rejeitadas eficientemente pelos receptores tratados com células BN.

A Tolerância por linfócitos B virgens não é tecido específica.

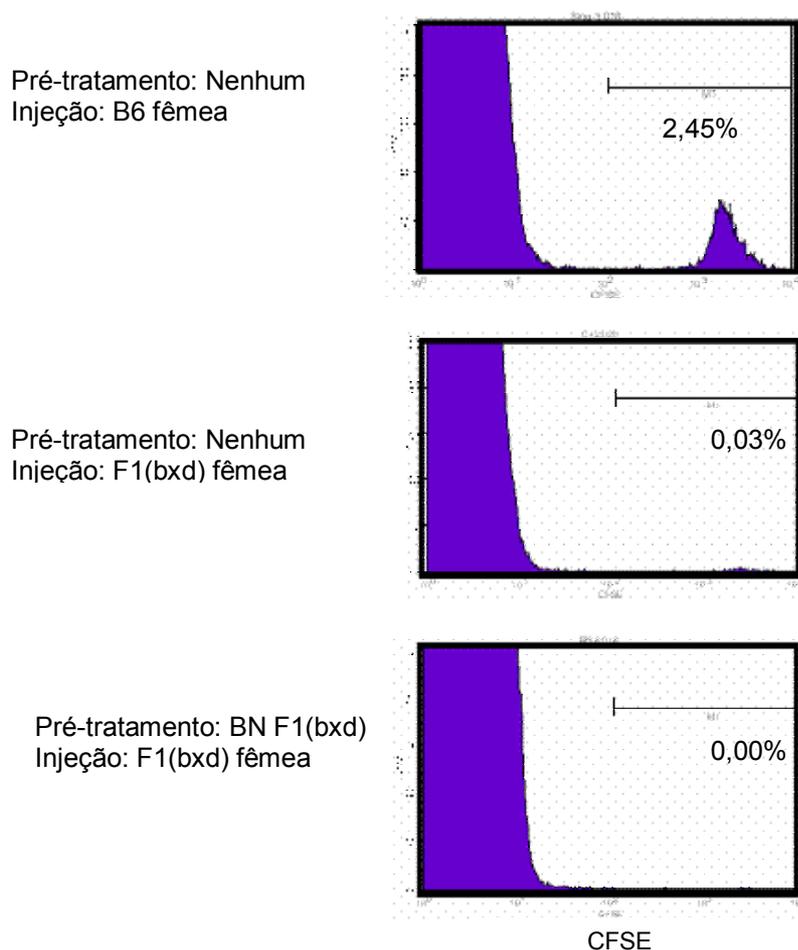


Figura 18. A tolerância mediada por linfócitos B virgens não é tecido-específica. Camundongos B6 foram ou não tratados com 10^7 células BN de F1(bxd), IV. Uma semana depois, esses animais receberam, via intraperitoneal (IP), células B de F1(bxd) marcadas com CFSE. Após quatro dias, as células do lavado peritoneal desses camundongos B6 foram recolhidas e a permanência dos linfócitos B injetados IP, analisada por citometria de fluxo. Análise representativa de um animal, de 1 experimento representativo de 2 com 3 animais por grupo, analisados individualmente).

Estes achados sugerem que a incapacidade dos linfócitos BN de induzirem tolerância a antígenos alogênicos não é dependente da diferença antigênica entre o estímulo indutor e o teste.

4.4 Células BN de F1(bxd) fêmea induzem tolerância a antígenos “menores” e não relacionados

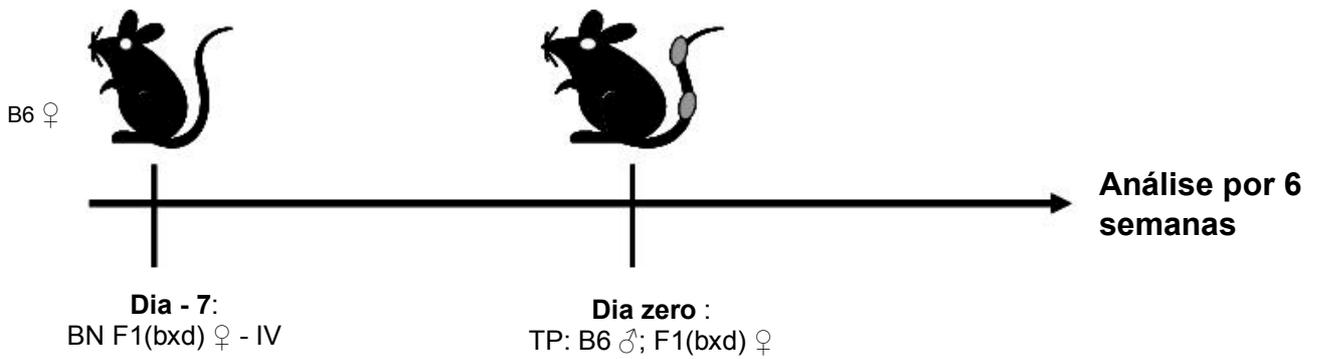
Os resultados acima estimularam a investigação mais profunda dos mecanismos utilizados pelas células B na indução ou não de tolerância a antígenos. Como mencionado na introdução deste trabalho, relatos da literatura sugerem o envolvimento de mecanismos de supressão relacionados com a tolerância mediada por células BN (Lei, Su e cols., 2005; Soukhareva, Jiang e cols., 2006; Apostulou, Sarukhan e cols., 2002; Suto, Nakajima e cols., 2002; Reichard, Dornbach e cols., 2007). Nossos resultados mostram a rejeição dos transplantes em uma situação em que existe uma grande variabilidade antigênica e, conseqüentemente, a freqüência de clones de células respondedoras é alta. Sabe-se que se tratando de células regulatórias, o efeito supressor é dependente de um equilíbrio adequado entre as células respondedoras e regulatórias (Takahashi, Kuniyasu e cols. 1998; Thornton & Shevach, 1998). Tendo por base estas informações, o próximo questionamento foi se o impedimento de gerar tolerância ao F1(bxd) é devido a um limite quantitativo na capacidade de ativar o mecanismo regulatório. Na figura 14, observou-se um atraso, ainda que não significativo, na rejeição da pele de F1 por hospedeiros tratados com BN de F1 macho. Numa tentativa de maximizar o estímulo tolerogênico para os aloantígenos, utilizou-se células BN de

camundongos F1(bxd) **fêmea**, eliminando os antígenos H-Y do estímulo indutor. Após uma semana da inoculação dos linfócitos BN, os receptores foram transplantados com pele de **F1(bxd) fêmea** e **B6 macho** ou somente com **B6 macho**. Os resultados da figura 19 demonstraram que a retirada dos antígenos H-Y do sistema não foi suficiente para a tolerização dos antígenos alogeneicos presentes na pele dos camundongos F1(bxd).

Surpreendentemente, os receptores tratados com células BN de F1(bxd) fêmea e enxertados com os dois transplantes **aceitaram o enxerto de B6 macho e rejeitaram o de F1(bxd) fêmea**, apesar de nunca terem tido contato com antígenos de macho. Por outro lado, como esperado os animais tratados da mesma maneira – BN de F1(bxd) fêmea – e transplantados com um único enxerto de B6 macho rejeitaram o mesmo (figura 19).

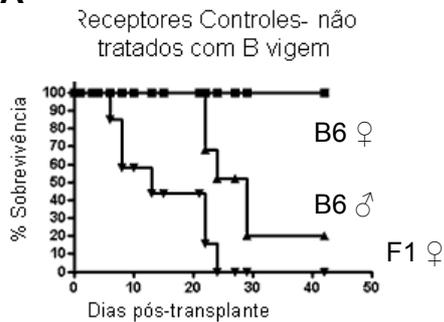
Células BN de F1(bxd) fêmea induzem tolerância ao antígeno de macho – H-Y

Protocolo

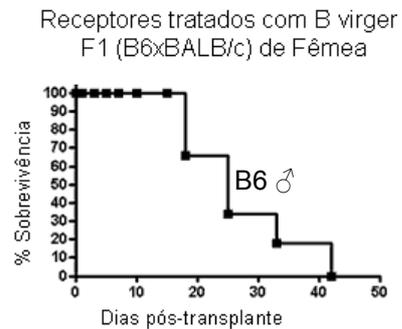


Sobrevivência dos Enxertos

A -



B -



C -

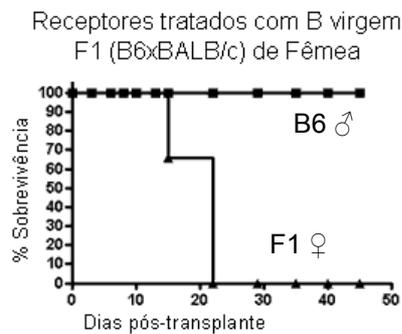


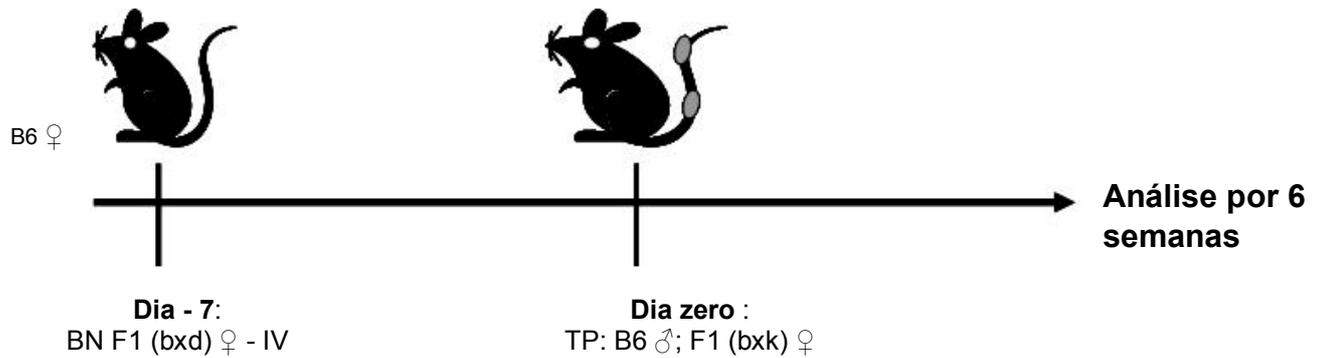
Figura 19. Células BN de F1(bxd) fêmea induzem tolerância ao antígeno de macho – H-Y. Camundongos B6 foram tratados ou não, IV, com 10^7 células BN provenientes de camundongos F1 fêmeas e, após uma semana, enxertados, na cauda, com pele de: (A) B6 fêmea, F1(bxd) fêmea e B6 macho; (B) B6 macho; (C) F1 (bxd) fêmea e B6 macho. Análise realizada por 6 semanas. O protocolo da figura ilustra o experimento teste (C). Um experimento representativo de 2 com 5 animais por grupo.

Investigou-se se a fase efetora da resposta (aceitação/rejeição da pele) precisava ser reestimulada especificamente por antígenos semelhantes aos utilizados na fase tolerogênica — pele de F1(bxd) —, apresentados pelos linfócitos BN de F1(bxd). Este estudo foi realizado tratando-se camundongos B6 com células B virgens de **F1 (bxd) fêmeas** e após uma semana transplantando-se estes animais, na cauda, com uma pele de **F1 (B6 x C3H) fêmea — F1(bXk) —**, e uma pele de **B6 macho**. Nesta situação, as células utilizadas para induzir tolerância possuíam MHC alogeneico diferente da pele utilizada para o teste: BALB/c H-2^d para indução e C3H, H-2^k para teste.

Os receptores B6 fêmeas previamente tratados com células **BN de F1(bxd) fêmea** e enxertados com dois transplantes, um de **B6 macho** e um de **F1 (bxk)**, **rejeitaram os dois enxertos** (figura 20) mostrando que há necessidade de um reestímulo específico para que a tolerância ao antígeno menor (*minor*) H-Y ocorra.

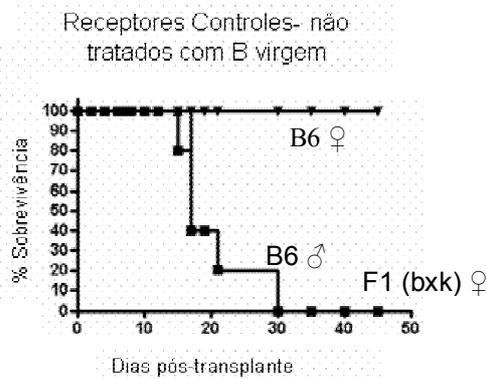
Tolerância ao H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea depende de reestímulo específico

Protocolo

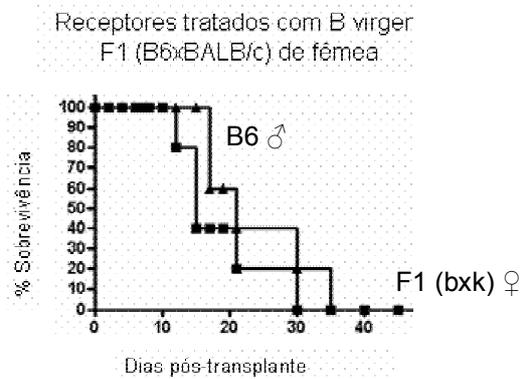


Sobrevivência dos Enxeros

A -



B -



▼ B6 ♀ ▲ B6 ♂ ■ F1 (bxk) ♀

Figura 20. Tolerância ao H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea depende de reestímulo específico. Camundongos B6 ou não foram tratados com uma injeção endovenosa (IV) de 10^7 células BN provenientes de camundongos F1 (B6xBALB/c) fêmeas e após uma semana enxertados, na cauda, com pele de: (A)- B6 fêmea, B6 macho e F1 (B6xC3H) fêmea; (B) F1 (B6xC3H) fêmea e B6 macho. O protocolo da figura ilustra o experimento teste (B). A pele do F1 (B6 x C3H) foi utilizada como um terceiro estímulo no sistema. Cinco animais por grupo.

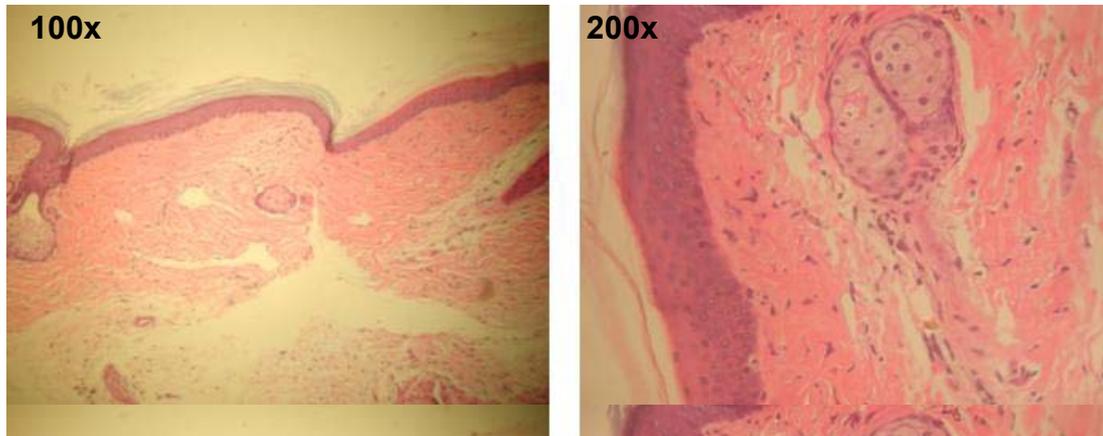
Os dados mostrados na figura 20 sugerem que para ocorrer o fenômeno de tolerância ao antígeno H-Y mediado por células B virgens de fêmea, se faz necessário um estímulo antígeno-específico, fornecido, neste caso, pela pele de F1(bxd) fêmea, evoluindo para uma tolerância secundária capaz de tolerizar o transplante de B6 macho.

4.5 A análise histopatológica das peles tolerizadas por células BN apresentam infiltrado linfocitário

Os resultados revelados nas figuras 19 e 20 levaram à busca de uma análise mais detalhada dos mecanismos envolvidos na tolerância dependente dos linfócitos BN. Esta análise se iniciou com a investigação do padrão histopatológico de aceitação das peles do controle (pele de B6 fêmea) e dos animais tratados com BN (pele de B6 macho). Como esperado, a pele de B6 fêmea mostrou-se íntegra em todas as estruturas avaliadas, com ausência de infiltrados celulares (Figura 21). Surpreendentemente, este padrão não foi mantido nas peles tolerizadas pelo tratamento com BN. Estas peles, de B6 macho, apresentaram estruturas teciduais íntegras, mas verificou-se a presença de um importante infiltrado linfocitário (figura 21). Este fato permite sugerir o envolvimento de um mecanismo ativo de indução de tolerância.

Análise histopatológica das peles tolerizadas por células BN mostra infiltrado linfocitário

Pele de B6 Fêmea



Pele de B6 Macho transplantada em animal previamente tratado com B virgem de F1(bxd) fêmea.

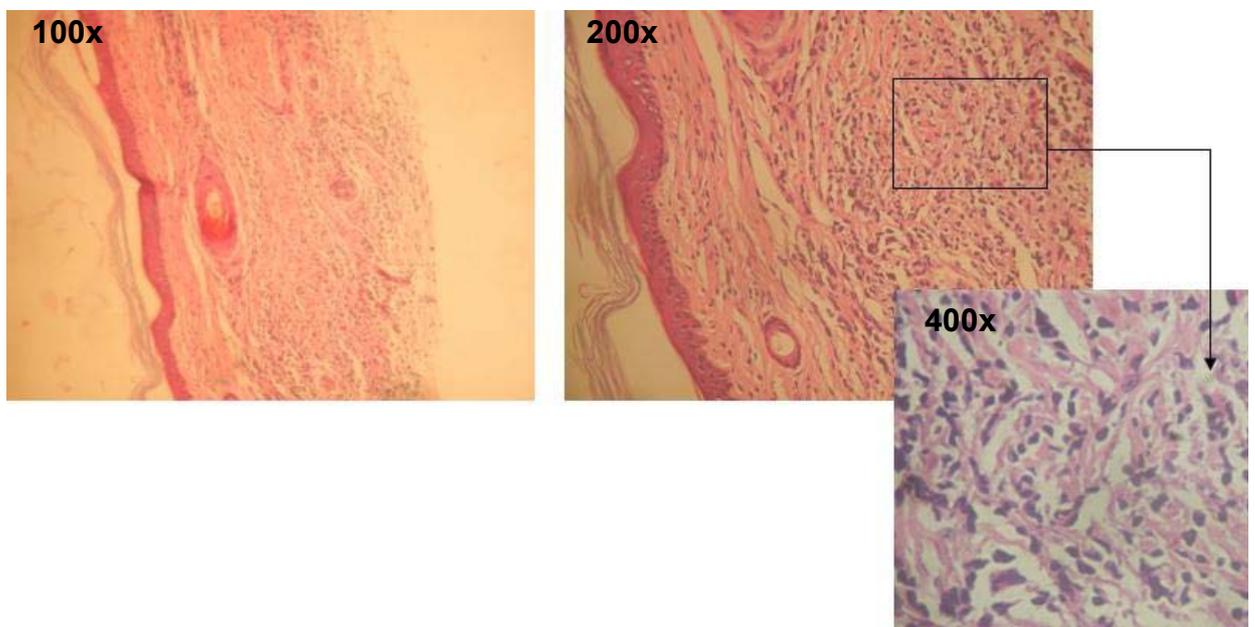


Figura 21. A análise histopatológica das peles tolerizadas por células BN evidenciou infiltrado linfocitário. Camundongos B6 foram ou não tratados, com uma injeção endovenosa de 10^7 células BN provenientes de camundongos **F1 fêmeas** e após uma semana enxertados, na cauda, com pele de: (I) **B6 fêmea, F1 fêmea e B6 macho**; (II) **B6 macho**; (III) **F1 fêmea e B6 macho**. As peles aceitas (B6 fêmea e B6 macho — III) foram analisadas histopatologicamente. O processo de preparação está descrito na seção materiais e métodos, item 3.11. Foram analisados no mínimo 6-8 cortes por bloco. Caracterizou-se a presença ou não de infiltrados mononucleares e a integridade do órgão em questão.

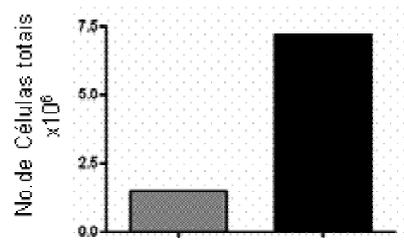
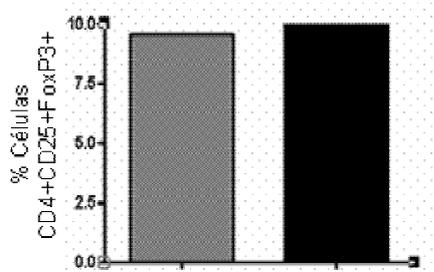
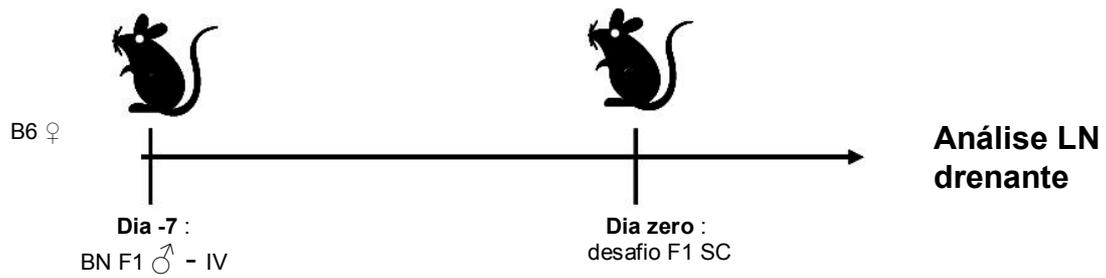
4.6 O tratamento com linfócitos B virgens inibe o aumento do número absoluto de células viáveis do linfonodo drenante, sem alterar o valor relativo das células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Baseados nos dados anteriores, avaliou-se uma possível alteração de número e função das células T regulatórias nos animais tratados com células BN. Para responder a esta questão, camundongos B6 fêmeas foram ou não tratados com células BN de camundongos F1(bxd) machos. Após uma semana (no caso do F1 fêmea) ou 3 semanas (no caso do B6 macho, que necessitou de imunização prévia) esses animais foram desafiados no coxim plantar com esplenócitos de F1(bxd) fêmea ou B6 machos. Após o período de mais uma semana, os linfonodos drenantes desses animais foram retirados e analisados quanto ao número de células totais e percentual de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. A avaliação dos dados demonstrou que o percentual de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ é bastante parecido nos animais previamente tratados ou não com células BN. No entanto, o número total de células presentes nestes linfonodos drenantes é muito menor nos animais que receberam BN (figura 22).

Estes resultados mostram que não há aumento no número de células dos linfonodos drenantes dos animais que receberam células BN e foram desafiados no coxim plantar e que esta inibição não é dependente de um aumento relativo no número de células T regulatórias CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

O tratamento de receptores B6 fêmeas com linfócitos BN inibe a o aumento do número absoluto de células viáveis sem alterar o valor relativo de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺.

A -



Células B virgens
Imunização

F1 ♀
F1 ♀

-
F1 ♀

F1 ♀
F1 ♀

-
F1 ♀

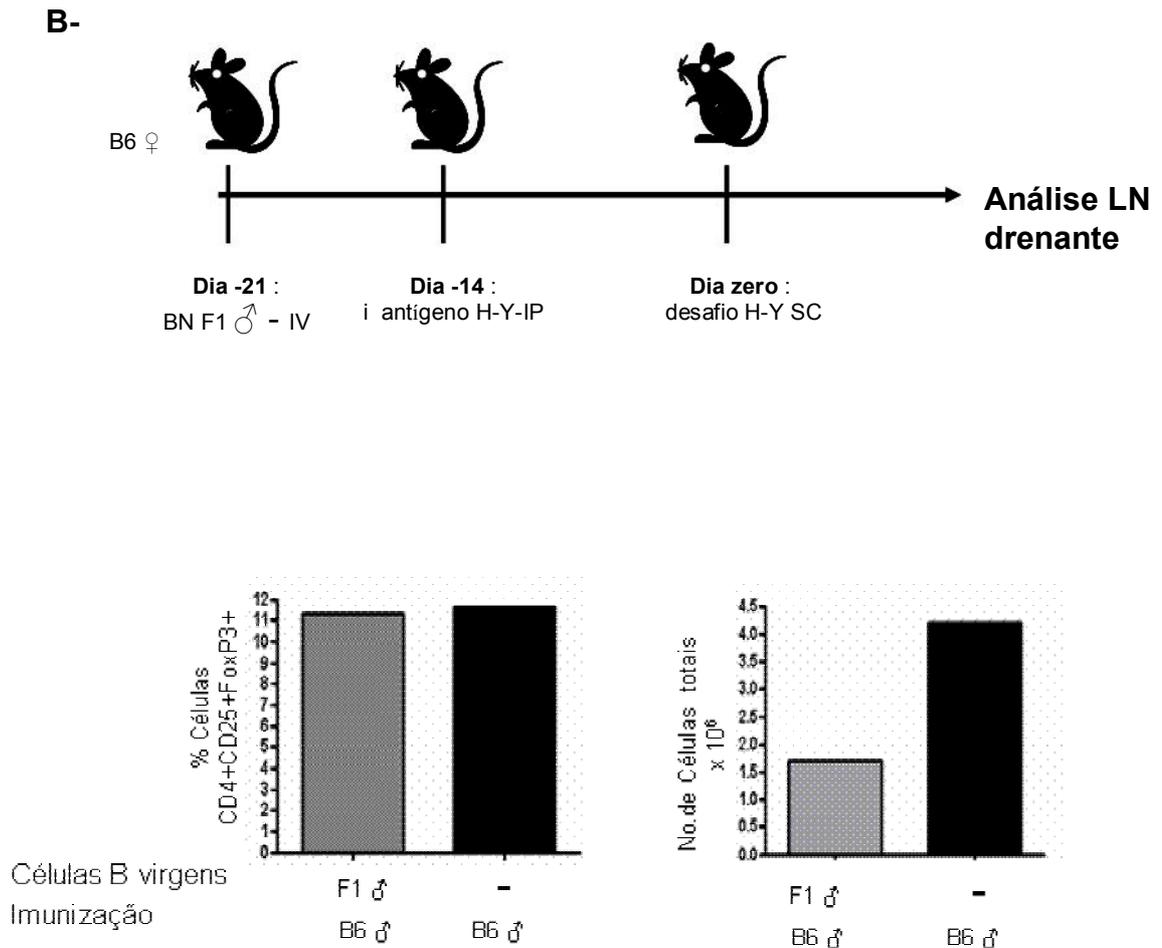


Figura 22. O tratamento com linfócitos B virgens inibe a proliferação das células do linfonodo drenante, sem alterar o número relativo das células T $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. Camundongos B6 foram ou não tratados, com uma injeção endovenosa (IV) de 10^7 linfócitos BN provenientes de camundongos F1 machos. (A) Após uma semana, estes animais foram desafiados, via subcutânea (SC), com 10^7 células de baço total (irradiadas a 2.500 rad) de camundongos F1(bxd) fêmeas; (B) Após uma semana, os animais B6 fêmea foram imunizados, IP, com 10^7 esplenócitos de B6 machos e após 14 dias desafiados no coxim plantar, SC, novamente com 10^7 esplenócitos de B6 machos, agora irradiados com 2.500 rad. Sete dias depois do desafio todos os animais sofreram eutanásia, seus linfonodos poplíteos foram retirados e analisados quanto ao número total de células e número relativo de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$. O número de células foi verificado através da contagem de células viáveis utilizando o corante azul de Trypan e o valor relativo das Treg foi avaliado por citometria de fluxo. Um experimento representativo de 3 com 4 animais por grupo.

4.7 O tratamento com linfócitos B virgens potencia atividade supressora em camundongos Marylin RAG^{-/-} sem aumento relativo nas células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Sabendo-se que o tratamento com linfócitos BN, ao contrário dos animais não tratados, não promove aumento do número de células no linfonodo drenante uma semana após o desafio no coxim plantar sem alterar o valor relativo das Treg, o próximo passo foi avaliar a função supressora destas células Treg. Para tal, realizou-se um ensaio de supressão *in vitro*. Para a efetuação desse teste, camundongos Marylin RAG^{-/-} (animais que possuem TCR específico para o antígeno de macho H-Y) foram tratados com células B virgens de F1(bxd) macho e desafiados no coxim plantar com esplenócitos de B6 macho. Após uma semana, os linfonodos drenantes destes animais foram retirados e o valor relativo de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, o número total de células e a capacidade supressora foram analisados. O número relativo de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ novamente manteve-se bastante parecido nos animais tratados ou não com células BN (Figura 23-A), enquanto que o número absoluto de células nos linfonodos drenantes mostrou-se mais baixo nos animais tratados com células BN, comparando com os animais controles não tratados (Figura 23-A).

A análise da capacidade supressora foi feita *in vitro*, testando-se o potencial supressor dessas Treg obtidas dos linfonodos drenantes de camundongos tratados ou não com células BN, em uma resposta antígeno específica a H-Y. Como células respondedoras desta cultura, utilizou-se células de linfonodos mesentéricos de camundongos Marylin RAG^{-/-}, estimuladas com

esplenócitos de B6 macho irradiados. Ao adicionar a estas culturas células totais de linfonodos drenantes do desafio de camundongos Marylin RAG^{-/-} tratados ou não com linfócitos BN, nota-se uma supressão de 50% da resposta. Por outro lado, se forem adicionadas células de Marylin RAG^{-/-} que foram apenas desafiadas mas não tratadas com BN de macho, nenhum efeito supressor é observado (figura 23-B).

Células BN potenciam a atividade supressora em camundongos Marilyn, sem alterar o número relativo das células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

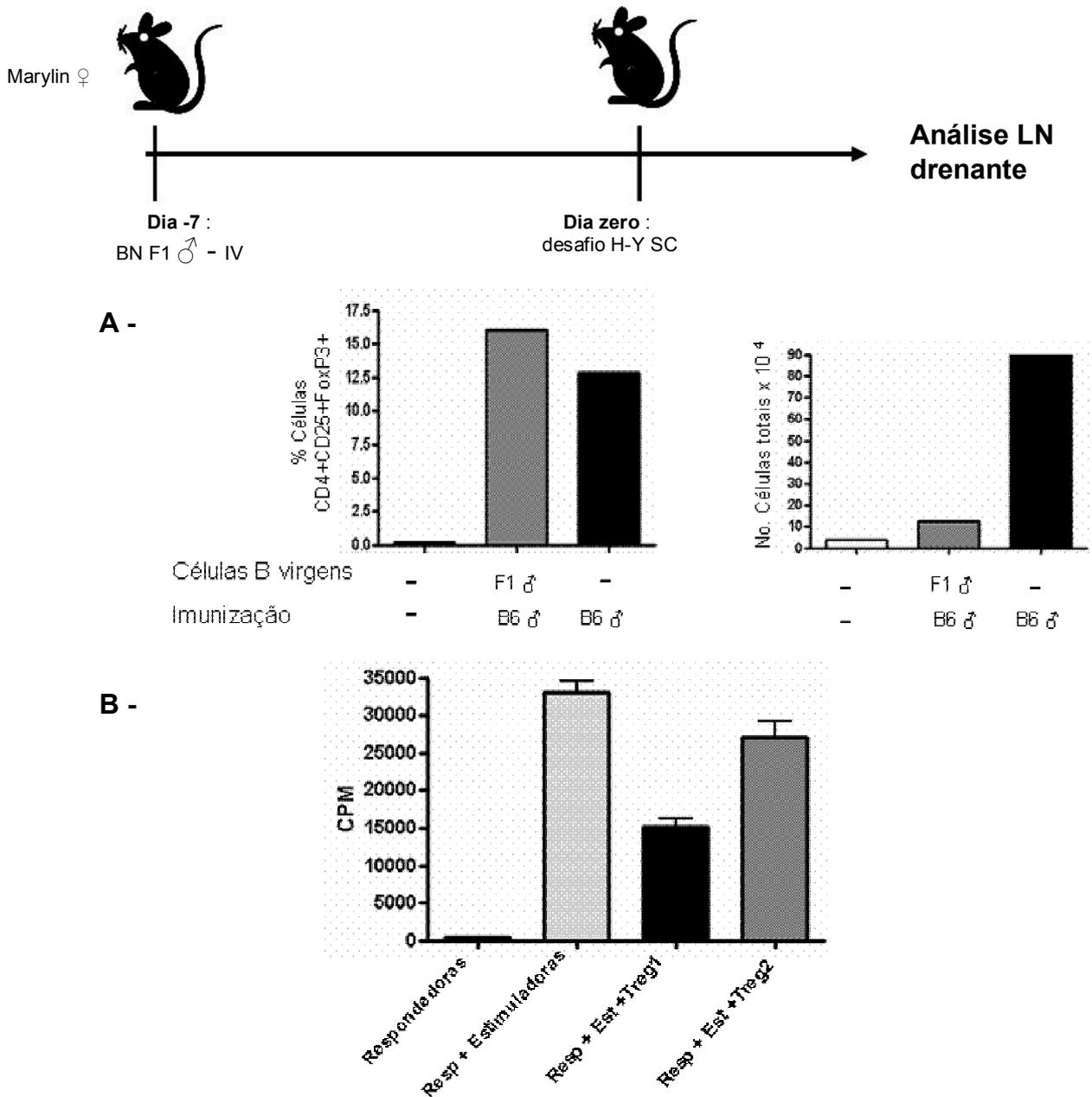


Figura 23. O tratamento com linfócitos B virgens induz atividade supressora em camundongos Marilyn RAG^{-/-} sem aumento relativo nas células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Camundongos Marilyn RAG^{-/-} foram ou não tratados com uma injeção IV de 10⁷ linfócitos BN provenientes de camundongos F1(bxd) machos. Após uma semana, esses animais foram desafiados, SC, com 10⁷ células de baço total de camundongos B6 machos. Sete dias depois do desafio todos os animais sofreram eutanásia, seus linfonodos poplíteos foram retirados e analisados quanto ao número total de células, número relativo de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ e atividade supressora *in vitro*. (A) O número de células foi verificado por meio da contagem das células viáveis utilizando o corante azul de Trypan e o valor relativo das Treg foi avaliado por citometria de fluxo. (B) Ensaio de Supressão *in vitro* ante resposta antígeno-específica a H-Y. Células respondedoras: células de linfonodos mesentéricos de camundongos Marilyn RAG^{-/-}; células estimuladoras: esplenócitos de B6 macho irradiados a 2.500rad; células supressoras: células supressoras 1 ou 2, descritas no item 3.5.3.3. A cultura foi mantida por 72 horas e a análise da proliferação foi avaliada por incorporação de timidina nas últimas 18 horas. A leitura do resultado feita por cintilação líquida de irradiação em contador β. Um experimento representativo de 2 (4 animais por grupo).

4.8 Tratamento com anticorpos anti-CD25 bloqueia a tolerância mediada por células BN

Para comprovar o envolvimento e a importância das células T regulatórias na tolerância induzida por linfócitos B virgens *in vivo*, investigamos como este fenômeno se comportaria na ausência destas células funcionalmente ativas.

Numa tentativa de esclarecer esta questão, foram utilizados anticorpos monoclonais anti-CD25 (7D-4), bloqueadores da função efetora destas células. Camundongos B6 fêmea receberam células BN de camundongos F1(bxd) macho e, após uma semana, foram transplantados com pele de B6 macho. Um grupo experimental foi tratado com anticorpo monoclonal anti-CD25 no dia -1, +2, +5 em relação ao transplante (dia zero) e após, semanalmente, até o final do experimento (figura 24-A). O anticorpo 7D-4, utilizado no teste, promove a inativação funcional, não a depleção das células T regulatórias CD4⁺CD25⁺ (Kohm, Macmahon e cols., 2006).

O tratamento com anti-CD25 reverte a tolerância induzida pelos linfócitos B. No modelo de transplante de pele, utilizando apenas o antígeno de macho H-Y, 90% dos animais que receberam o tratamento com o anticorpo acima mencionado rejeitaram o transplante de pele de B6 macho, mostrando que a tolerância mediada por células B virgens é dependente de células regulatórias CD25⁺ funcionais.

Para eliminar qualquer possibilidade de influência dos antígenos alogênicos em nosso sistema e comprovar que o mecanismo utilizado pelos linfócitos BN na indução de tolerância a H-Y no modelo de transplante de pele,

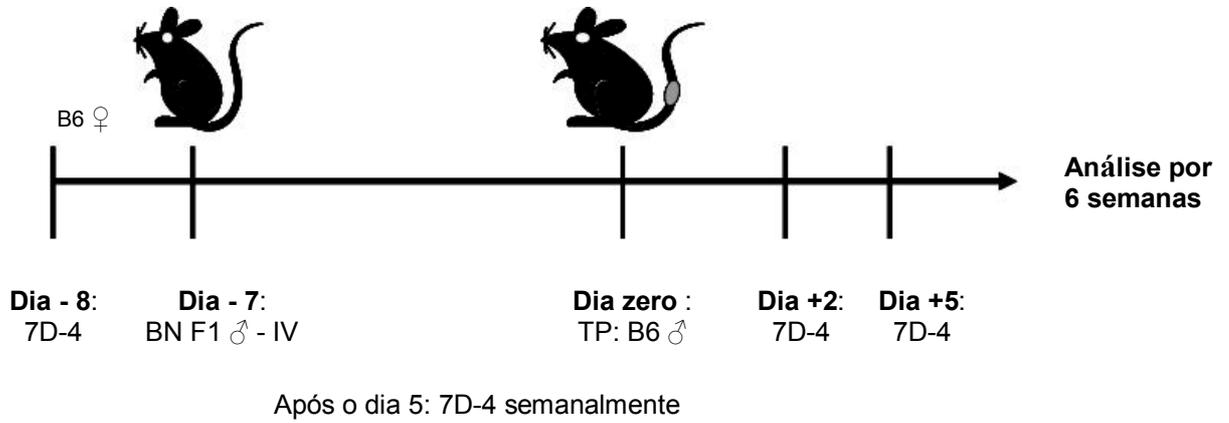
descrito por Fuchs & Matzinger em 1992, é mediado por supressão, realizou-se um experimento utilizando camundongos B6 fêmeas como receptores e B6 machos — não F1(bxd) — como fonte de células BN, e doadores do enxerto de pele. Neste caso, a única diferença antigênica entre doadores e receptores foi o antígeno H-Y, assim como nos experimentos descritos na literatura pelo grupo acima mencionado. Como se observa na figura 24-B, novamente, o tratamento com anti-CD25 foi capaz de quebrar a tolerância induzida por linfócitos B virgens. Na análise histopatológica das peles tolerizadas mediante o tratamento prévio com BN também se observou infiltrado linfocitário (figura 24-C).

Em ambos experimentos mencionados acima não se utilizou isotipo controle pela dificuldade de encontrar e purificar uma grande quantidade de imunoglobulina IgM. Porém o uso deste anticorpo na ausência de isotipo controle é muito usado e aceito em trabalhos da literatura.

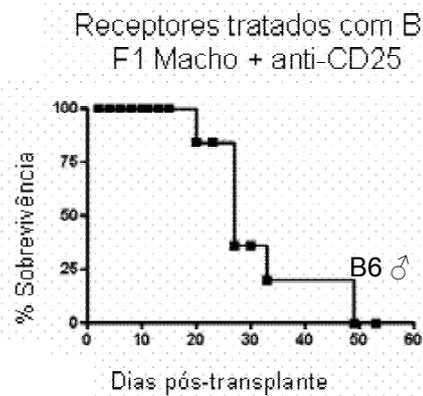
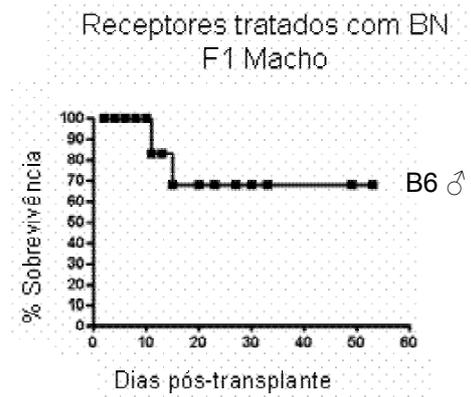
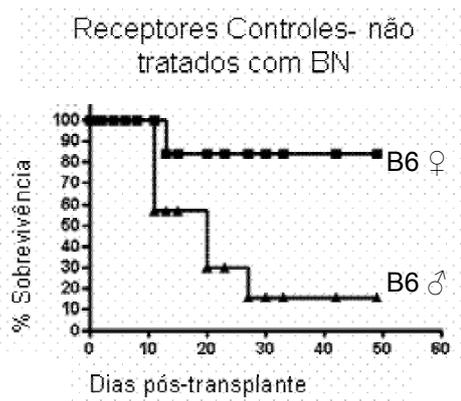
Tratamento com anti-CD25 bloqueia a tolerância mediada por células BN

A -

Protocolo

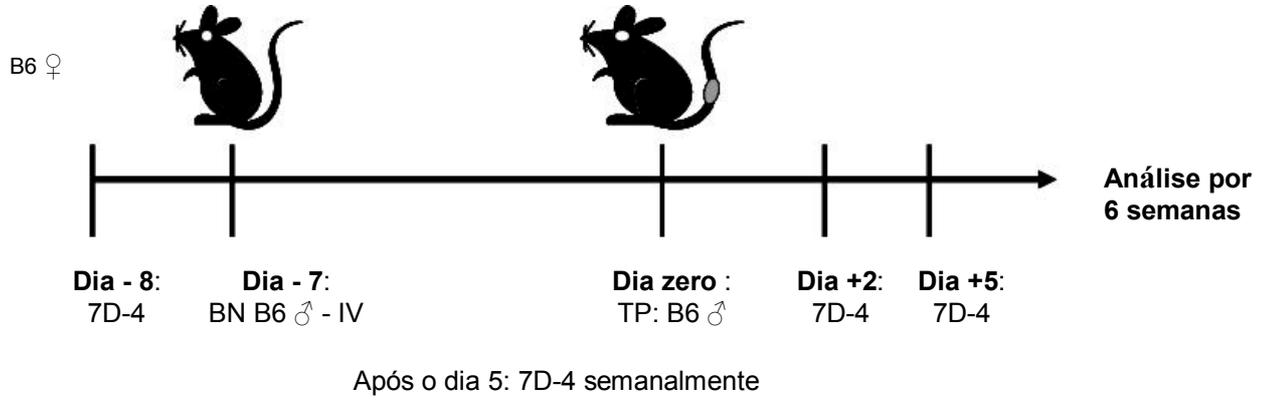


Sobrevivência dos Enxertos

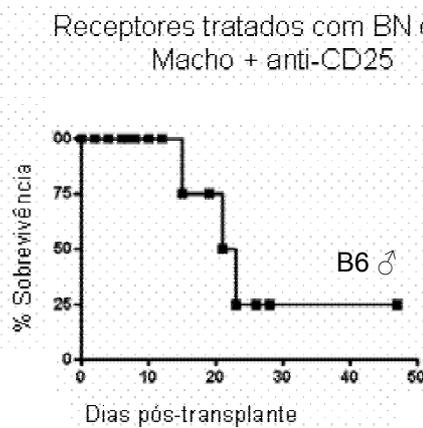
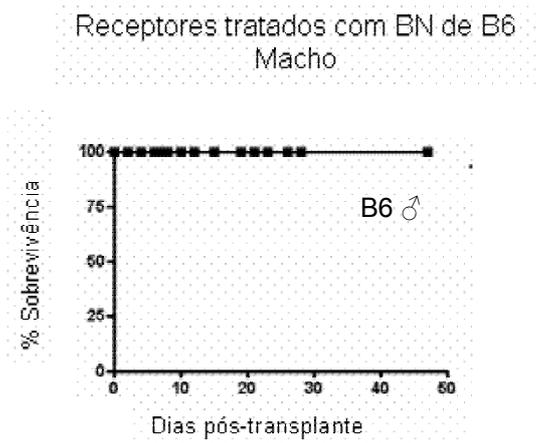
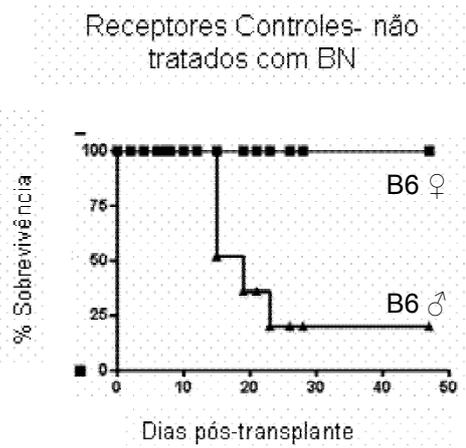


B -

Protocolo



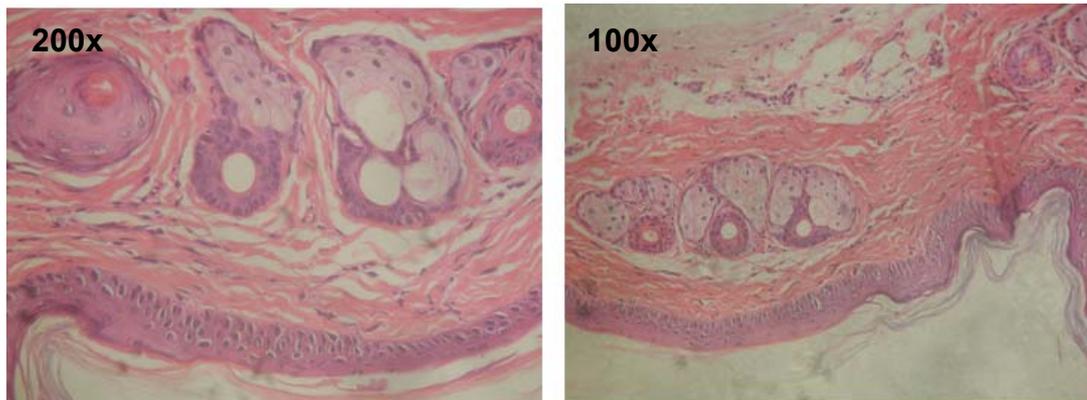
Sobrevivência dos Enxertos



C-

Análise histopatológica

Pele de B6 fêmea



Pele de B6 Macho transplantada em animal previamente tratado com B virgem de B6 macho.

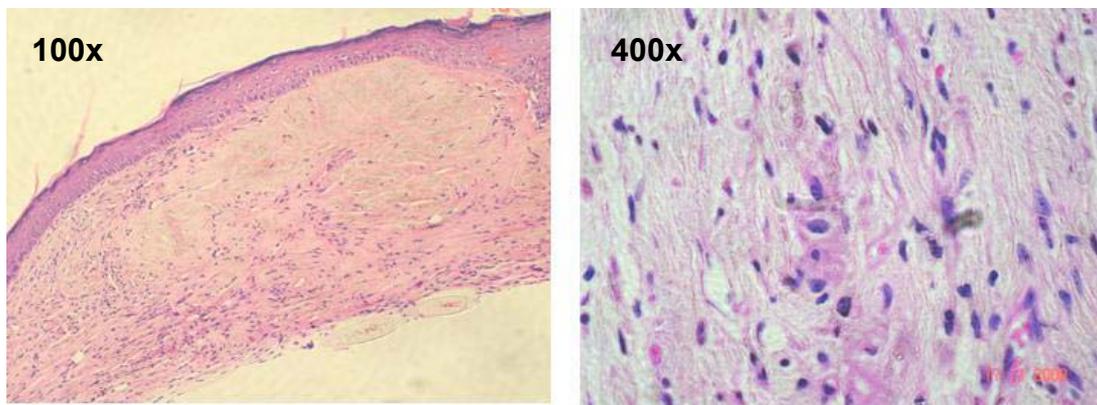


Figura 24. Tratamento com anticorpos anti-CD25 bloqueia a tolerância mediada por células BN. (A) Tratamento com 7D-4 reverte a tolerância ao antígeno H-Y no modelo de transplante de pele. Camundongos B6 foram tratados, com uma injeção IV de 10^7 células BN provenientes de camundongos F1(bxd) machos e após uma semana enxertados, na cauda, com pele de: B6 fêmea e B6 macho; ou somente de B6 macho. Um grupo de animais recebeu o tratamento com 7D-4 no dia -1, +2, +5 em relação ao transplante (dia zero) e posteriormente uma vez por semana até o final do experimento. Seis animais por grupo. O protocolo da figura ilustra o experimento teste que recebeu o anticorpo. **(B) Tolerância mediada por linfócitos BN é dependente de Treg em experimento idêntico ao descrito previamente na literatura.** Camundongos B6 foram tratados, com uma injeção IV de 10^7 células BN provenientes de camundongos B6 machos e após uma semana enxertados, na cauda, com pele de: B6 fêmea e B6 macho; ou somente de B6 macho. Um grupo de animais recebeu o tratamento com 7D-4 no dia -1, +2, +5 em relação ao transplante (dia zero) e posteriormente uma vez por semana até o final do experimento (esquemático no protocolo da figura). Quatro animais por grupo. **(C) Análise histopatológica das peles aceitas no controle (B6 fêmea) e de B6 macho de animais tratados com BN de B6 macho (figura 24-B).**

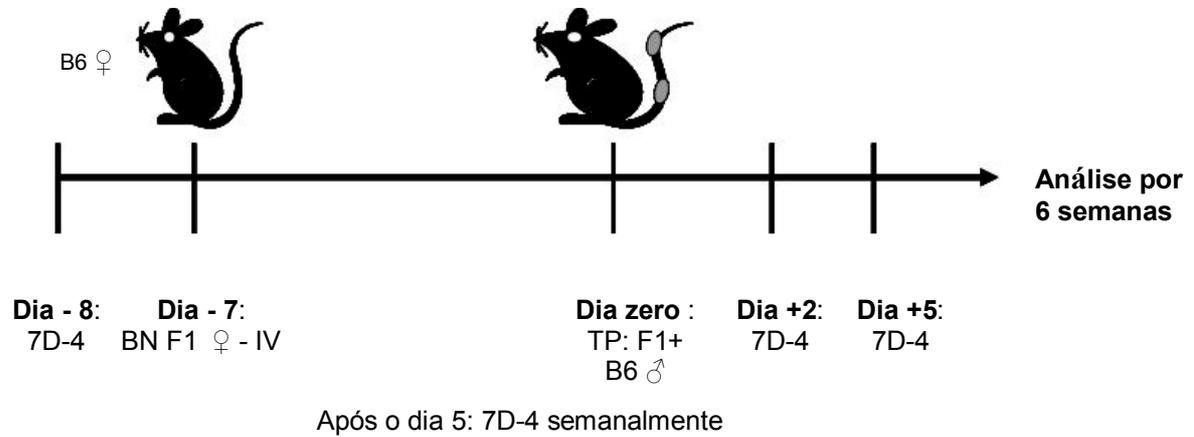
Estes dados confirmam que a tolerância ao H-Y observada no modelo de transplante de pele é mediada por células T regulatórias.

4.9 A tolerância ao antígeno H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea é bloqueada com 7D-4

Outro teste foi realizado para analisar se a situação descrita na figura 19 (tolerância a pele de B6 macho secundária ao transplante de pele de F1(bxd)) também pode ser quebrada pela adição do anticorpo anti-CD25. Para tal, camundongos B6 fêmeas foram tratados com célula BN de F1(bxd) fêmea. Após uma semana, esses animais foram transplantados na cauda com dois enxertos: um de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea. Novamente, um grupo de animais recebeu o tratamento com anti-CD25 no dia -1, +2, +5 em relação ao transplante (dia zero) e então semanalmente (figura 25). Os receptores que receberam o anticorpo rejeitaram ambos os transplantes, mostrando que a tolerância ao H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea era efeito da função supressora de células regulatórias.

A tolerância ao antígeno H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea é bloqueada com 7D-4

Protocolo



Sobrevivência dos enxertos

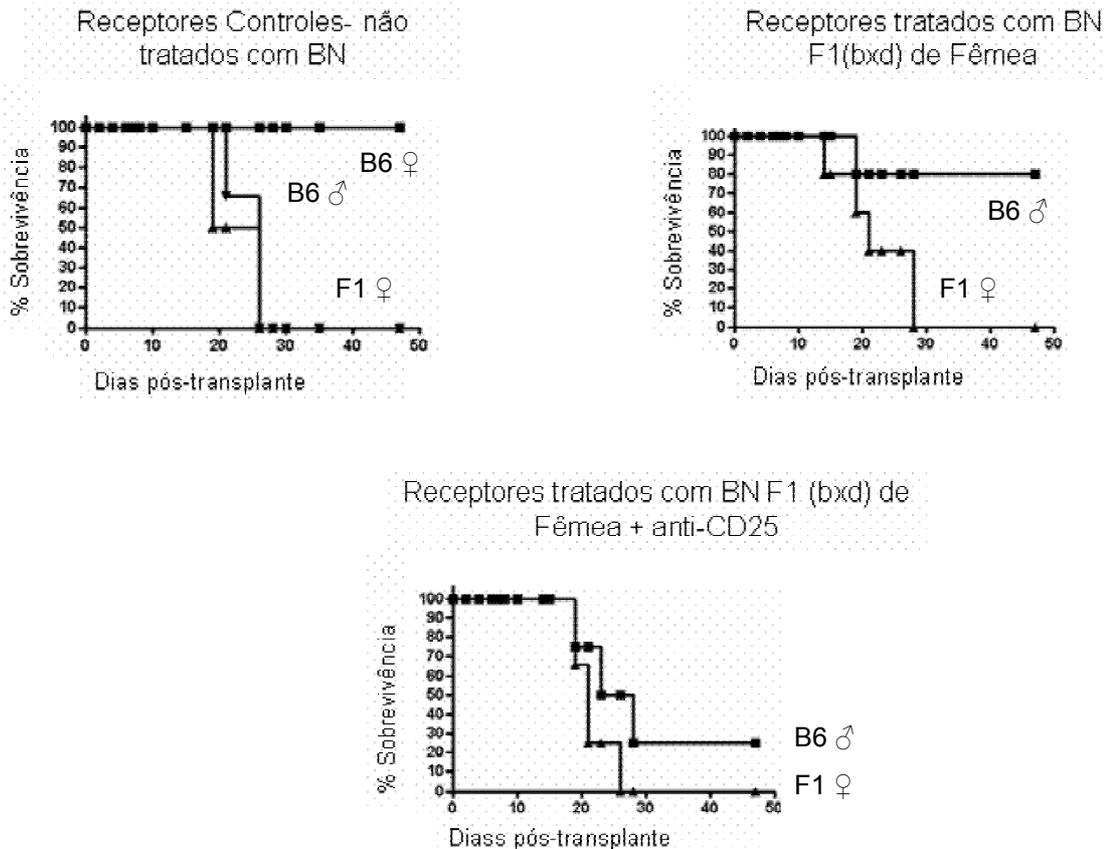


Figura 25. A tolerância ao antígeno H-Y secundária a pele de F1(bxd) fêmea é bloqueada com 7D-4. Camundongos B6 fêmeas foram tratados com BN de F1(bxd) fêmea. Após uma semana, estes animais foram transplantados, na cauda, com três enxertos: um de B6 fêmea, um de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea, ou dois enxertos: um de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea (como ilustrado na figura). Novamente, um grupo de animais recebeu o tratamento com 7D-4 anti-CD25 no dia -1, +2 e +5 em relação ao transplante (dia zero) e posteriormente, uma vez por semana até o final do experimento (esquemático no protocolo da figura). Cinco animais por grupo.

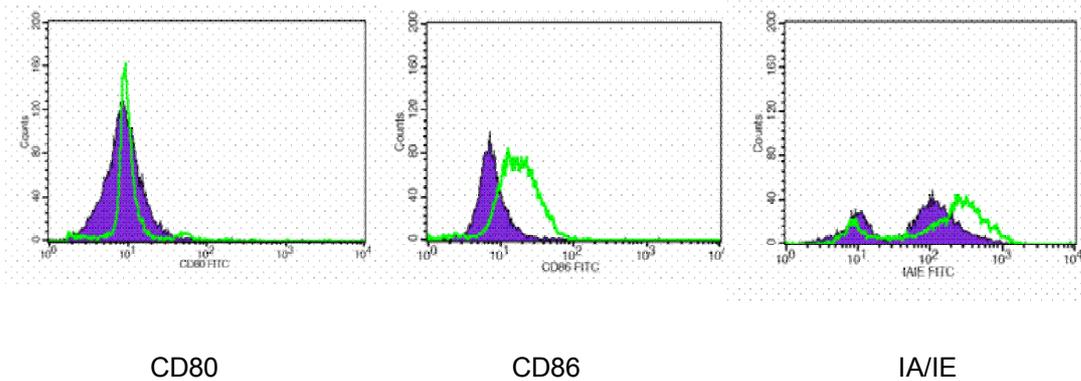
4.10 Linfócitos B ativados com LPS são incapazes de induzir tolerância no modelo de transplante de pele

Por último, verificou-se se mudanças na ativação dos linfócitos B influenciariam sua capacidade tolerogênica. Para responder tal questão, linfócitos B foram ativados com LPS e seu potencial tolerizante testado no modelo de transplante de pele. Primeiramente realizaram-se alguns testes para verificar a eficiência do método de ativação utilizado. Dentre esses controles, analisou-se o aumento de marcadores de ativação de linfócitos B por citometria de fluxo e ainda o potencial co-estimulatório destas células como estimuladores de uma MLR *in vitro*. Como se observa na figura 26-A, após a ativação com LPS houve um aumento relativo de expressão da molécula co-estimulatória CD86 e nas moléculas MHC classe II, sem alteração considerável nas moléculas CD80. Estes linfócitos mostraram-se ainda potentes estimuladores de uma MLR *in vitro* (figura 26-B).

Análise da eficiência do método utilizado para ativar os linfócitos

B virgens

A - Análise Imunofenotípica



B - Ensaio funcional para medir potencial coestimulatório dos linfócitos B ativado com LPS

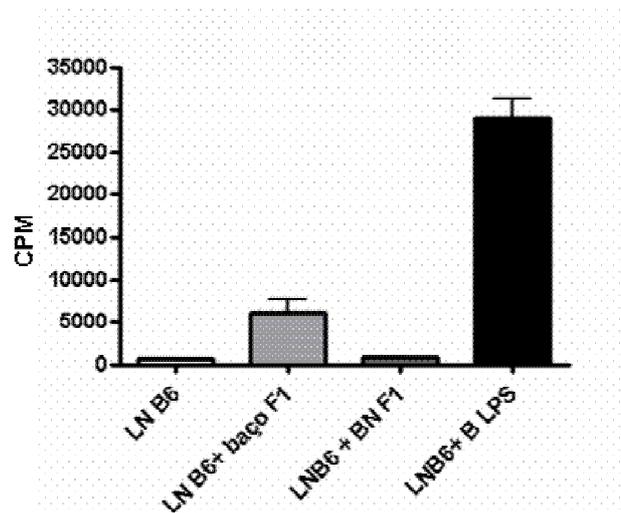
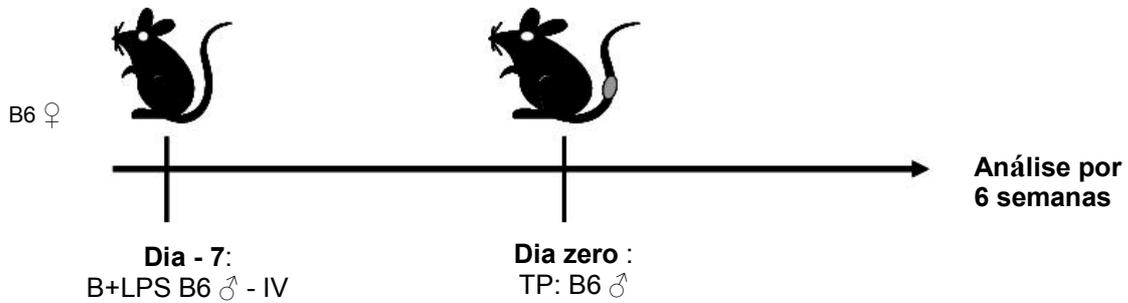


Figura 26. Análise da eficiência do método de ativação utilizado. Células B de camundongos F1(bxd) ou B6 foram purificadas e estimuladas com 15 µg/ml de LPS. A ativação destas células foi avaliada através do aumento da expressão de marcadores de ativação (por citometria de fluxo— sendo que em verde são as células ativadas com LPS e em roxo o controle com células BN) (A) e pelo potencial co-estimulador em uma MLR: Células T, de linfonodos mesentéricos de camundongos BALB/c (2×10^5) foram estimuladas *in vitro*, na presença de células BN; esplenócitos totais e células B ativadas com LPS, irradiadas e obtidas de camundongos B6 (4×10^5). A cultura foi mantida durante 5 dias e a proliferação foi avaliada por incorporação de timidina nas últimas 18 horas. A leitura do resultado feita por cintilação líquida de irradiação em contador β . Resultado representativo de 3 experimentos realizados em triplicata, no caso da letra B.

Uma vez padronizada a estimulação com LPS, analisou-se a capacidade destas células B ativadas na indução de tolerância a H-Y no modelo de transplante de pele. Assim, linfócitos BN de B6 macho foram purificados e ativados com LPS. Estas células foram infundidas em camundongos B6 fêmeas, que após uma semana receberam um enxerto de pele de animais B6 machos (Figura 27). Estes enxertos foram rejeitados, mostrando que a tolerância mediada por linfócitos B no modelo de transplante de pele é dependente do estado de ativação destes linfócitos.

**Linfócitos B ativados com LPS são incapazes de induzir tolerância
no modelo de transplante de pele**

Protocolo



Sobrevivência dos Enxertos

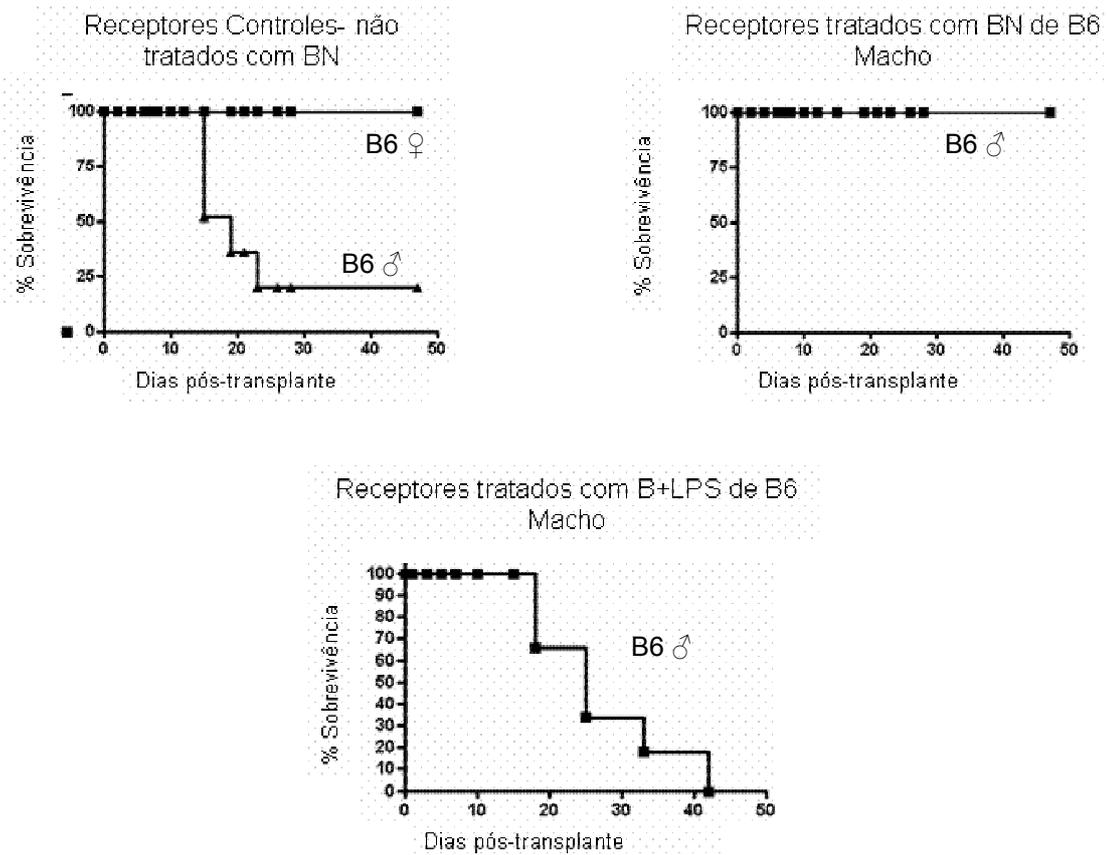


Figura 27. Linfócitos B ativados com LPS são incapazes de induzir tolerância no modelo de transplante de pele. Camundongos B6 foram tratados, com uma injeção IV de 10^7 células B virgens (BN) ou ativadas com LPS, provenientes de camundongos B6 machos, e após uma semana enxertados na cauda com pele de: B6 fêmea e B6 macho (controle); ou somente de B6 macho (4 animais por grupo). O protocolo esquematiza o grupo teste (B+LPS).

Reunindo as informações descritas acima, concluímos que os linfócitos B não induzem tolerância a antígenos alogênicos no modelo de transplante de pele, devido a complexidade da resposta mediada por antígenos. A resposta mediada por linfócitos BN é dependente de células T regulatórias $CD4^+CD25^+$ $Foxp3^+$, e da ativação destes linfócitos. Ainda, pode-se observar uma tolerância secundária, induzida por antígenos de F1(bxd), capaz de tolerizar a pele de B6 macho.

5- DISCUSSÃO

Os linfócitos B vêm sendo intensamente estudados como importantes moduladores da resposta imunológica. Como células apresentadoras, podem ativar ou tolerizar linfócitos T, participando da geração, regulação e tolerização da resposta imunológica. Nas últimas décadas, muitos grupos de pesquisadores têm-se empenhado no estudo da tolerância mediada pelos linfócitos B (Ryan, Gress e cols., 1984; Eynon & Parker, 1992; Fuchs & Matzinger, 1992, Seamons, Perchellet e cols., 2006; D'orazioand & Niederkorn, 1998; Ashour & Nierderkorn, 2006; Wu, Monsonego e cols., 2006; Tsitoura, Yeung e cols., 2002; Lei, Su e cols., 2005).

No início da década de 1990, surgiram dois trabalhos demonstrando que os linfócitos B virgens eram capazes de induzir tolerância periférica a antígenos relativamente “simples”. Eynon & Parker, relataram, em 1992, que os linfócitos B virgens eram capazes de induzir tolerância periférica em camundongos a proteínas solúveis capazes de se ligar especificamente às células B (Eynon & Parker, 1992). No mesmo ano Fuchs & Matzinger mostraram que a transferência endovenosa de células B virgens de animais machos para receptores fêmeas induz tolerância ao antígeno específico de macho — H-Y (Fuchs & Matzinger, 1992). Nessa ocasião, o mecanismo proposto para explicar esta indução de tolerância mediada por células B foi a anergia. Esta hipótese foi reforçada pela co-estimulação deficiente desses linfócitos (Liu & Janeway, 1991).

Sendo a anergia o mecanismo proposto para explicar a tolerância mediada pela célula B, questionou-se a possibilidade de indução de tolerância

a antígenos alogeneicos mediada por estas células. Os estudos relacionados com reconhecimento do próprio e não próprio sempre receberam destaque devido ao seu papel fundamental na rejeição de transplantes alogeneicos. A utilização de linfócitos B virgens para induzir tolerância a aloantígenos seria uma metodologia promissora, de simples utilização e específica.

Para testar tal hipótese, camundongos B6 foram tratados com injeção endovenosa de linfócitos BN provenientes de camundongos F1(bxd) machos. Após uma semana, estes animais receberam, na cauda, um enxerto de pele de B6 macho e um de F1(bxd) fêmea (Figura 14). Como esperado (previamente descrito na literatura de maneira muito semelhante — Fuchs & Matzinger, 1992), 90% dos animais tratados com BN de F1(bxd) macho foram tolerantes ao enxerto de B6 macho (Figura 14). Entretanto, o tratamento com BN de F1(bxd) não preveniu a rejeição dos enxertos provenientes de camundongos F1(bxd) fêmeas, apesar de aparentemente retardar a rejeição.

Relatos reportados na literatura mencionam tolerância tecido-específica no caso de transplantes alogênicos (Bonomo & Matzinger, 1993). Em 1993, esses autores, mostraram que quimeras de BALB/c NUDE que recebem estroma tímico de B6 aceitam enxertos de pele e rejeitam enxertos de baço desta mesma linhagem. Estas quimeras enxertadas com timo de B6 rejeitam o componente hematopoético, porém aceitam o componente epitelial do timo. No caso de um antígeno mais “simples” (H-Y), é sabido que tanto os linfócitos BN, quanto a pele provavelmente estão apresentando os mesmos epítomos, entretanto, tratando-se de uma resposta complexa, com antígenos variados, como no caso dos antígenos alogeneicos do MHC, é provável que exista uma diferença nos epítomos e antígenos apresentados nestas duas situações. Esta

hipótese foi derrubada ao se evidenciar que camundongos B6 previamente infundidos com linfócitos B virgens de F1 (bx_d) rejeitam linfócitos B de F1(bx_d) e transplante de baço na cápsula renal proveniente dos mesmos animais (figuras 18 e 15), apesar do repertório antigênico não ser exatamente idêntico nas células utilizada para tolerizar e para o teste, pois esplenócitos totais (cerca de 60% de células B) e células B totais (pureza em torno de 80%) foram usados para o teste enquanto a indução foi feita com BN. Esses experimentos sugerem que a inabilidade dos linfócitos BN em tolerizar uma resposta alogeneica à pele não é uma questão de especificidade tecidual, mas algo ligado à complexidade dos aloantígenos.

Tendo por base os dados acima mencionados, iniciou-se uma investigação mais profunda dos mecanismos utilizados pelas células B na indução ou não de tolerância a antígenos. Como mencionado anteriormente, relatos da literatura sugerem o envolvimento de mecanismos de supressão relacionados com a tolerância mediada por células B (Lei, Su e cols., 2005; Soukhareva, Jiang e cols., 2006; Apostolou, Sarukhan e cols., 2002; Suto Nakajima e cols., 2002; Reichardt, Dornbach e cols., 2007). Nossos resultados mostram a rejeição dos transplantes em uma situação na qual existe uma grande variabilidade antigênica e, conseqüentemente, a freqüência de clones de células respondedoras é alta. Sabe-se que tratando-se de células regulatórias, o efeito supressor é dependente de um equilíbrio adequado entre as células respondedoras e regulatórias (Almeida, Zaragoza e cols., 2006; Takahashi Kuniyasu cols., 1998, Thornton & Shevach, 1998). Baseado nestas informações, o próximo questionamento foi se o impedimento de gerar tolerância ao F1(bx_d) é devido a um limite quantitativo na capacidade de ativar

o mecanismo regulatório. Para responder a esta pergunta, utilizou-se células BN de camundongos F1(bxd) fêmea, na ausência do componente H-Y, na tentativa de maximizar a geração de tolerância aos antígenos alogeneicos, já que se observava um retardo na rejeição da pele semi-alogeneica quando os animais eram previamente tratados com BN, ainda que estatisticamente não significativo. Os dados da figura 19 mostram que a eliminação do antígeno H-Y não foi suficiente para induzir tolerância a pele do F1(bxd).

No entanto, surpreendentemente, receptores tratados com células BN de F1 fêmea e enxertados com os dois transplantes (B6 macho e F1(bxd) fêmea) **aceitaram o enxerto de B6 macho e rejeitaram o de F1(bxd) fêmea**, apesar de nunca terem tido contato com antígenos de macho. Por outro lado, como esperado os animais tratados da mesma maneira (BN de F1(bxd) fêmea) e transplantados com um único enxerto de B6 macho rejeitaram o enxerto. Os dados mostrados na figura 19 sugerem que por influência de algum estímulo fornecido pela pele de F1, ocorre a tolerância da pele do B6 macho.

O próximo passo foi estudar se a pele do F1(bxd), necessária para que haja tolerância do H-Y, funciona como um reestímulo específico ao estímulo tolerogênico. Para tal, camundongos B6 fêmeas foram tratados com células B virgens de **F1 (B6 x BALB/c) fêmeas** e transplantados com uma pele de **F1 (B6 x C3H) fêmea**, e uma pele de **B6 macho**. Nesta situação, as células utilizadas para induzir tolerância possuíam MHC alogeneico diferente da pele utilizada para o teste: BALB/c, H-2^b; C3H, H-2^k. Os receptores B6 fêmeas previamente tratados com células **BN de F1(B6 x BALB/c) fêmea** e enxertados com dois transplantes, um de **B6 macho** e um de **F1 (B6 x C3H) fêmea**, **rejeitaram os dois enxertos** (Figura 20). Estes dados mostram que,

para ocorrer a tolerância à pele de macho vislumbrada na situação descrita na figura 19, se faz necessária a presença de antígenos alogênicos semelhantes, no estímulo tolerogênico e na reestimulação.

Resumindo, para que ocorra o fenômeno de tolerância mediado pelas células B virgens, se faz necessário um estímulo antígeno-específico, fornecido, neste caso, pela pele de F1(B6xBALB/c) fêmea, evoluindo para uma tolerância secundária em relação ao estímulo tolerogênico, capaz de tolerizar ao transplante de B6 macho. Prosseguindo na investigação dos mecanismos envolvidos no fenômeno de tolerância mediada por linfócitos B virgens, fizemos uma análise histopatológica das peles transplantadas e aceitas. Ambas as peles, singeneica e de macho tolerizada, apresentaram estruturas teciduais íntegras, entretanto, nos enxertos de B6 macho tolerizados pelos linfócitos B virgens detectamos a presença de infiltrados linfocitários (figura 21). Este dado sugere um padrão de tolerância imunológica ativo. Pretendemos agora verificar quais são as células que fazem parte deste infiltrado. Tal verificação será realizada através de imuno-histoquímica que avaliará a presença de linfócitos CD3, CD4⁺Foxp3⁺ e CD4⁺Foxp3⁻. Isto proporcionará a análise da presença de Treg no infiltrado e, de maneira geral, permitirá observar a proporção entre células supressoras (CD4⁺Foxp3⁺) e efectoras (CD4⁺Foxp3⁻).

Baseados nas evidências descritas acima, que propõem um mecanismo de tolerância ativo, investigamos células Treg convencionais (CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), por serem as células regulatórias de mais fácil caracterização, nos animais tratados ou não com células BN. Procuramos saber como se encontrava o valor relativo e absoluto destas células nos linfonodos drenantes de animais tratados com estes linfócitos e desafiados com

os antígenos determinados (H-Y ou aloantígenos). O valor relativo destas células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ não se mostrou alterado nos animais tratados ou não com BN (figuras 22 e 23). No entanto o número total de células dos linfonodos drenantes dos camundongos previamente tratados com células B virgens apresentou valores menores quando comparados ao controle não tratado (figuras 22 e 23). Estes dados mostram que existe algum sinal bloqueando a proliferação celular nos animais que recebem BN e este estímulo não é dependente de um aumento percentual de células regulatórias presentes no linfonodo. Os fatos indicam uma inibição relacionada a uma potenciação na função das Treg mediada por linfócitos B virgens. Foi feito então um teste para analisar a função destas células Treg presentes nos LN dos animais tratados ou não com BN. Para tal, realizamos um ensaio de supressão *in vitro* utilizando-se camundongos Marylin $RAG^{-/-}$ tratados com células B virgens de F1(bxd) macho e desafiados no coxim plantar com esplenócitos de B6 macho. Os dados da figura 23-B mostram que as células obtidas dos linfonodos drenantes dos camundongos tratados com linfócitos BN foram capazes de suprimir aproximadamente 50% da proliferação das células respondedoras presentes na cultura. O mesmo não foi observado com células de linfonodo de camundongos não tratados. Estes dados sugerem um papel estimulatório dos linfócitos BN, sobre as Treg, possibilitando um aumento na sua capacidade de suprimir uma resposta. O fato de as células Treg aperecerem em animais $RAG^{-/-}$, que não geram células T regulatórias intratimicamente, aponta para a geração das mesmas na periferia. No entanto vale ressaltar que animais apenas imunizados possuem um número de Treg similar aos tratados com BN, sugerindo não ser uma atribuição da BN gerar estes linfócitos supressores,

mas provavelmente ativá-los. Os mecanismos moleculares que definem quais são os sinais fornecidos às células T regulatórias ainda precisam ser definidos. A análise do perfil de citocinas no local do enxerto e no linfonodo drenante também pode ser bastante interessante na caracterização dos sinais fornecidos pelos linfócitos B. Ainda precisamos avaliar a participação de outras subpopulações de células T regulatórias. Estudos revelam a participação de linfócitos B na geração de células T $CD4^+CD25^-$ e, mais recentemente, $Foxp3^-$. Estas células não foram investigadas neste trabalho devido a restrições metodológicas para acessá-las (Apostolou, Sarukhan e cols., 2002; Hansen, Westendor e cols., 2007).

A análise dos dados mencionados até este momento sugere que a tolerância mediada por linfócitos B virgens seja um fenômeno ativo, muito possivelmente dependente de células T regulatórias: rejeição da pele em resposta a muitos antígenos, onde, provavelmente, não se consegue alcançar equilíbrio entre células respondedoras e supressoras; presença de infiltrado celular nas peles aceitas de receptores tratados com células B virgens e ainda aumento de função supressora nos linfonodos drenantes de animais previamente tratados com BN e desafiados com os mesmos antígenos. Sendo assim, o passo seguinte foi verificar a necessidade da presença de células T regulatórias funcionais para que ocorra a tolerância induzida por células B virgens. Para esclarecer esta questão, utilizamos anticorpos monoclonais anti-CD25 (7D-4), bloqueadores da função efetora destas células (Kohm, Macmahon e cols., 2006) (figura 24). O tratamento com anti-CD25 reverteu a tolerância induzida pelos linfócitos B. Este resultado foi extremamente esclarecedor, demonstrando que a tolerância mediada por células B virgens é

dependente, *in vivo*, no modelo de transplante de pele, de células regulatórias funcionais (figura 28).

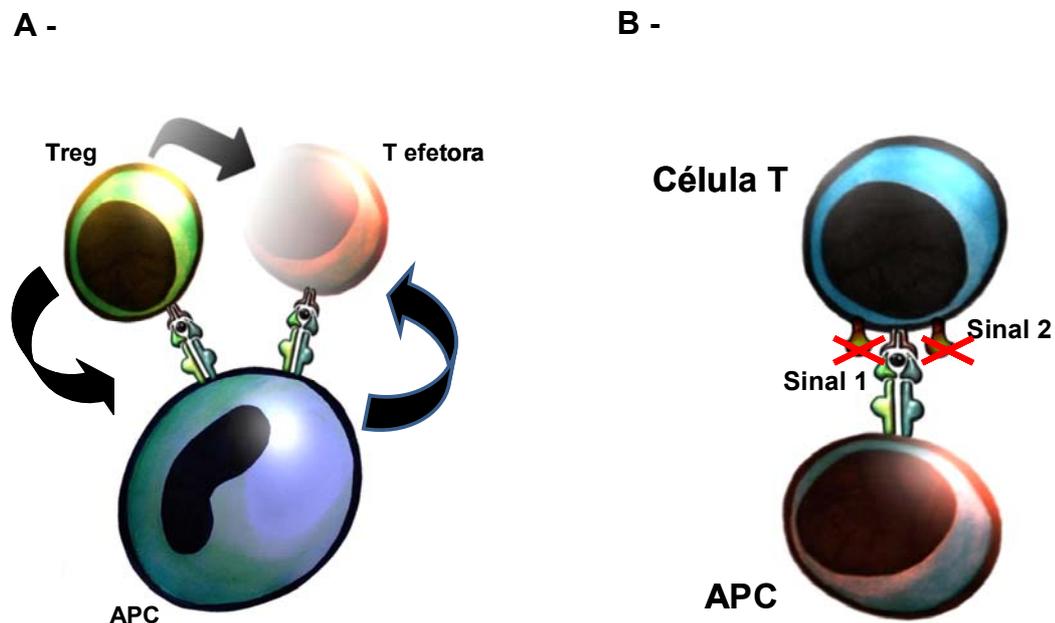


Figura 28. A tolerância mediada pelos linfócitos B virgens é dependente de células T regulatórias. Os dados relatados neste trabalho mostram que a tolerância imunológica dependente de linfócitos B virgens envolve processos ativos de supressão, com a participação de células T regulatórias. Sobre o mecanismo, ainda não é claro, sabe-se que ocorre uma potenciação na função supressora destas células, entretanto, se isto se deve a um estímulo direto fornecido pelas células B ou indireto pela sinalização por outras células apresentadoras de antígenos, ainda não temos conhecimento. O fenômeno de anergia ilustrado na letra B foi a principal explicação para este fenômeno de tolerância na época de sua descrição. Esta explicação não pode ser descartada. A falta de co-estimulação, dos linfócitos B virgens, pode influenciar na sinalização das células Treg, mas este fato precisa ser investigado mais profundamente. (Modificado de ilustrações de Real F.).

A partir desses dados, realizamos um teste idêntico ao descrito previamente na literatura para confirmar que o mecanismo utilizado pelos linfócitos B virgens na indução de tolerância ao enxerto de pele de macho relatado por Fuchs & Matzinger em 1992 é dependente de Treg e não de anergia, ou pelo menos não somente de anergia. Apesar de usarmos um sistema similar, em nosso caso a célula BN foi proveniente de F1(bxd) macho e

no modelo previamente descrito, de B10 macho, sendo os hospedeiros B6 fêmea ou B10 fêmea respectivamente. No nosso modelo, o estímulo tolerogênico carrega, além do H-Y, antígenos alogênicos provenientes do BALB/c, já no de Fuchs & Matzinger o único antígeno diferente entre doador e receptor é o H-Y (Fuchs & Matzinger, 1992). Se as Treg são realmente críticas na indução de tolerância por células B, a eliminação de Treg funcionais deveria inibir a tolerância também no modelo de Fuchs & Matzinger. De fato, o tratamento com anti-CD25 de B6 fêmeas tratadas com BN de B6 macho impede a aceitação da pele do macho, ao contrário do que acontece nos animais que não recebem o anticorpo (figura 24-B).

Demonstrado que a indução de tolerância por linfócitos BN é mediada por mecanismos de supressão, investigamos se a deficiência de atividade co-estimulatória destas células influencia sua capacidade tolerogênica. Para responder tal questão, linfócitos B foram ativados com LPS e seu potencial tolerizante testado no modelo de transplante de pele. Estes enxertos foram rejeitados, mostrando que a tolerância mediada por linfócitos B no modelo de transplante de pele é dependente do estado de ativação destes linfócitos (figura 27). Este dado foi bastante curioso, pois relatos da literatura mostram que linfócitos B transgênicos ativados com LPS podem ser utilizados como fonte de células tolerogênicas. Alguns definem ainda que esta tolerância é mediada por células regulatórias (Lei, Su e cols., 2005; Soukhareva, Jiang e cols., 2006). O modelo analisado nestes casos não foi o transplante de pele. O fato de usarem células B modificadas pode influenciar nos sinais e mecanismos relacionados à tolerância.

Vale discutir se existe relação entre a ausência de co-estimulação dos linfócitos BN, que leva à anergia de um linfócito T, e a tolerância mediada por células BN que mostrou-se dependente de Treg. Sabe-se que quando um linfócito T recebe um sinal completo de ativação, o mesmo forma um forte complexo composto pelas moléculas NFAT (*nuclear factor of activating T cells*) e AP-1 (*Fos-Jun*) que induzem a expressão de outros genes relacionados à ativação celular (Rao, Luo e cols., 1997). Por outro lado, se este linfócito T recebe um sinal de ativação parcial, incompleto, o NFAT desencadeia a expressão de genes AP-1 independentes que promovem reguladores negativos de ativação a este linfócito, induzindo a anergia (Heissmeyer, Macián e cols., 2004; Heissmeyer & Rao, 2004.; Macian, García-Cózar e cols., 2002). A molécula Foxp3 reprime as transcrições gênicas dependentes da ligação NFAT:AP-1 e sua ligação ao NFAT bloqueia a produção de IL-2, e aumenta a expressão de CTLA-4 e CD25. Sendo assim, o fator de transcrição NFAT direciona dois programas biológicos totalmente distintos: ativação e tolerância dos linfócitos T (Wu, Borde e cols., 2006). Podemos sugerir que as células B ativadas com LPS estariam fornecendo um sinal completo de ativação aos linfócitos T, induzindo a ligação NFAT:AP-1, responsáveis pela transcrição de genes de ativação, o que leva à geração de resposta imunológica responsável pela rejeição do transplante de pele vislumbrada na figura 27. Já a célula B virgem forneceria uma ativação incompleta às células T, incapaz de gerar o complexo NFAT:AP-1, propiciando a indução de células anérgicas e aumentando a probabilidade da ligação NFAT:Foxp3, o que induziria células regulatórias, que por sua vez, podem ser células anérgicas (Shevach, 2000).

Sabendo-se que a tolerância dependente de células B virgens é mediada por células T regulatórias, investigamos a influência destas Treg na tolerância secundária observada nos receptores tratados com linfócitos B virgens de F1(bxd) fêmea e enxertados com duas peles, uma de B6 macho e uma de F1(bxd) fêmea (figura 19). Esta análise ocorreu através da realização de um experimento como o descrito na figura 19, porém um grupo de animais recebeu o tratamento com anticorpos anti-CD25. Este grupo de camundongos rejeitou ambos os enxertos, de B6 macho e F1 fêmea (figura 25), mostrando que o fenômeno observado foi efeito da função supressora de células regulatórias.

Aprofundando um pouco esta questão, no caso acima mencionado (figuras 19 e 25), observou-se uma tolerância ao H-Y na ausência total de exposição prévia a este antígeno. As células apresentadoras da pele de F1 fêmea não apresentam o antígeno H-Y, mas sua presença é indispensável para que ocorra a tolerância do enxerto de pele de B6 macho. Provavelmente os linfócitos B virgens fornecem um sinal inicial que possibilita uma pré-ativação das células T regulatórias. Estas células, por sua vez, seriam ativadas especificamente pelo enxerto de pele. Algumas sugestões podem ser analisadas em relação aos processos envolvidos neste fenômeno. Estas células supressoras precisam ser expostas a um segundo estímulo no local de ação (provavelmente no linfonodo drenante ao tecido desafiado). O principal ponto a ser discutido neste momento é de que forma ocorre a estimulação, que leva a uma tolerância secundária a um antígeno nunca antes visto. (figura 29). Existem algumas hipóteses:

I – Uma opção poderia ser as células dendríticas do hospedeiro, presentes no linfonodo drenante do local desafiado (local que recebeu o enxerto) processarem antígenos de ambas as peles – F1(bxd) fêmea e B6 macho. Uma vez que estas apresentadoras entram em contato com células T regulatórias específicas para antígenos de BALB/c e tornem-se células apresentadoras com potencial inibidor da resposta, poderiam “desligar” linfócitos efetores, ou ativar células regulatórias específicas para o antígeno de macho. Sabe-se que a célula regulatória pode agir sobre a APC, tornando-a inibitória (Dipaolo, Brinster e cols., 2007; Tang, Adams e cols, 2006) (figura 29-I).

II – Outra possibilidade seria as células apresentadoras de antígenos da pele de F1(bxd) captarem e apresentarem antígenos de B6 macho no linfonodo drenante aos enxertos. Novamente, se estas APC entrarem em contato com células Treg específicas para BALB/c, estas células regulatórias poderiam induzir células dendríticas inibitórias, que por sua vez, ativariam células Treg específicas para H-Y e inibiriam a resposta efetora para este antígeno (figura 29-II).

III – Por fim, como uma terceira hipótese, células T regulatórias específicas para antígenos de BALB/c poderiam inibir células dendríticas do enxerto de pele de F1. Esta APC que apresenta antígenos próprios (de B6) e alogênicos (de BALB/c) poderia ativar Treg específicas para ambos os antígenos. Uma célula Treg específica para antígenos de B6 pode ser ativada nesta APC de F1(bxd) e, posteriormente, atuar sobre uma célula apresentadora do hospedeiro (que apresenta antígenos H-Y, próprios e alo) ou da pele de B6

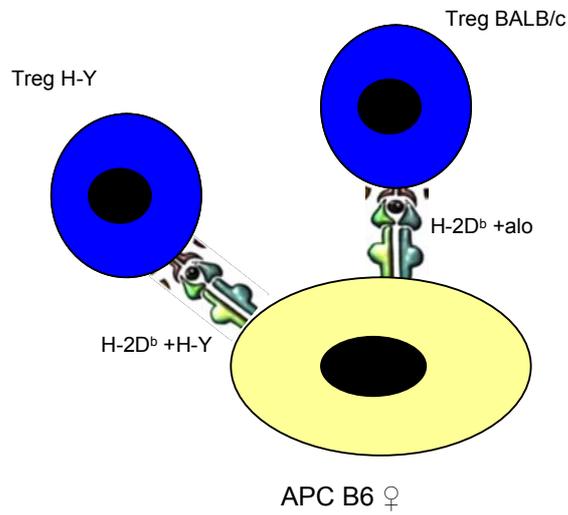
macho (que apresenta antígenos H-Y e próprios), podendo agora inibir a resposta ao H-Y (figura 29-III).

As questões acima mencionadas não são excludentes, ou seja, todos estes processos podem estar acontecendo no linfonodo. Estas situações estão correlacionadas com os experimentos de Alpan, Bachelder e cols, 2004, que visualizam indução de tolerância a dois diferentes antígenos apresentados pela mesma célula apresentadora estimulada com linfócitos T tolerogênicos específicos para apenas um dos antígenos. Em seu modelo utilizam camundongos transgênicos com linfócitos T específicos para OVA e citocromo C de pombo (PCC). Estes animais são alimentados oralmente com o antígeno de OVA e seus linfócitos, quando em contato *in vitro*, com uma APC, previamente pulsada com peptídeos de ovalbumina e PCC, “educam” esta célula a tolerizar linfócitos T específicos para ambos os antígenos, ainda que os linfócitos específicos para PCC não tivessem tido o contato prévio com o seu antígeno. Para que o fenômeno ocorra é preciso que ambos os antígenos estejam na mesma APC (Alpan, Bachelder e cols., 2004).

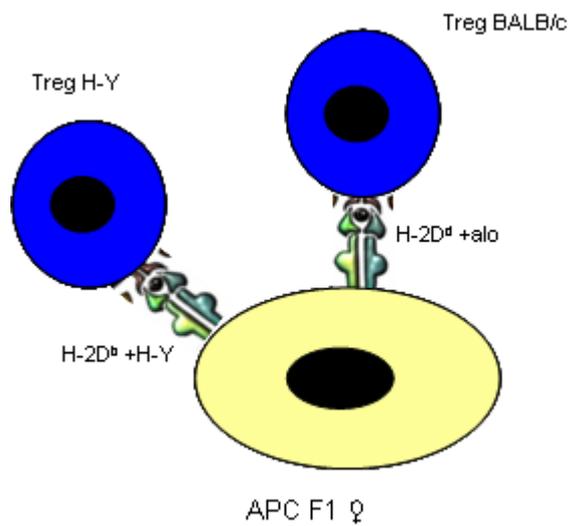
Nas situações I, II e III os linfócitos T precisam reconhecer os antígenos sobre uma mesma APC. Se isto ocorre simultaneamente, é provável que seja por ação Treg-T efetora (o que não exclui Treg-APC-T efetora); se não ocorre simultaneamente, é provável que seja dependente apenas da APC. Para testar a veracidade destas hipóteses pretendemos realizar os dois transplantes, B6 macho e F1(bxd) fêmea, em locais distintos, com diferentes linfonodos drenantes. Nossa idéia é realizar um enxerto na cauda e um no dorso dos camundongos B6 fêmeas receptoras. Além disso, os dados da figura 20 mostram que, para que ocorra esta tolerância do antígeno de macho

secundária ao enxerto de pele de F1(bxd), se faz necessária a presença do mesmo componente alogeneico na pele e no estímulo tolerogênico, confirmando o importante papel do antígenos alogeneicos de BALB/c neste fenômeno. A estimulação mediada por outro antígeno alogeneico F1(bxk), onde apenas a parte *self* se mantém em ambos os estímulos, não é suficiente para a visualização do fenômeno.

I – Células dendríticas do hospedeiro processam e apresentam antígenos de ambas as peles.



II – Células dendríticas do enxerto de pele de F1(bxd) processam e apresentam antígenos de ambas as peles.



III – Tolerância mediada por Treg específica para *self* ativada em APC de F1(bxd).

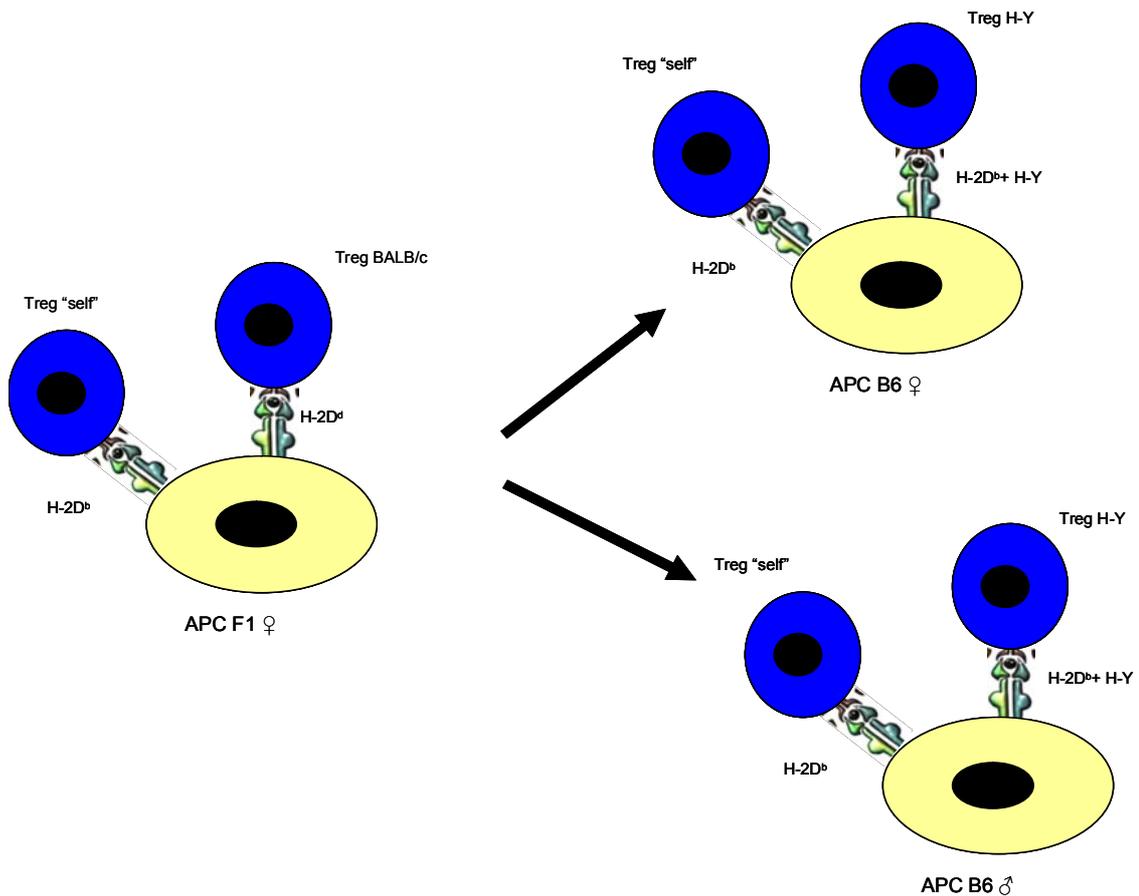


Figura 30. Possíveis mecanismos de indução de tolerância à pele de B6 macho após tolerância com B virgem de F1 Fêmea. I – Células dendríticas do hospedeiro, presentes no linfonodo drenante do local desafiado, processariam antígenos de ambas as peles (F1(bxd) fêmea e B6 macho). Uma vez que estas apresentadoras entrassem em contato com células T regulatórias específicas para antígenos de BALB/c e tornar-se-iam células apresentadoras com potencial inibidor da resposta, podendo “desligar” linfócitos efetores, ou ativar células regulatórias específicas para o antígeno de macho. II – células apresentadoras de antígenos da pele de F1(bxd) captariam e apresentariam antígenos tanto de BALB/c, quanto de B6 macho. Novamente, se estas APC entrarem em contato com células Treg específicas para BALB/c, estas células regulatórias poderiam induzir células dendríticas inibitórias que, por sua vez, ativariam células Treg específicas para H-Y e inibiriam a resposta efetora para este antígeno. III – células T regulatórias específicas para antígenos de BALB/c poderiam inibir células dendríticas do enxerto de pele de F1. Esta APC que apresenta antígenos próprios e alogênicos poderia ativar Treg específicas para ambos os antígenos. Uma célula Treg específica para antígenos de B6 poderia ser ativada nesta APC de F1(bxd) e posteriormente atuar sobre uma célula apresentadora do hospedeiro (que apresenta antígenos H-Y, próprios e alo) ou da pele de B6 macho (que apresenta antígenos H-Y e próprios), podendo então inibir a resposta ao H-Y.

De uma forma geral, podemos sugerir com os dados apresentados neste trabalho, que os linfócitos B virgens estariam influenciando de alguma forma (através de algum tipo de pré-ativação) a população de células T regulatórias. Estas células, por sua vez, seriam ativadas especificamente pelo enxerto de pele. Para que ocorra a tolerização desta pele se faz necessário um equilíbrio adequado entre as células efectoras e regulatórias. Provavelmente, esta seria a razão pela qual observamos a rejeição do transplante de F1, enquanto o de B6 macho é aceito.

6. CONCLUSÕES

- Linfócitos B não induzem tolerância a antígenos alogeneicos no modelo de transplante de pele.
- A incapacidade dos linfócitos BN de induzirem tolerância a antígenos alogeneicos não é dependente da diferença antigênica entre o estímulo indutor e o teste.
- O fenômeno de tolerância ao antígeno H-Y pode ser secundário à tolerância induzida por antígenos F1(bxd) e ao enxerto de pele do mesmo.
- A tolerância mediada pelos linfócitos BN é um processo ativo mediado por células Treg.
- No modelo estudado, a tolerância por linfócitos B virgens é dependente do estado de ativação destas células. Células B ativadas com LPS são incapazes de realizar o fenômeno.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alegre M.L., K.A. Frauwirth, e cols. (2001) "T-cell regulation by CD28 and CTLA-4". Nat Rev Immunol, **1**(3):220-8.

Alpan O., E. Bachelder, e cols. (2004) "Educated dendritic cells act as messengers from memory to naive T helper cells". Nat Immunol, **5**(6):615-22.
Epub 2004 May 23.

Alferink J., A Tafuri, e cols. (1998) "Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking". Science, **282** :1338-41.

Almeida A.R., B. Zaragoza, e cols. (2006) "Indexation as a novel mechanism of lymphocyte homeostasis: the number of CD4+CD25+ regulatory T cells is indexed to the number of IL-2-producing cells". J Immunol, **77**(1):192-200.

Aluvihare V.R., A.G. Betz, (2006) "The role of regulatory T cells in alloantigen tolerance". Immunol Rev, **212**:330-43. Review.

Anderson B.E., J. McNiff, e cols. (2003) "Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease". J Clin Invest, **112**(1):101-8.

Anderson G, N.C. Moore, e cols. (1996) "Cellular interactions in thymocyte development". Annu.Rev.Immunol, **14** :73-99.

Appleman, L. J. & V. A. Boussiotis, (2003). "T cell anergy & costimulation." Immunol Rev. **192**: 161-80.

Apostolou I. & H. von Boehmer. (2004) "In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells". J Exp Med, **199**(10):1401-8.

Apostolou I., A. Sarukhan, e cols. (2002) "Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen". Nat Immunol. **3**(8):756-63.

Ashour H.M & J.Y. Niederkorn (2006) "Peripheral tolerance via the anterior chamber of the eye: role of B cells in MHC class I and II antigen presentation". J Immunol, **15**;176(10):5950-7.

Ashwell, J. D., C. Chen, e cols. (1986) "High frequency & nonrandom distribution of alloreactivity in T cell clones selected for recognition of foreign antigen in association with self class II molecules". Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), **136**(2): 389-95.

Barcinski M.A. & A.S. Rosenthal. (1977) "Immune response gene control of determinant selection. I. Intramolecular mapping of the immunogenic sites on insulin recognized by guinea pig T and B cells". J Exp Med, **145**(3):726-42.

Benichou, G., A. Valujskikh, e cols. (1999) "Contributions of direct & indirect T cell alloreactivity during allograft rejection in mice". Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950), **162**(1): 352-8.

Blazar, B. R., P. A. Taylor, e cols. (1998) "CD4(+) T cells tolerized ex vivo to host alloantigen by anti-CD40 ligand (CD40L:CD154) antibody lose their graft-versus-host disease lethality capacity but retain nominal antigen responses." J Clin Invest, **102**(3): 473-82.

Brunkow M.E., E.W. Jeffery, e cols. (2001) "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurf, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse". Nat Genet, **27**:68-73.

Bonomo, A. & P. Matzinger (1993) "Thymus epithelium induces tissue-specific tolerance." J Exp Med, **177**(4): 1153-64.

Bourgeois, C., B. Rocha, e cols. (2002) "A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory". Science, **297**(5589): 2060-3.

Caramalho, I., T. Lopes-Carvalho, e cols. (2003). "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors & are activated by lipopolysaccharide". J Exp Med, **197**(4): 403-11.

Caramalho I., T. Lopes-Carvalho e cols. (2003) "Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide". J Exp Med **197**(4):403-11.

Chen B.J., X. Cui, e cols. (2004) "Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease". Blood, **103**(4):1534-41.

Chen W., W. Jin, e cols.(2003) "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3". J Exp Med, **198**(12):1875-86.

Curotto de Lafaille M.A., A.C. Lino, e cols. (2004) "CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion". J Immunol, **173**(12):7259-68.

DiPaolo R.J., C. Brinster, e cols. (2007) "Autoantigen-specific TGFbeta-induced Foxp3+ regulatory T cells prevent autoimmunity by inhibiting dendritic cells from activating autoreactive T cells". J Immunol, **179**(7):4685-93.

D'Orazio T.J. & J.Y. Niederkorn. (1998) "Splenic B cells are required for tolerogenic antigen presentation in the induction of anterior chamber-associated immune deviation (ACAID)." Immunology, **95**(1):47-55.

Eynon, E. E. & D. C. Parker (1992). "Small B cells as antigen-presenting cells in the induction of tolerance to soluble protein antigens". The Journal of Experimental Medicine, **175**(1): 131-8.

Fantini M.C., C. Becker, e cols. (2004) "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7". J Immunol, **172**(9):5149-53.

Fisson S., G. Darrasse-Jeze, e cols. (2003) "Continuous activation of autoreactive CD4+ CD25+ regulatory T cells in the steady state". J Exp Med, **1**: 737-46.

Fontenot J.D., M.A. Gavin, e cols. (2003) "Foxp3 programs the development and function of CD4+ CD25+ regulatory T cells." Nat.Immunol., **4**,330-336.

Fontenot J.D., J.P. Rasmussen, e cols. (2005). "Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3". Immunity, **22**:329-341.

Fuchs, E. J. & P. Matzinger (1992). "B cells turn off virgin but not memory T cells." Science, **258**(5085): 1156-9.

Gershon R.K. & K. Kondo (1970) "Infectious immunological tolerance." Immunology, **18**:723-35.

Gondek D.C., F. Lu, e cols (2005) "Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism". J Immunol, **174**(4):1783-6.

Greenwald R.J., V.A. Boussiotis, e cols. (2001) "CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo." Immunity, **14**(2):145-55.

Guinan, E. C., V. A. Boussiotis, e cols. (1999). "Transplantation of anergic histoincompatible bone marrow allografts." N Engl J Med, **340**(22): 1704-14.

Hansen W., A.M. Westendor, e cols. (2007) "Chronic Antigen Stimulation In Vivo Induces a Distinct Population of Antigen-Specific Foxp3 CD25 Regulatory T Cells". J Immunol, **179**(12):8059-68.

Heath W.R. & F.R. Carbone (2001) "Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance". Nat Rev Immunol, **1**(2):126-34. Review

Heissmeyer V., F. Macián, e cols. (2004) "Calcineurin imposes T cell unresponsiveness through targeted proteolysis of signaling proteins". Nat Immunol, **5**(3):255-65.

Heissmeyer V. & A. Rao (2004) "E3 ligases in T cell anergy--turning immune responses into tolerance". Sci STKE, (241):pe29. Review.

Hori S., T. Nomura e cols. (2003) "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3". Science, **299** :1057-61.

Horwitz D.A., S.G. Zheng, e cols. (2003) "The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4+ CD25+ and CD8+ regulatory T cell subsets". J Leukoc Biol, Oct;74(4):471-8. Review.

Hogquist K.A., S.C. Jameson, e cols. (1994) "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection". Cell, **76**:17-27.

Hsieh C.S, Y. Liang, e cols. (2004) "Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25+ CD4+ T cell receptors". Immunity **21**:267-77.

Janeway C.A. Jr. & R. Medzhitov (2002) "Innate immune recognition". Annu Rev Immunol, **20**:197-216. Review

Jenkins, M. K. & R. H. Schwartz (1987) "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro & in vivo T-cell unresponsiveness in vivo & in vitro: fine specificity of induction & molecular characterization of the unresponsive state". J Exp Med, **165**(2): 302-19.

Jordan, M. S., A. Boesteanu, e cols. (2001) "Thymic selection of CD4+CD25+ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide". Nat Immunol, **2**(4): 301-6.

Kappler, J. W., N. Roehm, e cols. (1987) "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus". Cell, **49**(2): 273-80.

Karim M., G. Feng, e cols. (2005) "CD25+CD4+ regulatory T cells generated by exposure to a model protein antigen prevent allograft rejection: antigen-specific reactivation in vivo is critical for bystander regulation". Blood. **105**(12):4871-7.

Kim J.M, A. Rudensky (2006) "The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells". Immunol Rev, **212**:86-98. Review.

Khattari R., T. Cox, e cols. (2003) "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells". Nat. Immunol, **4**:337-342.

Klein L., K. Khazaie, e cols. (2003) "In vivo dynamics of antigen-specific regulatory T cells not predicted from behavior in vitro". Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **22**:8886-91.

Kohm A.P., J.S. McMahon, e cols. (2006) "Cutting Edge: Anti-CD25 monoclonal antibody injection results in the functional inactivation, not depletion, of CD4+CD25+ T regulatory cells". J Immunol, **176**(6):3301-5.

Kojima A., Y. Tanaka-Kojima, e cols. (1976) "Spontaneous development of autoimmune thyroiditis in neonatally thymectomized mice". Lab Invest, **34**:550-7.

Kojima A., O. Taguchi, e cols. (1980) "Experimental production of possible autoimmune castritis followed by macrocytic anemia in athymic nude mice". Lab Invest, **42**: 387-95.

Kretschmer K., I. Apostolou, e cols. (2005) "Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen". Nat Immunol, **6**(12):1219-27.

Kyewski B & J. Derbinski (2004) "Self-representation in the thymus: an extended view". Nat Rev Immunol, **4**(9):688-98. Review

Lafferty, K. J., H. S. Warren, e cols. (1978). "Immunological induction of T lymphocytes: role of antigen & the lymphocyte costimulator". Blood Cells, **4**(3): 395-406.

Lei T.C., Y. Su, e cols. (2005) "Tolerance induction via a B-cell delivered gene therapy-based protocol: optimization and role of the Ig scaffold". Cell Immunol, **235**(1):12-20.

Liu Y. & C.A. Janeway (1991) "Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4 T-cell growth". Int Immunol, **3**(4):323-32.

Lindahl, K. F. & D. B. Wilson (1977). "Histocompatibility antigen-activated cytotoxic T lymphocytes. II. Estimates of the frequency & specificity of precursors". J Expl Med, **145**(3): 508-22.

Liston A., D.H. Gray, e cols. (2004) "Gene dosage--limiting role of Aire in thymic expression, clonal deletion, and organ-specific autoimmunity". J Exp Med, **200**(8):1015-26.

Liu Y & C.A.. Janeway Jr. (1991) "Microbial induction of co-stimulatory activity for CD4T cell growth". Intern Immunol, **3**(4):323-32.

Macián F., F. García-Cózar, e cols (2002) "Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance". Cell, **109**(6):719-31.

Mahnke K., Y. Qian, e cols. (2003) "Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells". Blood, **101**(12):4862-9.

Matzinger P. (1994) "Tolerance, danger, and the extended family". Annu Rev Immunol, **12**:991-1045.

Matzinger P. (1999) "Graft tolerance: a duel of two signals". Nat Med, **5**(6):616-7.

Matzinger P & M.J. Bevan (1977) "Induction of H-2-restricted cytotoxic T cells: in vivo induction has the appearance of being unrestricted". Cell Immunol, **33**(1):92-100.

Melief CJ . (2005) "Mini-review: Regulation of cytotoxic T lymphocyte responses by dendritic cells: peaceful coexistence of cross-priming and direct priming?" Eur J Immunol, **33**(10):2645-54.

Nossal G.J. & B.L. Pike (1980) "Clonal anergy: persistence in tolerant mice of antigen-binding B lymphocytes incapable of responding to antigen or mitogen". Proc Natl Acad Sci U S A, **77**(3):1602-6.

Pandiyan P., L. Zheng e cols. (2007) "CD4(+)CD25(+)Foxp3(+) regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4(+) T cells". *Nat Immunol*, **8**(12):1353-62.

Pasare C. & R. Medzhitov (2003) "Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells". *Science*, **299**(5609):1033-6.

Peterson P., K. Nagamine e cols. (1998) "APECED: a monogenic autoimmune disease providing new clues to self-tolerance". *Immunol Today* **19**,:384-6.

Pinto D.R. (2005) "B cells as antigen presenting cells". *Cell Immunol*, **238**(2):67-75. Epub 2006 Mar 30. Review.

Powrie F. & D.W. Mason. (1990) "OX-22^{high} CD4+ T cells induce wasting disease with multiple organ pathology: prevention by the OX-22^{low} subset". *J.Exp.Med*, **172**:1701- 1708.

Powell D.J. (2006) "The induction and maintenance of T cell anergy". *Clinical Immunology*, **120**: 239-246.

Rammensee H.G., R. Kroschewski, e cols. (1989) "Clonal anergy induced in mature V beta 6+ T lymphocytes on immunizing Mls-1b mice with Mls-1a expressing cells". *Nature*, **339**(6225):541-4.

Raimondi G., I. Zanoni, e cols. (2006) "Induction of peripheral T cell tolerance by antigen-presenting B cells. I. Relevance of antigen presentation persistence". J Immunol, **176**(7):4012-20.

Rao A., C. Luo, e cols. (1997) "Transcription factors of the NFAT family: regulation and function". Annu Rev Immunol, **15**:707-47. Review.

Read, S., V. Malmstrom, e cols. (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation". The Journal of Experimental Medicine, **192**(2): 295-302.

Reichardt P, B. Dornbach, e cols. (2007) "Naive B cells generate regulatory T cells in the presence of a mature immunologic synapse". Blood, **110**(5):1519-29.

Reiser, J. B., C. Darnault, e cols. (2000). "Crystal structure of a T cell receptor bound to an allogeneic MHC molecule." Nat Immunol, **1**(4): 291-7.

Ridge J.P., F. Di Rosa, e cols. (1998) "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell". Nature, **393**(6684):474-8.

Robey E. & B.J. Fowlkes. (1994)"Selective events in T cell development". Annu Rev Immunol, **12**:675-705.

Rodríguez-Pinto D. (2005) "B cells as antigen presenting cells". Cell Immunol, **38**(2):67-75. Review.

Ryan, J. J., R. E. Gress, e cols. (1984). "Recognition & response to alloantigens in vivo. II. Priming with accessory cell-depleted donor allogeneic splenocytes: induction of specific unresponsiveness to foreign major histocompatibility complex determinants." J Immunol, **133**(5): 2343-50.

Sakaguchi S., T. Takahashi, e cols. (1982) "Study on cellular events in post-thymectomy autoimmune oophoritis in mice. II. Requirement of Lyt-1 cells in normal female mice for the prevention of oophoritis". J Exp Med, **156**:1577-86.

Sakaguchi S., K. Fukuma, e cols. (1985) "Organ-specific autoimmune diseases induced in mice by elimination of T cell subset. I. Evidence for the active participation of T cells in natural self-tolerance; deficit of a T cell subset as a possible cause of autoimmune disease". J. Exp. Méd, **1**:72-87

Sakaguchi, S., N. Sakaguchi, e cols. (1995). "Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases". Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950) **155**(3): 1151-64.

Schwartz R.(1999) "Immunological Tolerance, in Fundamental Immunology". Edited by William E. Paul (Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 1999, 4th edition).

Schwartz, R. H. (2003). "T cell anergy." Annual Review of Immunology, **21**: 305-34.

Seamons A., A. Perchet, e cols. (2006) "Endogenous myelin basic protein is presented in the periphery by both dendritic cells and resting B cells with different functional consequences". J Immunol, 15;**177**(4):2097-106.

Shevach .M. (2000). "Regulatory T cells in autoimmunity". Annu Rev Immunol, **18**: 423-49.

Shevach EM. (2002) "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers". Nat Rev Immunol, **2**:389-400.

Singer G.G. & A.K. Abbas. (1994) "The fas antigen is involved in peripheral but not thymic deletion of T lymphocytes in T cell receptor transgenic mice". Immunity, **1**:365-71.

Smith H., I.M. Chen, e cols. (1989) "Neonatal thymectomy results in a repertoire enriched in T cells deleted in adult thymus". Science, **18**:749-52.

Sospedra M., X. Ferrer-Francesch, e cols. (1998) "Transcription of a broad range of self-antigens in human thymus suggests a role for central mechanisms in tolerance toward peripheral antigens". J.immunol, **161**: 5918-5929.

Soukhareva N., Y. Jiang, e cols. (2006) "Treatment of diabetes in NOD mice by gene transfer of Ig-fusion proteins into B cells: role of T regulatory cells". Cell Immunol, **240**(1):41-6.

Su M.A. & M.S. Anderson (2004). "Aire: an update". Curr Opin Immunol, **16**:746-52 Review.

Suto, A., H. Nakajima, e cols. (2002). "CD4(+)CD25(+) T-cell development is regulated by at least 2 distinct mechanisms." Blood, **99**(2): 555-60.

Takahashi T., Y. Kuniyasu, e cols. (1998) "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state". Int. Immunol, **10**:1969-80.

Tang Q., J.Y. Adams, e cols. (2006) "Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice". Nat Immunol, **7**(1):83-92.

Thorstenson, K. M. & A. Khoruts (2001). "Generation of anergic & potentially immunoregulatory CD25+CD4 T cells in vivo after induction of peripheral tolerance with intravenous or oral antigen". J Immunol, **167**(1): 188-95.

Thornton A.M. & E.M. Shevach (1998) "CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production". J Exp Med, **188**(2):287-96.

Thornton A.M. & E.M. Shevach. (2000) "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific". J. Immunol. **164**:182-190.

Tran D.Q., H. Ramsey, et al. (2007) "Induction of FOXP3 expression in naive human CD4+FOXP3 T cells by T-cell receptor stimulation is transforming growth factor-beta dependent but does not confer a regulatory phenotype". Blood, **110**(8):2983-90.

Tsitoura D.C., V.P. Yeung, et al. (2002) "Critical role of B cells in the development of T cell tolerance to aeroallergens". Int Immunol, **14**(6):659-67.

Valujskikh A., O. Lantz, et al. (2002) "Cross-primed CD8(+) T cells mediate graft rejection via a distinct effector pathway". Nat Immunol, **3**(9):844-51.

Van Santen H.M., C. Benoist, et al. (2004). "Number of T reg cells that differentiate does not increase upon encounter of agonist ligand on thymic epithelial cells". J Exp Med, **200**: 1221-30.

Vaz, N., A. M. Faria, et al. (1997) "Immaturity, ageing & oral tolerance." Scand J Immunol, **46**(3): 225-9.

Von Pirquet C.E. (1908) "Das Verhalten der Kutanen Tuberkulin-reaktion während der Masern". Munch Med Wochenschr, **34**:1297-300.

Zinkernagel R.M. (1996) "Immunology taught by viruses". Science, **271**:173-8. Review.

Wan Y.Y. & R.A. Flavell (2006) "The roles for cytokines in the generation and maintenance of regulatory T cells". Immunol Rev, **212**:114-30. Review.

Watschinger, B., L. Gallon, e cols. (1994). "Mechanisms of allo-recognition. Recognition by in vivo-primed T cells of specific major histocompatibility complex polymorphisms presented as peptides by responder antigen-presenting cells." Transplantation, **57**(4): 572-6.

Weaver C.T, L.E. Harrington, e cols. (2006) "Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties". Immunity, **24**(6):677-88. Review.

Wells A.D., M.C. Walsh, e cols. (2000) "T cell effector function and anergy avoidance are quantitatively linked to cell division". J Immunol, **165**(5):2432-43.

Wu H.Y., A. Monsonogo, e cols. (2006) "The mechanism of nasal tolerance in lupus prone mice is T-cell anergy induced by immature B cells that lack B7 expression". J Autoimmun, **26**(2):116-26.

Wu Y., M. Borde, e cols. (2006) "FOXP3 controls regulatory T cell function through cooperation with NFAT". Cell, **126**(2):375-87

Zeller J.C., A. Panoskaltis-Mortari, e cols. (1999) "Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta". J Immunol, **163**(7):3684-91.

Zhao D.M., A.M. Thornton, e cols. (2006) "Activated CD4+CD25+ T cells selectively kill B lymphocytes". Blood, **107**(10):3925-32.

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](#)