

Ronni Rômulo Novaes e Brito

**Irradiação Ionizante Seletiva Impede a Evolução do Lúpus
Eritematoso Sistêmico em Camundongo Fêmeo (NZB/NZW) F1 e
Seleciona População Radiorresistente de Células B-1 Peritoneais**

Tese apresentada à Universidade
Federal de São Paulo – Escola Paulista
de Medicina, para obtenção do Título de
Doutor em Ciências.

São Paulo

2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Ronni Rômulo Novaes e Brito

**Irradiação Ionizante Seletiva Impede a Evolução do Lúpus
Eritematoso Sistêmico em Camundongo Fêmeo (NZB/NZW) F1 e
Seleciona População Radiorresistente de Células B-1 Peritoneais**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Mario Mariano

São Paulo

2007

Ronni Rômulo Novaes e Brito

**Irradiação Ionizante Seletiva Impede a Evolução do Lúpus
Eritematoso Sistêmico em Camundongo Fêmeo (NZB/NZW) F1 e
Seleciona População Radiorresistente de Células B-1 Peritoneais**

Presidente da Banca: Prof. Dr. Mario Mariano

Banca Examinadora

Profa. Dra. Valéria Petri

Profa. Dra. Miriam Galvonas Jasiulionis

Prof. Dr. Sandro Rogério de Almeida

Dr. Edilberto Póstol

Aprovado em 12/04/2007

Novaes e Brito, Ronni Rômulo
Irradiação Ionizante Seletiva Impede a Evolução do L.E.S. em Camundongo Fêmeo (NZB/NZW) F1 e Seleciona População Radiorresistente de Células B-1 Peritoneais / Ronni Rômulo Novaes e Brito. -- São Paulo, 2007.

xvii, 160f

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Imunologia e Parasitologia.

Título em Inglês: **Selective Radiation Abrogates Systemic Lupus Erythematosus Progression in (NZB/NZW) F1 Female Mice and Selects a Radioresistant B-1 Peritoneal Cell Population.**

**1. Lúpus Eritematoso Sistêmico 2. Camundongos (NZB/NZW) F1
3. Irradiação 4. Célula B-1**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA, IMUNOLOGIA E PARASITOLOGIA

Chefe do Departamento: Prof. Dr. Sérgio Schenkman

Coordenador do Curso de Pós-Graduação: Prof. Dr. José Daniel Lopes

Um proprietário de um navio estava prestes a mandar para o mar um navio de emigrantes. Ele sabia que o navio estava velho, e nem fora muito bem construído; que vira muitos mares e climas, e com frequência necessitara de reparos. Dúvidas de que possivelmente não estivesse em condições de navegar lhe haviam sido sugeridas. Essas dúvidas lhe oprimiam a mente e o deixavam infeliz. Ele chegou a pensar que o navio talvez tivesse de ser totalmente examinado e reequipado, ainda que isso lhe custasse grandes despesas. No entanto, antes que a embarcação partisse, conseguiu superar essas reflexões melancólicas. Disse a si mesmo que o navio passara por muitas viagens e resistira a muitas tempestades em segurança, que era infundado supor que não voltaria a salvo também dessa viagem. Ele confiaria na Providência, que não podia deixar de proteger todas essas famílias infelizes que estavam abandonadas a sua terra natal em busca de dias melhores em outros lugares. Tiraria de sua cabeça todas as suspeitas mesquinhas sobre a honestidade dos construtores e empreiteiros. Dessa forma, ele adquiriu uma convicção sincera e confortável de que o seu navio era totalmente seguro e capaz de resistir às intempéries; assistiu à sua partida de coração leve e cheio de votos bondosos para o sucesso dos exilados naquele que seria o seu estranho novo lar; embolsou o dinheiro do seguro, quando o navio afundou no meio do oceano, sem contar história a ninguém.

O que devemos dizer desse homem? Sem dúvida. O seguinte: que ele foi de fato culpado da morte dessas pessoas. Admite-se que ele acreditava sinceramente nas boas condições de seu navio; mas a sinceridade de sua convicção não o ajuda de modo algum, porque *ele não tinha o direito de acreditar na evidência que estava diante de si*. Não adquirira a sua opinião conquistando-a honestamente pela investigação paciente, mas reprimindo as suas dúvidas...

William K. Clifford, *The ethics of belief* (1874).

A compreensão humana não é um exame desinteressado, mas recebe infusões da vontade e dos afetos; disso se originam ciências que podem ser chamadas "ciências conforme a nossa vontade". Pois um homem acredita mais facilmente no que gostaria que fosse verdade. Assim, ele rejeita coisas difíceis pela impaciência de pesquisar; coisas sensatas, porque diminuem a esperança; as coisas mais profundas da natureza, por superstição; a luz da experiência por arrogância e orgulho; coisas que não são comumente aceitas, por deferência à opinião do vulgo. Em suma, inúmeras são as maneiras, e às vezes imperceptíveis, pelas quais os afetos colorem e contaminam o entendimento.

Francis Bacon, *Novum organon*, (1620).

A intuição, não testada e não comprovada, é
uma garantia insuficiente da verdade.

Bertrand Russell, *Mysticism and logic* (1929).

Aos meus pais, Zenália Maria Novaes e Brito e Agnaldo Mendes de Brito por tudo que tenho até aqui, pelo amor, confiança e compreensão, pela minha formação e preparo para a vida.

Agradecimentos

Ao Professor Doutor Mario Mariano pelo espírito de complacência e principalmente, pela determinação dos pontos cardeais deste trabalho.

Aos Professores da Disciplina de Imunologia, Doutora Célia Regina Withaker Carneiro, Doutora Ieda Maria Longo Maugéri, Doutor José Daniel Lopes, Doutor Joel Machado Júnior, Doutora Miriam Galvonas Jasiulionis e Doutora Zulma Peixinho, pelo amparo e auxílio em minhas dificuldades.

À Professora Dr^a. Neusa Pereira da Silva da disciplina de Reumatologia e à Dr^a. Sandra Coccuzzo Sampaio do Instituto Butantã, pelo fornecimento de materiais e de protocolos experimentais.

Aos colegas e amigos do Laboratório, Ana Flávia Popi, Helena Cruz Oliveira (Helenão), Luiz Antônio Di Gennaro, Mauro Fantini (Fantoche), Ricardo Russo (Homem Velcro), Felipe Thies, Maria Fernanda Laurindo, Ângela MM, Patrícia Xander (Banco PX), Flávia Vigna, Luciana e Ludmilla do laboratório da Celinha, André Bacci, Renata Ananias (GlinGlan), Karla e Juliana do laboratório da Dra. Ieda, Érika Kioshima (Londrina), Juliana Maricato (Jubiraca), Fabiana Aliperti, Elisabeth Cristina (Clandestina), Luciano Feitosa, Priscila Penteado, Adriana Konno, Fabiana Toshie, Aline Morgado, Beatriz Duarte Palma Xylaras e Wagner Batista, pela paciência e pela preferência.

À minha amiga Beatriz Helena Pizarro De Lorenzo, por todas as noites em claro em frente aos *papers* e placas de ELISA.

As secretárias do departamento, Zélia Lordelo Pereira, Maria Gisélia Santos Lopes, Ivone Mozat, Mércia Vieira Maia e Regiane.

Aos funcionários e técnicos da disciplina de Imunologia, em especial a Creusa Rosa de Oliveira, Geová Pereira Santos e Aparecido Mendes, sempre muito pacientes e prestativos.

Aos meus queridos irmãos, Karla Maria Novaes e Brito e Marcos Novaes e Brito pelo companheirismo e amizade eternos.

Aos meus queridos amigos, Paulo Rovina Capovilla, Charle André Vallis, Luiz Cláudio Godoy, Luiz Caetano Malavolta, Thalita Balsamo Abrahão, Daniela de Matos Grosso e Rúbia Silva pelo apoio e amizade incondicional.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Abreviaturas.....	xiv
Resumo.....	xvi
1. Introdução.....	1
1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico.....	2
1.1.2. Conceitos Gerais.....	2
1.1.3. Tratamento.....	6
1.1.3.1. A irradiação ionizante como arma terapêutica.....	7
1.1.4. Lúpus Murino.....	8
1.1.5. Células B-1 e Auto-imunidade.....	12
2. Objetivos.....	15
3. Material e Métodos.....	17
3.1. Soluções.....	18
3.2. Meios de cultura.....	21
3.2.1. Meio para cultivo de células de mamíferos.....	21
3.2.1.1. Meio RPMI.....	21
3.2.1.2. Meio RPMI suplementado (R-10)	21
3.3. Animais.....	22
3.4. Irradiação.....	22

3.5. Modelo experimental.....	22
3.6. Exame Histológico dos rins.....	23
3.7. Citometria de fluxo	24
3.8. Obtenção e cultura de células B-1.....	25
3.9. Detecção de IL-10 no sobrenadante de cultura.....	26
3.10. ELISA para detecção de IgM no soro e no sobrenadante de cultura.....	27
3.11. Purificação de células B-1 por beads magnéticas.....	28
3.12. Preparação do extrato celular.....	28
3.13. Dosagem de Proteínas.....	29
3.14. SDS-PAGE e Immunoblotting.....	29
3.14.1. SDS-PAGE.....	29
3.14.2. Immunoblotting.....	31
3.15. Leucograma.....	32
3.15.1 Contagem total de leucócitos circulantes.....	32
3.15.2. Contagem diferencial de leucócitos circulantes	32
3.16. Métodos para detecção de anticorpos anti-DNA.....	33
3.16.1. Imunofluorescência Indireta (IFI).....	33
3.16.2. ELISA para detecção de anticorpos anti-DNA nativo.....	34
3.16.2.1. Purificação de DNA de timo de vitelo.....	34
3.16.2.2. ELISA.....	35
3.17. Análise estatística.	36
4. Resultados.....	37
4.1. O modelo de irradiação seletiva e células B-1.....	38
4.2. Efeito da irradiação seletiva no lúpus murino.....	40

4.2.1. Sobrevida.....	40
4.2.2. Análise macroscópica.....	41
4.2.3. Histopatologia dos rins.....	42
4.2.4. Produção de auto-anticorpos séricos.....	44
4.2.4.1. Imunofluorescência.....	44
4.2.4.2. ELISA	45
4.3. Radiação ionizante não modifica a população de células B-1 peritoneais em camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos.....	47
4.4. Radiorresistência em células B-1 é inerente ao camundongo (NZB/NZW) F1 fêmeo.....	48
4.5. Células B-1 são mantidas <i>in vitro</i> após irradiação seletiva e produzem continuamente IL-10 e IgM.....	50
4.6. Células B-1 radiorresistentes superexpressam Bcl-2.....	53
4.7. Como a irradiação confere resistência ao lúpus murino após irradiação?.....	56
5. Discussão.....	61
6. Conclusões.....	68
7. Referências.....	70
8. Abstract.....	85
9. Anexos.....	87

Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Publicação: B-1 cells are pivotal for *in vivo* inflammatory giant cell formation (2005)

Publicação: Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction Immunology (submetido)

Publicação: Selective Radiation Abrogates Systemic Lupus Erythematosus Progression in (NZB/NZW) F1 Female Mice and Selects a Radioresistant B-1 Peritoneal Cell Population (submetido)

Lista de Figuras

Figura 1: Dispositivo de chumbo para irradiação seletiva da região toracoabdominal.

Figura 2: Eliminação da célula B-1 pela irradiação seletiva.

Figura 3: Repetidas doses de radiação ionizante aumenta sobrevida em modelo experimental de lúpus.

Figura 4: Radiação seletiva diminui consideravelmente esplenomegalia.

Figura 5: Cortes histológicos para avaliação do parênquima renal de animais saudáveis, lúpicos e tratados.

Figura 6: Irradiação seletiva diminui IgG e IgM anti-DNA em soro de (NZB/NZW) F1.

Figura 7: Irradiação diminui auto-anticorpos contra DNA no soro de animais (NZB/NZW) F1.

Figura 8: Níveis séricos de IgG e IgM totais não são alterados após irradiação.

Figura 9: Radiação ionizante não modifica a população de células B-1 em camundongos (NZB/NZW) F1 e são predominantemente B-1a.

Figura 10: Radiorresistência em células B-1 é própria dos camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas.

Figura 11: Células B-1 permanecem em cultura após irradiação.

Figura 12: Irradiação não interfere na síntese de IL-10 pelas células B-1 *in vitro*.

Figura 13: Irradiação não interfere na produção de IgM pelas células B-1 *in vitro*.

Figura 14: Figura 2: Porcentagem de células B-1 da população celular peritoneal após purificação.

Figura 15: Células B-1 radiorresistentes superexpressam Bcl-2.

Figura 16: População leucocitária do sangue periférico é restabelecida 72h após irradiação seletiva em camundongos (NZB/NZW) F1.

Figura 17: Porcentagens e contagem do número absoluto de células peritoneais após irradiação seletiva em camundongos (NZB/NZW) F1.

Figura 18: Atraso em repopular células do baço de camundongos (NZB/NZW) F1 após irradiação seletiva.

Lista de Abreviaturas

LES	Lúpus Eritematoso Sistêmico
[(NZB/NZW) F1]	(<i>New Zealand Black x New Zealand White</i>) F1
ANA	Anti-núcleo
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
CE	Corticoesteróides
AINH	Antiinflamatórios não Hormonais
ILT	Irradiação Linfóide Total
gp	Glicoproteína
JDE	Junção Derme-epiderme
ssDNA	Simples Fita de DNA
dsDNA	Dupla Fita de DNA
Gy	Gray
cGy	Centigray
PBS	Tampão Fosfato/salina
RPMI	Meio de cultura para leucócitos. Tampão bicarbonato, suplementado com aminoácidos e vitaminas
R-10	Meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino
SFB	Soro Fetal Bovino
HE	Hematoxilina Eosina
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Soro Albumina Bovino)
CD	<i>Cluster Differentiation</i>

FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
PE	Ficoeritrina
APC	Aloficocianina
PerCP	Clorofil de Peridina
EDTA	<i>EthyleneDiamine TetrAcetic acid</i> (ácido etilenodiamino tetra acético)
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
CBB	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
ctDNA	DNA de Timo de Vitelo
BSAm	BSA metilado
IFI	Imunofluorescência Indireta
Bcl-2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>

Resumo

Objetivo: Investigar se a irradiação toracoabdominal de camundongos induz bloqueio na evolução do LES em camundongos (NZB/NZW) F1 e a possível participação de células B-1 no processo. **Métodos:** Camundongos das linhagens (NZB/NZW) F1 fêmeos, NZB e NZW foram irradiados com 9 Gy na região toracoabdominal, a partir do terceiro mês de vida; 1x por mês até 13 meses de idade. A dose total administrada foi de 90 Gy. Os animais foram sacrificados 48 h após a última irradiação, exceto os animais (NZB/NZW) F1 fêmeos não-irradiados (lúpicos), que vieram a óbito com 8, 9 ou 10 meses de idade. Foram realizados experimentos de citometria de fluxo e cultura de células B-1 de animais irradiados ou não. Foi também realizada análise por imunofluorescência indireta, da presença de auto-anticorpos no soro dos animais tratados e controles. Os rins dos animais foram analisados por métodos histológicos convencionais. **Resultados:** A sobrevivência dos camundongos tratados com irradiação foi estatisticamente maior, quando comparada com aquela de camundongos não-tratados. Animais irradiados não apresentaram sinais da doença nem níveis detectáveis de auto-anticorpos circulantes. A análise histopatológica dos rins mostrou diminuição das lesões glomerulares e do infiltrado de células inflamatórias nos animais tratados, em contraposição aos glomérulos dos animais controles não tratados. Células B-1 estão normalmente presentes na cavidade peritoneal de animais (NZB/NZW) F1 e BALB/c, NZB e NZW. A irradiação seletiva desses animais resultou em diminuição significativa de células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c, NZB

e NZW mas não de animais (NZB/NZW) F1 fêmeos. As células B-1 nos camundongos (NZB/NZW) F1 expressam de forma constitutiva a molécula anti-apoptótica Bcl-2. É provável que essa proteína seja a principal responsável pela resistência à irradiação observada nessas células. As células do baço, TCD4, TCD8, B-2 e macrófagos, exibiram um longo atraso em repopular este órgão (aproximadamente vinte dias) após irradiação. Esses resultados sugerem que os possíveis clones auto-reativos que poderiam estar presentes no baço dos animais, foram eliminados após irradiação ionizante. **Conclusões:** O método de irradiação desenvolvido em nosso laboratório, em concordância com dados da literatura, impediu o desenvolvimento do LES em camundongos (NZB/NZW) F1. Foi demonstrado que células B-1 desses camundongos são radiorresistentes. A possível participação dessas células radiorresistentes na patogenia do lúpus murino ainda não pode ser esclarecida. Contudo, esplenócitos exibiram um longo atraso em restituir o baço, sugerindo que possíveis células auto-reativas que poderiam estar presentes no baço dos animais, foram eliminadas após irradiação. Assim, parece razoável especular que a irradiação seletiva periódica pode suprimir clones auto-reativos do baço, não havendo tempo hábil para que este órgão seja restaurado e induza doença auto-imune.

1. Introdução

1.1. Lúpus Eritematoso Sistêmico

1.1.2. Conceitos Gerais

O Lúpus Eritematoso Sistêmico (LES) é doença inflamatória crônica caracterizada por envolvimento de múltiplos sistemas e órgãos incluindo pele, articulações, sistemas cardiopulmonar, vascular, hematológico, renal e neurológico, que podem ser acometidos de forma simultânea ou progressiva. Geralmente evolui de forma flutuante, com períodos de remissão e surtos de exacerbação, apresentando curso e prognóstico variáveis com significativa morbidade e mortalidade, principalmente devido ao envolvimento de órgãos vitais (2-4).

O termo *lúpus*, lobo em latim, foi utilizado no século XVIII para descrever uma variedade de doenças cutâneas. Porém, o primeiro relato histórico de Lúpus Eritematoso Sistêmico foi feito por Bielt em 1833 (5). Em 1958, Friou demonstrou a presença do fator antinuclear em pacientes lúpicos, gerando os primeiros conhecimentos sobre a imunopatogênese da doença (6).

Embora sua causa seja desconhecida, o LES parece resultar de desequilíbrio na regulação imunológica devido, provavelmente, a uma combinação de fatores genéticos, hormonais e ambientais (7, 8).

O LES é comprovadamente mais prevalente no sexo feminino, ocorrendo principalmente no período reprodutivo, no qual alcança proporção de 9 mulheres para cada homen. Esta proporção é menor em pacientes abaixo dos 13 e acima dos 60 anos de idade (9). Implicações hormonais na etiopatogenia do LES têm sido sugeridas devido maior freqüência da doença no sexo feminino (10), tanto no ser humano como em

camundongos (New Zealand Black x New Zealand White) F1 [(NZB/NZW) F1]. Estudos mostraram também uma provável participação de hormônios sexuais na modulação da produção de determinados anticorpos no LES murino (11). Trabalhos comparando a ocorrência da doença em diferentes raças demonstram que o LES é três vezes mais comum entre os negros nos Estados Unidos (12) do que entre indivíduos de raça branca. Ressalte-se, contudo, que o LES é freqüente na Suécia, país de população essencialmente caucasiana (13).

Algumas evidências indicam que os fatores genéticos são críticos no desenvolvimento do LES. A freqüência de LES em parentes de pacientes lúpicos é de 0,4 a 12%, contrastando com a prevalência de 0,01 a 0,02% na população geral (14, 15). Há também uma alta freqüência de anticorpos anti-núcleo (ANA), hipergamaglobulinemia e outras alterações imunológicas nos parentes de primeiro grau de pacientes com LES (16, 17). A concordância no aparecimento do LES em gêmeos idênticos é alta em comparação à freqüência observada em gêmeos dizigóticos que é semelhante à de parentes em primeiro grau (18, 19).

A observação de que o LES pode ser discordante mesmo em gêmeos idênticos (20), sugere que fatores externos ou ambientais também tenham um importante papel no desencadeamento da doença em indivíduos susceptíveis (21). Além disso, é conhecida indução ou exacerbação do LES após exposição aos raios ultravioleta (22).

Uma das alterações mais marcantes no LES é a presença de múltiplos auto-anticorpos, alguns dos quais envolvidos na patogenia da doença. Entre esses, destacam-se os anticorpos contra o ácido desoxirribonucléico (DNA) na sua forma nativa, cujos títulos geralmente guardam relação com a atividade da doença. Esses podem ser encontrados na forma de complexos DNA/anti-DNA depositados nos glomérulos de

pacientes lúpicos com nefrite ativa (7). Outro mecanismo imunológico importante no LES é a ativação da cascata do sistema do complemento com o conseqüente desenvolvimento de processo inflamatório (23) e dano tecidual (24).

O LES apresenta grande polimorfismo de manifestações clínicas, podendo acometer um ou mais órgãos e sistemas, de forma concomitante ou consecutiva, e com evolução e prognóstico muitas vezes imprevisíveis.

Sintomas gerais como febre, perda de peso, fadiga e adinamia estão entre as principais manifestações clínicas da doença em atividade, podendo ser encontrados em 36 a 90% dos pacientes (25). Entre as manifestações musculoesqueléticas, a artrite e/ou artralgia são as mais freqüentes, tendo uma incidência variável entre 56 e 98%, enquanto a miosite, ocorrem em 5 a 48% (26)

Lesões dermatológicas são encontradas entre 39 e 85% dos pacientes, destacando-se o clássico eritema malar, observado entre 49 a 59% dos pacientes, e a fotossensibilidade, em torno de 50% dos doentes. Lesões discóides e úlceras orais estão presentes em 20% dos pacientes. A alopecia ocorre entre 20 a 70% dos lúpicos, enquanto as vasculites cutâneas são observadas entre 21 e 27%, sendo bem mais raras as lesões vesiculares e discrômicas (25, 26).

O acometimento gastrointestinal decorrente da doença, via de regra, não é uma manifestação clínica freqüente, exceto as náuseas e vômitos que variam entre 49 e 53% dos doentes. Outros sinais e sintomas como ascite, dor abdominal, icterícia e insuficiência hepática ocorrem em menos de 10% dos pacientes e podem ser devido aos efeitos colaterais das medicações usadas no controle da doença. O comprometimento neurológico do LES aparece entre 25 a 45% dos pacientes (26)

Com relação ao comprometimento hematológico, a anemia é relatada em mais de 80% dos pacientes. A leucopenia é referida entre 17 a 56%, eosinofilia em 10% e a trombocitopenia entre 7 a 22% dos lúpicos (26)

A produção de auto-anticorpos dirigidos principalmente contra constituintes nucleares (27) é sabidamente uma característica central do LES, sendo que alguns desses anticorpos parecem estar envolvidos diretamente na sua patogênese e no aparecimento de determinadas manifestações clínicas. Devido a sua significância no contexto geral do LES, devem-se destacar os anticorpos que se ligam ao DNA e/ou às proteínas entrelaçadas ao DNA (28).

Os anticorpos anti-DNA foram identificados em 1957 e desde a sua descoberta têm ocupado uma posição singular como marcador diagnóstico no LES (29).

A produção de anticorpos anti-DNA nativo é observada em pacientes com LES e em determinadas linhagens de camundongos, que desenvolvem uma doença auto-imune semelhante ao lúpus humano (30). Os anticorpos anti-DNA nativo são altamente específicos no LES, estando presentes entre 20 a 90% dos casos, conforme a metodologia empregada para a sua detecção e as características da população estudada (31). Geralmente os anticorpos anti-DNA encontrados nos pacientes lúpicos reconhecem tanto o DNA nativo quanto o DNA desnaturado (30).

Os anticorpos anti-DNA desnaturado podem ser vistos em uma variedade de condições auto-imunes, incluindo o LES, esclerose sistêmica, artrite reumatóide, lúpus induzido por droga e em títulos baixos no soro de indivíduos normais (32). Além disso, anticorpos anti-DNA desnaturado têm sido detectados entre 20 a 30% de parentes saudáveis de pacientes lúpicos (33), enquanto anticorpos anti-DNA nativo raramente são encontrados nesses indivíduos.

1.1.3. Tratamento

A terapêutica do LES é abrangente, englobando medidas gerais e diferentes drogas que objetivam modificar o processo inflamatório. Esses agentes são escolhidos de acordo com a graduação do comprometimento e a qualidade/função dos órgãos atingidos.

São utilizados vários tratamentos que objetivam a restauração da saúde dos pacientes lúpicos. Dentre estes, podem-se citar os antiinflamatórios não hormonais (AINH), antimaláricos, corticosteróides e imunossupressores.

Os corticoesteróides (CE) constituem a base da terapia medicamentosa para a grande maioria dos pacientes com LES. Podem ser utilizados para o tratamento de lesões cutâneas, por via oral, diariamente ou em dias alternados e em altas doses por via intravenosa (pulsoterapia). A pulsoterapia com corticoesteróides permite um controle rápido dos fenômenos inflamatórios e das alterações imunológicas. Porém, em geral, seu efeito é temporário (34).

Os antimaláricos têm sido utilizados há mais de quatro décadas para o controle de manifestações osteoarticulares e cutâneas em pacientes com LES (35). Os antiinflamatórios não hormonais são indicados para o tratamento de comprometimento articular e serosite leve. O uso de imunossupressores associados a CE, quando comparado ao uso isolado de CE é superior em muitos dos casos de pacientes lúpicos (36).

1.1.3.1. A irradiação ionizante como arma terapêutica

Na década de 70, grupos independentes aplicaram a denominada Irradiação Linfóide Total (ILT) para o tratamento de desordens auto-imunes em camundongos fêmeos (NZB/NZW) F1 e camundongos MRL/1n e MRL/1pr, particularmente naqueles com doença semelhante ao Lúpus Eritematoso Sistêmico (37-40). Este tratamento consiste no uso de irradiação ionizante sobre as regiões torácica, abdominal e inguinal, num formato de Y invertido, mantendo membros e cabeça protegidos. Essas investigações mostraram que este tipo de terapia resultou em significativa diminuição nos níveis de proteinúria, aumento da taxa de sobrevivência e melhora das anormalidades estruturais do glomérulo.

Srober e colaboradores (1985) da Universidade de Stanford, utilizaram a Irradiação Linfóide Total para tratar pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Trataram 10 pacientes com nefrite lúpica e elevada proteinúria, que não respondiam ao tratamento com corticosteróides isoladamente ou em combinação com azatioprina. Estes pacientes mostraram aumento nos níveis de albumina e redução no edema periférico. Seis semanas após o início do tratamento, houve redução nos níveis séricos de anticorpos anti-DNA e aumento dos níveis séricos do complemento, concomitantemente. Houve estabilização ou melhora da taxa de filtração glomerular, e dos níveis séricos de creatinina, ou ambos, em 8 de 10 pacientes. A melhora dos pacientes perdurou acima de 3,5 anos sem a necessidade da administração de drogas citotóxicas (39). Contudo, em que pese os resultados promissores obtidos com esse tipo de tratamento do LES, o uso do mesmo e estudos sobre os mecanismos envolvidos nesse tipo de terapia não são encontrados na literatura. Os resultados obtidos nesses trabalhos foram sempre interpretados como decorrentes da imunossupressão sistêmica induzida pela irradiação.

1.1.4. Lúpus Murino

Existem algumas linhagens de camundongos que desenvolvem LES, tais quais MRL/Mp-lpr/lpr (MRL/lpr), BXSB e (New Zealand Black x New Zealand White) F1 [(NZB/NZW) F1], que fornecem informações da bagagem genética e peculiaridades relacionadas à auto-imunidade (41, 42), sendo este último, um dos mais completos modelos experimentais de LES. Esses animais são caracterizados pela grande variedade das manifestações auto-ímmunes, principalmente pelo desenvolvimento de glomerulonefrite mediada por imunocomplexos. A gravidade das lesões renais está associada com a produção elevada de anticorpos contra vários antígenos nucleares como DNA dupla fita (43). No entanto, nestes modelos experimentais não são observadas lesões de pele.

As afecções associadas à auto-imunidade apresentam etiologia multifatorial. O desenvolvimento de modelos experimentais homogêneos permitiu que os vários elementos causais implicados na sua patogênese pudessem ser isolados e testados dentro de padrões conhecidos e controlados, possibilitando um melhor conhecimento destas patologias.

Grande parte dos conhecimentos sobre o LES foi obtida estudando-se a linhagem de camundongos New Zealand, (44-46). Estes autores observaram que camundongos New Zealand Black (NZB) apresentavam, espontaneamente, grave quadro de anemia hemolítica auto-ímmune (47). Cruzando estes camundongos com a linhagem New Zealand White (NZW), obtiveram o que viria a ser considerado um importante modelo experimental de doença auto-ímmune (48). Os camundongos (NZB/NZW) F1 desenvolvem alterações clínicas e imunológicas semelhantes àquelas observadas no LES, principalmente em

relação às alterações básicas desta doença, que são a formação de auto-anticorpos e glomérulonefrite por imunocomplexos de evolução fatal.

Staples & Talal (49) dividem a história natural do lúpus murino no camundongo (NZB/NZW) F1 em três estágios: 1) fase latente – do nascimento até os 3 meses de idade, quando os animais se mostram saudáveis, 2) fase sorológica – de 3 a 5 meses, quando são detectados auto-anticorpos séricos e 3) fase histológica – de 5 meses até a morte, quando se observam lesões teciduais.

Há diferenças evidentes na evolução da doença entre machos e fêmeas. As fêmeas apresentam evolução mais precoce, mais homogênea e mais grave, com taxa de mortalidade de 50% entre 8 e 9 meses e 90% em 12 meses. Nos machos, a mortalidade é mais tardia e não ocorre de modo uniforme, com 50% de mortalidade em torno de 14 a 16 meses de idade (50). No camundongo NZB, a sobrevivência nas fêmeas é de 14 meses e nos machos de 16 meses. O camundongo NZW tem sobrevivência próxima a dos camundongos normais, ou seja, de 22 meses para as fêmeas e 24 meses para os machos (51).

São numerosas as anormalidades imunológicas encontradas nestes camundongos, caracterizadas principalmente por hiperatividade policlonal de células B e conseqüente produção de auto-anticorpos contra componentes celulares e nucleares, que resultam na formação e deposição de imunocomplexos e consumo de complemento.

A hiper-reatividade das células B é uma característica fundamental da doença. O aumento da relação IgM/IgD na superfície da célula B em camundongos (NZB/NZW) F1 com duas semanas de idade indica a maturação precoce desta célula. O número de células B do subtipo Ly1+ (CD5) está aumentado e apresenta alta expressão do receptor de Interleucina-2 (IL-2) *in vitro*. Este subtipo de linfócitos B tem a capacidade de secretar espontaneamente anticorpos IgM, que reagem freqüentemente com autoantígenos (52).

A hipergamaglobulinemia deve-se a altas concentrações séricas de IgG e IgM policlonais nas fases pré-clínica e clínica da doença, comprovado pela alta freqüência de células secretoras de imunoglobulinas encontradas no baço desses animais a partir do primeiro mês de vida. O predomínio de IgM é encontrado em camundongos jovens, mas concomitantemente com as manifestações clínicas da doença, são detectados títulos crescentes de IgG (53).

No camundongo, a doença acomete principalmente rins, timo, vasos e órgãos linfóides. Não há acometimento articular e a anemia hemolítica grave é sempre presente nos NZB, tendo baixa prevalência e pouca gravidade nos (NZB/NZW) F1.

A doença renal que ocorre em 100% dos casos nos camundongos (NZB/NZW) F1, apresenta quadro grave de glomerulonefrite com evolução fatal na grande maioria dos animais. Nas fêmeas, inicia-se a partir de 6 meses, sendo detectada por proteinúria inicial leve, porém progressiva. Os machos são acometidos mais tardiamente, em torno dos 9 meses, e não evoluem de maneira tão homogênea e progressiva como as fêmeas.

Existe correlação direta entre os níveis crescentes de proteinúria, ascensão dos títulos de anticorpos antinucleares, mudança no padrão de anticorpos anti-DNA para IgG e progressão do quadro renal que leva à falência renal e morte em grave quadro urêmico (50, 51).

Os hormônios sexuais modulam a expressão da auto-imunidade no camundongo (NZB/NZW) F1 (54). O hormônio estrogênico acelera o lúpus murino, observando-se os distúrbios do seu metabolismo com o início da doença. O estrógeno aumenta o número de células B Ly1+ e favorece a produção de auto-anticorpos, possivelmente, pelo envolvimento das células T e da IL-2 (55). Em contraposição, o andrógeno retarda a evolução do lúpus murino. Um dos mecanismos responsáveis pela imunossupressão

causada pelo hormônio masculino é o aumento dos níveis de complemento sérico (56), que facilitam a depuração de imunocomplexos circulantes (57).

Quanto aos processos infecciosos, os agentes virais participam aumentando a incidência de anticorpos antinucleares, sendo que as reinfecções elevam esta incidência. É grande a frequência da glicoproteína-70 (gp-70) e de anticorpos anti-gp-70, tendo o complexo gp-70/anti-gp-70 contribuição para a lesão da nefrite lúpica (52).

O camundongo (NZB/NZW) F1 raramente apresenta manifestações cutâneas. Apesar disso, Sommer e colaboradores. (58) descreveram a deposição de complemento e imunoglobulinas na junção derme-epiderme (JDE) do híbrido F1 com início em torno dos 6 meses de idade e progredindo no decorrer do tempo. Gilliam e colaboradores (59, 60) confirmaram estes achados, observando ainda relação temporal entre a deposição de imunoglobulinas nos glomérulos e pele, sugerindo assim uma possível relação etiopatogênica. Furukawa & Hamashima (42) também relataram associações significantes entre deposição de imunoglobulinas na JDE e a ocorrência de anticorpos anti-DNA no camundongo (NZB/NZW) F1. Estes achados são similares àqueles descritos em pacientes lúpicos.

1.1.5. Células B-1 e Auto-imunidade

Duas linhagens de célula B, designadas B-1 e B-2, têm sido identificadas com base nas suas origens, distribuição anatômica, marcadores de superfície celular, subtipos de anticorpos produzidos e capacidade de auto-reposição (61). Existem evidências sugerindo que o subtipo B-1 é uma linhagem com desenvolvimento independente da linhagem B-2 (62). Estão presentes em grande número na cavidade peritoneal e pleural de animais normais, sendo raras no baço e não detectadas em linfonodos (62-64). Fenotipicamente, as células B-1 diferem das células B-2 por apresentarem expressão não usual de marcadores de superfície (sIgM^{hi} sIgD^{lo} CD11b⁺) e ausência do marcador CD23 (65, 66). As células B-1 ainda são subdivididas em B-1a e B-1b pela presença ou ausência da molécula de CD5, respectivamente (67-69).

As células B-1 foram descritas inicialmente em pacientes com leucemia linfocítica crônica de células B, onde foi observada a presença de linfócitos B que expressavam o marcador CD5 em sua superfície (70). Em 1982, Calligaris-Cappio descreveu a presença do marcador CD5 em uma pequena população de linfócitos B normais (71). Desde então, a descrição e caracterização fenotípica e a origem e função destas células tornaram-se alvo de controvérsias na literatura. Com dados obtidos em estudos de transferência adotiva de células, Herzenberg e colaboradores defendem a teoria de precursores distintos para as subpopulações de células B-1 e B-2. A transferência de células do fígado fetal para camundongos irradiados foi capaz de reconstituir as duas subpopulações de células B, enquanto que a transferência de precursores da medula óssea limitava-se à repopulação de células B-2 (67, 69, 72). Por outro lado, o omento fetal (72, 73) e a

esplancnopleura para-aórtica (72, 74) mostraram conter precursores exclusivamente de células B-1. Esses dados sugerem que as células B-1 constituem uma linhagem fetal, enquanto que as B-2 seriam uma linhagem da vida adulta.

As células B-1 são responsáveis pela secreção de anticorpos “naturais” que reconhecem antígenos poliméricos de alto peso molecular e são críticas na resposta inicial a bactérias extracelulares encapsuladas (75, 76). Além disso, as células B-1a produzem anticorpos auto-reativos, voltados contra moléculas de fita simples de ácido desoxirribonucléico (ssDNA), dupla fita de DNA (dsDNA), resíduos de fosfatidilcolina, o que tem levado autores a correlacionar esta sub-população com a patogenia de algumas doenças auto-imunes (76).

De fato, números elevados de células B-1a têm sido associados com doenças auto-imunes tanto em humanos quanto em modelos experimentais. Em pacientes com Síndrome de Sjögren e artrite reumatóide tem sido encontrado um grande número de células B-1 na corrente sanguínea (68, 77, 78). Além disso, camundongos “motheaten” também são suscetíveis a doenças auto-imunes. Estes animais possuem uma mutação no gene fosfatase de células hematopoéticas (79), possuindo linfócitos B apenas do subtipo B-1. Em camundongos (NZB/NZW) F1, usados como modelo experimental de lúpus eritematoso sistêmico, são encontradas grandes quantidades de células B-1a acumuladas na cavidade peritoneal e, em menor extensão, no baço (80). Esses fatos sugerem que células B-1 podem estar envolvidas na patogênese de doenças auto-imunes.

O papel das células B-1 na patogenia de doenças auto-imunes ainda é controverso. Em camundongos NZB/xid e (NZB/NZW)F1/xid, nos quais células B-1 são congenitamente ausentes (81), há escassa produção de auto-anticorpos e a ocorrência de sintomas auto-imunes é reduzida (54, 82). *In vivo*, a eliminação de células B-1 peritoneais por repetidas

injeções de anticorpos anti-IL10 (83, 84) ou injeção intra-peritoneal de água (85) diminuem consideravelmente os sinais da doença em camundongos (NZB/NZW) F1. Murakami *et al* (1992) demonstraram que células B-1 estão diretamente envolvidas na ocorrência de anemia hemolítica auto-imune. Utilizando camundongos transgênicos que expressam auto-anticorpos de classe IgM contra eritrócitos, foi demonstrado que células B-1 presentes na cavidade peritoneal e lâmina própria do intestino, quando ativadas por lipopolissacarídeos entéricos, induziam a produção destes auto-anticorpos (86). Apesar das fortes evidências sobre a participação das células B-1 nas doenças auto-imunes, alguns trabalhos ainda colocam em dúvida a participação destas células em processo patológico (15, 87).

Almeida e colaboradores demonstraram que células B-1b estão presentes no sobrenadante de cultura de células peritoneais aderentes do camundongo. Demonstraram ainda que essas células são radiosensíveis e que, a irradiação dos animais (700 cGy) depleta as células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos A/Sn (88). Além disso, o recultivo destas células induz a expressão de características fenotípicas e fisiológicas de fagócitos mononucleares (88, 89). O papel destas células na resposta inflamatória ainda é desconhecido, havendo contudo evidências que as mesmas migram para o foco inflamatório inespecífico (90).

2. Objetivos

Com base em dados da literatura mostrando que a irradiação controla a evolução do LES em camundongos e humanos, e que as células B-1 estão envolvidas em manifestações auto-imunes, é objetivo deste trabalho estabelecer uma possível correlação entre células B-1 e a evolução do LES em camundongos (NZB/NZW) F1.

3. Material e Métodos

3.1. Soluções

Todas as soluções descritas foram preparadas com água bi-destilada ou com padrão Mili-Q. Os reagentes (qualidade P.A.) foram adquiridos da Merck (S/A), Synth, Amersham e Sigma Chemical CO.

Solução estoque de tampão fosfato/salina (PBS): NaCl 2,7378 M, KCl 0,053M, Na₂HPO₄ 0,1301 M e K₂HPO₄ 0,0229 M. A solução estoque foi diluída 20 vezes para o uso.

Líquido de Bouin: 75% de solução aquosa saturada de ácido pícrico (v/v), 25% de formaldeído (v/v). Desta solução, retirar 5% e descartar. Acrescentar 5% de ácido acético 20% (v/v).

Tampão de amostra para SDS-PAGE: Tris-HCl 62 mM, pH 8,8, contendo 0,2% (p/v) de SDS, β-mercaptanol 50 mM, 0,005% (p/v) de azul de bromofenol e 10% (v/v) de glicerol.

Solução estoque de acrilamida/bis 30% para gel de proteína: 30% de acrilamida, 0,8% de bis-acrilamida e água bi-destilada (100 mL) q.s.p.

Tampão para gel de proteína (separação): Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8, contendo 0,4% de SDS (p/v).

Tampão para gel de proteína (empilhamento): Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8, contendo 0,4% de SDS.

Tampão de corrida para SDS-PAGE: Tris 25 mM, glicina 190 mM, pH 8,3, e 0,1% de SDS (p/v).

Tampão de transferência: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e 20% de metanol.

Corante de azul de Coomassie: 0,2% de Coomassie R250 em 50% de metanol e 10% de ácido acético.

Descorante forte para Coomassie: 50% de metanol, 10% de ácido acético e 40% de água destilada.

Corante de Ponceau: 0,5% (p/v) de Ponceau S em 5% de ácido acético.

Corante de Rosenfeld: 0,97 g de giemsa em pó, 0,53 g de may-grunwald e 1000 mL de metanol.

Líquido de Turk: 4 mL de ácido acético glacial, 4 gotas de azul de metileno 1% e 100 mL de água destilada q.s.p.

Tampão carbonato 0,1M pH 9,5: 10,6g/L de Na₂CO₃ anidro e 8,4g/L de NaHCO₃. Titular a solução de carbonato com a de bicarbonato até o pH desejado.

Glicerina tamponada: 90 mL de Glicerina (Merck) em 10 mL de tampão carbonato 0,1M pH 9,5.

Solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico: A uma solução de clorofórmio (Merck) e álcool isoamílico (Merck) (24:1 v/v) adicionar igual volume de fenol (Life Technologies) previamente fundido e saturado com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0. Guardar a mistura a 4°C em frasco escuro.

Tampão S1 estoque: Tris HCl pH 7,5 (20 mM), NaCl (50 mM), ZnCl₂ (0,1 mM) e 50% de Glicerol (v/v).

Nuclease S1 (Gibco / BRL) – estoque: Diluir 1 µL de nuclease S1, 1.500 U/µL em 1,5 mL de tampão S1 estoque. Separar em alíquotas e manter a -20°C até o momento de uso.

Tampão nuclease S1: 4,1g de acetato de sódio, 5,9 g de NaCl, 0,14 g de ZnCl₂ e 900 mL de água destilada. Ajustar o pH para 4,4 com ácido acético glacial e completar o volume para 1.000 mL. Manter a 4°C. Para uso, acrescentar 0,1 mL de BSA 10 mg/mL para cada 10 mL de tampão.

Nuclease S1 – uso: Para uso nas placas de ELISA, acrescentar 40 µL (40U) de nuclease S1 estoque a 10 mL do tampão nuclease S1.

Diluyente do soro: PBS contendo 0,1% de BSA, gelatina 0,1%, soro adulto bovino 0,5% e tween 20 0,05%.

Diluyente do conjugado: PBS contendo 0,5% de BSA, soro adulto bovino 0,1% e tween 20 0,05%.

3.2. Meios de cultura

Os meios de cultura descritos a seguir foram preparados com água bidestilada e autoclavados a 120°C por 15 min. Para cultura de células de mamíferos os meios foram esterilizados por filtração positiva em filtros de 0,22 µm.

3.2.1. Meio para cultivo de células de mamíferos

3.2.1.1. Meio RPMI: RPMI 1640 (Sigma) acrescido de ácido N-2-hiroxietilpiperazina-N-2-etanosulfônico 10mM (HEPES - Sigma), bicarbonato de sódio 24 mM (Sigma) e 40 µg/mL de garamicina (Schering).

3.2.1.2. Meio RPMI suplementado (R-10): meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Cultilab, Campinas).

3.3. Animais

Foram utilizados camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos, NZB fêmeos e NZW machos de 6 a 10 semanas de idade, fornecidos pelo Biotério de Camundongos Isogênicos da Universidade de São Paulo (USP) e camundongos isogênicos BALB/c fêmeos, adultos, fornecidos pelo Centro de Desenvolvimento de Modelos Experimentais (CEDEME) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). A manipulação e manutenção dos animais estiveram de acordo com procedimentos padrão.

3.4. Irradiação

Os animais foram anestesiados com solução composta por xilazina (Rumpum®) e quetamina (Ketalar®), em uma proporção de 1:1, diluída em PBS, pH 7,4, na proporção de 1:2. Em seguida foram submetidos a irradiação ionizante seletiva com 9 Gy em Gammacell®3000 Elan (Nordion International Inc.). A medula óssea dos membros anteriores e posteriores ficaram protegidas por peça de chumbo projetada em nosso laboratório.

3.5. Modelo experimental

Camundongos BALB/c adultos foram irradiados 1x para assegurar que nosso modelo experimental proposto de radiação seletiva eliminaria células B-1 da cavidade peritoneal. Posteriormente, camundongos das linhagens (NZB/NZW) F1 fêmeos, NZB e

NZW foram irradiados com 9 Gy na região toracoabdominal, a partir do terceiro mês de vida; 1x por mês até 13 meses de idade. A dose total administrada foi de 90 Gy. Os animais foram sacrificados 48 h após a última irradiação, exceto os animais (NZB/NZW) F1 fêmeos não-irradiados (lúpicos), que vieram a óbito com 8, 9 ou 10 meses de idade.

3.6. Exame Histológico dos rins

Fragmentos de rim foram fixados em líquido de Bouin, incluídos em parafina, cortados na espessura de 4 micra e corados pela técnica de hematoxilina eosina (H.E.).

Análise das lâminas foi realizada sempre na seguinte ordem:

- estrutura geral do parênquima;
- estudo dos glomérulos: tamanho, lobulação, celularidade do tufo glomerular, celularidade parietal da cápsula de Bowman, infiltração do glomérulo por polimorfonucleares, aumento da matriz mesangial, espessamento de membrana basal glomerular, presença de trombos hialinos nos capilares, congestão, hialinização, necrose, sinequia e fibrose;
- estudo dos túbulos: degeneração, sinais de regeneração, necrose, atrofia, presença e tipo de cilindros na luz tubular;
- estudo do interstício: edema, hemorragia, presença e tipo de infiltrado inflamatório e fibrose;
- estudos das arteríolas: hiperplasia de parede, edema de parede, alteração fibrinóide, necrose e trombozes;
- diagnóstico global.

3.7. Citometria de fluxo

Células peritoneais recém coletadas e esplenócitos ou células peritoneais em cultura foram contadas (aproximadamente 1×10^6 células/alíquota), centrifugadas e ressuspendidas em 100 μ L de PBS-BSA 1%. Cada alíquota foi incubada previamente com anti-CD16/CD32 para bloqueio do receptor para Fc γ II e III. Os tubos foram mantidos a 4°C por 30 minutos.

Após a incubação, as células foram lavadas, ressuspendidas novamente em PBS-BSA 1% e cada alíquota incubada com os anticorpos monoclonais adequados para análise dos marcadores de superfície. Foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais: anti-CD5 de camundongos feito em rato conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC) ou ficoeritrina (PE), anti-CD11b (Mac-1) de camundongo feito em rato conjugado a FITC ou alofococianina (APC), anti-CD19 de camundongo feito em rato conjugado a PE, anti-CD23 de camundongo feito em rato conjugado a FITC, anti-CD45R/B220 de camundongo feito em rato conjugado a Cy-Chrome, anti-IgM de camundongo feito em rato conjugado a PE, anti-CD4 de camundongo feito em rato conjugado a PE, anti-CD8 de camundongo feito em rato conjugado a proteína clorofil de peridinina (PerCP) e anti-CD3 de camundongo feito em rato conjugado a APC (Pharmingen). Ainda foram utilizados os seguintes anticorpos para controle de isotipo: anti-IgG2a de camundongo feito em rato conjugado a FITC, PE ou bitotilado, anti-IgG2b de camundongo feito em rato conjugado a FITC, PE ou biotilado, anti-IgG1 de camundongo feito em coelho e biotilado (Pharmingen).

As células foram incubadas com os anticorpos marcados com os fluorocromos por 1 hora em banho de gelo. Após a incubação, as células foram lavadas. Quando necessário, incubou-se as células em 100ul de PBS-BSA 1% contendo quantidade titulada de streptavidina conjugada a FITC, PE ou Cy-chrome (Pharmingen) por 40 minutos. Finalmente, as células foram lavadas e ressuspensas em 1mL de paraformaldeído 1% por uma hora. No momento da análise das amostras pelo citômetro, as células foram centrifugadas, ressuspensas em 1mL de PBS e colocadas em tubo para FACS mantidos em banho de gelo.

Para determinação das populações celulares, cada alíquota foi marcada com a combinação de dois, três ou quatro anticorpos conjugados a fluorocromos diferentes. Todos os *gates* e expressão dos marcadores foram determinados respeitando a fluorescência obtida com os isotipos controles.

3.8. Obtenção e cultura de células B-1

Células foram coletadas da cavidade peritoneal de camundongos por lavagens sucessivas usando RPMI-1640 (Sigma) (8mL). Células viáveis, foram contadas, ressuspensas em volume adequado de R10 (RPMI acrescido de 10% de soro fetal bovino) para 4×10^6 células por placa de cultura de plástico de 35 mm. Após incubação por 1 hora a 37°C, a placa foi lavada três vezes para eliminação das células não aderentes. As células aderentes foram mantidas em cultura em meio R10.

Após 5 dias de cultura, células pequenas, redondas e refringentes aparecem no sobrenadante de cultura, 70-85% destas células foram caracterizadas como células B-1

(88). Estas células serão coletadas e usadas nos diferentes experimentos. Todas as culturas celulares foram mantidas em atmosfera úmida com 5% de CO₂ a 37°C.

3.9. Detecção de IL-10 no sobrenadante de cultura

Amostras de sobrenadante de cultura de células B-1 foram recolhidas para determinação da quantidade de IL-10 por método de ELISA. O sobrenadante, livre de células, foi aliquotado e mantido a -70°C até o dia da dosagem.

Placas de 96 poços foram cobertas com 50µL de anticorpo primário anti-IL-10 (4µg/mL – RD Systems) diluídos em PBS e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com PBS Tween 0,05% por 3 vezes. Em seguida foram acrescentados 200µL/poço de PBS-BSA 1% para bloqueio dos sítios remanescentes, por 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram novamente lavadas. As amostras e IL-10 recombinante em diluições de concentrações conhecidas foram plaqueadas em 100 µL/poço, incubadas por 2 horas a 37°C. Após lavagem das placas, 50 µL de anticorpo de detecção biotinilado para IL-10 (4µg/mL – RD Systems) foram acrescentados e incubados por 1 h a 37°C. Após lavagem, as placas foram incubadas com conjugado streptavidina peroxidase diluída em PBS 1:200 (50µL) por 30 minutos a temperatura ambiente. As placas foram lavadas 2 x com PBS-Tween e 1 x com PBS. Para detecção da reação, 100 µL/poço de o-fenilenodiamina (OPD, 1 mg/mL, Sigma) dissolvido em tampão citrato/fosfato 100 mM pH 5,8, contendo 0,05% (v/v) H₂O₂ (Perhidrol, Merck) foram adicionados e as placas foram mantidas ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida após o aparecimento de cor com 50 µL/poço de ácido sulfúrico

(H₂SO₄) 4N. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica (EIA reader Titetek, Multiskan, MCC340) em comprimento de onda 492 nm.

3.10. ELISA para detecção de IgM no soro e no sobrenadante de cultura

Placas de 96 poços foram cobertas com 50µL de 5 µg/ml de anti-IgM feito em coelho diluído em tampão glicina (20mM) tamponado com NaCl (30mM, pH 9,2) e incubadas por 18 horas a 4°C. As placas foram lavadas com 200 µL/poço de tampão de lavagem (0,1M de NaCl e 0,05% de Tween 20) por 3 vezes. Em seguida foram acrescentados 150 µL/poço de leite desnatado 5% (Molico) para bloqueio dos sítios remanescentes por 1 h a 37°C. Após a incubação as placas foram 3 x lavadas com tampão apropriado. Em seguida os soros ou sobrenadante de cultura foram testados em duplicata, os soros foram diluídos (1:50) em leite desnatado 5%, colocando-se 50 µL/poço e incubando-se por 2 h a 37°C. Após três lavagens com tampão de lavagem um volume de 100 µL/poço de anticorpo IgM murino conjugada a peroxidase (Zymed), diluídos em PBS, foi adicionado e as placas foram incubadas por 1 h a 37°C. As placas foram lavadas 3 vezes com tampão de lavagem. A detecção da reação foi feita de acordo com o item 3.8. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica (EIA reader Titetek, Multiskan, MCC340) em comprimento de onda 492 nm.

3.11. Purificação de células B-1 por *beads* magnéticas

Células B-1 coletadas diretamente do lavado peritoneal, seis horas após última irradiação, foram purificadas por *beads* magnéticas. Foram utilizadas *beads* magnéticas revestidas com anti-CD23 para retirada de células B-2 (seleção negativa). As células foram incubadas com estas *beads* por 40 min a 4°C. Em seguida, foram lavadas e ressuspendidas em PBS-BSA 0,5% e EDTA 2mM. As células foram passadas em coluna acoplada a um ímã. Dessa maneira, as células B-2, que possuem o marcador CD23 em sua membrana, ficaram retidas na coluna. Após esta primeira seleção, este conjunto de células negativas para CD23, foi positivamente selecionado com *beads* magnéticas revestidas com anti-CD19. As células foram re-incubadas com estas *beads* por 40 min a 4°C. Células foram lavadas e ressuspendidas em PBS-BSA 0,5% e EDTA 2mM. As células foram passadas em nova coluna acoplada ao ímã. A coluna foi desacoplada do ímã e, por aplicação de PBS-BSA 0,5% e EDTA 2mM a fração celular aderida à coluna foi eluída (células B-1). Após a eluição, as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo para confirmação da pureza das células B-1. Estas células foram marcadas para CD11b e CD45.

3.12. Preparação do extrato celular

O extrato celular foi obtido de células B-1 purificadas por *beads* magnéticas que foram recém coletadas da cavidade peritoneal dos camundongos. As células foram lisadas pela incubação em solução hipotônica (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 100 mM NaCl, 50 mM

NaF, 1 mM NaVO₄, 100 mM PMSF, 10 µg/mL leupeptina, 10 µg/mL aprotinina e 0.5 % Nonidet P-40) por vinte minutos em banho de gelo. O lisado celular foi centrifugado a 14000 rpm por quinze minutos a 4°C. O sobrenadante foi removido e estocado em *freezer* a -70°C. A dosagem protéica foi realizada segundo método de Bradford (1).

3.13. Dosagem de Proteínas

As determinações das concentrações protéicas foram realizadas segundo método proposto por Bradford (1), que utiliza *Coomassie brilliant blue* (CBB) G-250 (Sigma) como reativo e albumina bovina (BSA) 1,0 mg/mL como padrão. A leitura da curva padrão foi realizada em comprimento de onda de 570 nm (EIA reader Titetek, Multiskan, MCC340).

3.14. SDS-PAGE e Immunoblotting

3.14.1. SDS-PAGE

Os procedimentos para eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecilsulfato de sódio (SDS-PAGE) foram executados em equipamentos Mini-Protean II (Bio-Rad) conforme descrito anteriormente (91). Para a proteína em estudo, o gel de separação teve 10% de acrilamida e o gel de empilhamento teve 3% de acrilamida. As amostras em análise foram diluídas 1:5 em tampão de amostra, fervidas por 5 minutos e aplicadas no gel de poliacrilamida, preparados como descrito a seguir:

Soluções estoque (mantidas a 4°C)	Gel de empilhamento (Volume final: 5,02 mL) 3%	Gel de separação (Volume final 14,8575 mL) 10%
Acrilamida 30%, bisacrilamida 0,8%	0,8 mL	5,0 mL
Tampão para gel de proteína (empilhamento)	1,25 mL	-
Tampão para gel de proteína (separação)	-	3,0 mL
Água bi-destilada	2,95 mL	6,8 mL
TEMED	5 µL	7,5 µL
Persulfato de amônio 10% (p/v)	15 µL	50 µL

Os eletrodos do aparelho foram mergulhados em tampão de corrida. Para cada gel foi aplicada voltagem constante de 170 Volts até o corante de acompanhamento atingir a extremidade final do gel.

Após a corrida eletroforética, os géis foram corados pelo método *Coomassie brilliant blue* para a coloração de proteínas, ou então transferidos para membranas de nitrocelulose (Amersham).

3.14.2. Immunoblotting

A transferência eletroforética dos géis de poliacrilamida para membranas de nitrocelulose foi efetuada conforme descrito (92), usando equipamento Trans-Blot System (Bio-Rad Laboratories). Após a eletroforese os géis foram apostos sobre membranas de nitrocelulose (Amersham), recobertos com papel de filtro e comprimidos com esponjas. Todos os materiais foram embebidos em tampão de transferência e em seguida, encaixados em placas acrílicas perfuradas e mergulhados na câmara de eletroforese contendo o mesmo tampão. A transferência foi efetuada à voltagem constante de 100 V por 1 hora e meia. As membranas foram então coradas com Ponceau S para a localização das bandas protéicas, recortadas em tiras e incubadas por 16 horas (*overnight*) em PBS contendo 5% de leite desnatado (p/v) (PBS-Molico). Após a lavagem das fitas com PBS contendo 0,1% de tween 20, as mesmas foram incubadas por 1 a 2 horas com anti-Bcl-2 ou anti-actina (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA). As fitas receberam cinco lavagens de 5 minutos cada e foram posteriormente incubadas com anti-IgG conjugado com peroxidase (Zymed), espécie-específico por 1 hora. Após a lavagem das fitas, o desenvolvimento de cor foi obtido com 15 mg (p/v) de 4-cloro-1- α -naftol (Sigma) dissolvido em 5,0 mL (v/v) de metanol e 25 mL (v/v) de Tris-HCl 0,1 M pH 6,8 acrescido com 50 μ L (v/v) de H₂O₂ a 30% (Perhidrol, Sigma). A reação foi bloqueada, lavando-se as tiras em água destilada. Quando necessário, a revelação também foi realizada por quimioluminescência utilizando Kit ECL (Amersham Pharmacia), seguindo as instruções do fabricante.

3.15. Leucograma

3.15.1 Contagem total de leucócitos circulantes

Os animais foram anestesiados com solução composta por xilazina (Rumpum®) e quetamina (Ketalar®), em uma proporção de 1:1, diluída em PBS, pH 7,4, na proporção de 1:2. A contagem total de leucócitos no sangue periférico foi realizada a partir do sangue colhido da cauda, desprezando-se a primeira gota. As amostras foram diluídas a 1:20 (v/v) com líquido de Turk, em pipetas conta-glóbulos de Thoma e homogeneizadas em um agitador magnético, por 1 minuto. Foram desprezadas as 3 primeiras gotas, usando a seguinte para o preenchimento do Hemocitômetro de Neubauer para a contagem das células.

3.15.2. Contagem diferencial de leucócitos circulantes

Uma gota de sangue foi coletada da cauda, para a obtenção dos esfregaços de sangue, fixados e corados com corante de Rosenfeld. Foram identificadas 100 células por lâmina, determinando-se a porcentagem de linfócitos, monócitos, neutrófilo e eosinófilos. As células foram contadas em microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo.

3.16. Métodos para detecção de anticorpos anti-DNA

3.16.1. Imunofluorescência Indireta (IFI)

Lâminas foram preparadas a partir de uma cultura de *Crithidia luciliae*, obtida na Disciplina de Parasitologia da Unifesp. As culturas foram centrifugadas a 2000 RPM por 10 minutos, lavadas com PBS e ressuspensas em solução de BSA a 0,1% em água destilada. Após 10 minutos a suspensão foi distribuída sobre lâminas demarcadas (Glasstécnica, SP) de modo a formar uma película em cada orifício. As lâminas foram secas a 37°C por 10 minutos, fixadas em etanol absoluto por 10 minutos e mantidas a -20°C por até um mês. A IFI foi realizada conforme a técnica descrita a seguir:

- Os soros testes foram diluídos 1/5 em PBS.
- Um volume de 10 µl dos soros foi distribuído sobre os orifícios das lâminas previamente preparadas, incluindo sempre um controle positivo e um controle negativo.
- As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.
- As lâminas foram lavadas 2 x 15 minutos com PBS e rapidamente secas com o auxílio de papel de filtro.
- Um volume de 10 µl de anticorpo anti-IgM ou anti-IgG murino conjugado a FITC (SIGMA), diluído em PBS de acordo com determinação prévia, foi distribuído sobre cada orifício e as lâminas incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos.

- A seguir, as lâminas foram novamente lavadas 2 x 15 minutos com PBS, rapidamente secas e montadas sob lamínulas com glicerina tamponada contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio.

- A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência (Olympus BX 50), empregando um aumento de 400x.

- Foram consideradas positivas apenas as reações em que o cinetoplasto apresentava fluorescência, independentemente de outras reações inespecíficas.

3.16.2. ELISA para detecção de anticorpos anti-DNA nativo

3.16.2.1. Purificação de DNA de timo de vitelo

DNA de timo de vitelo (ctDNA) obtido comercialmente (Sigma) foi solubilizado em solução Tris-HCl 0,5M pH 8,0 (10 mM) e EDTA sódico (1 mM) para uma concentração de 1mg/mL. Para obtenção de ctDNA livre de proteínas, foi empregada extração com fenol-clorofórmio. O ctDNA bruto foi misturado volume a volume com uma solução de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). A mistura foi homogeneizada por 10 minutos, distribuída em microtubos e centrifugada a 13.000 x g por 10 minutos. A fase aquosa foi removida e novamente submetida ao processo de extração. A nova fase aquosa resultante foi a seguir extraída sequencialmente com iguais volumes de clorofórmio e de éter. Após a remoção do éter, o ctDNA foi precipitado pela adição de igual volume de isopropanol na presença de acetato de sódio 0,3M e manutenção da mistura a -20°C por uma hora. O ctDNA precipitado foi recolhido por centrifugação a 13.000 x g por 10 minutos, lavado

sequencialmente com etanol 70% e etanol absoluto e seco em temperatura ambiente. O material obtido, ctDNA purificado, foi ressuspenso em PBS para quantificação e estimativa de pureza. A ausência de proteínas foi estimada pela relação entre as densidades óticas (D.O.) a 260 e 280 nm (Espectrofotômetro Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech), considerando-se satisfatória uma relação >1,8. A quantificação foi obtida pela D.O. a 260 nm, considerando-se uma D.O. de 1,0 correspondente a uma concentração de 50 µg/mL. Após a purificação, o ctDNA foi usado nos testes de ELISA para detecção de anticorpos anti-DNA nativo.

3.16.2.2. ELISA

A detecção de anticorpos anti-DNA nativo nos soros dos animais foi realizada por ensaio imunoenzimático (EIA). Placas de polivinil (Corning) foram revestidas com BSA metilado (BSAm) (Calbiochem) diluído em PBS, 100 µL/poço, durante 8 h a 4°C. Após a lavagem com PBS, as placas foram sensibilizadas com 5 µg/mL de ctDNA diluído em PBS (100 µL/poço), incubando-se as placas por 18-20 h a 4°C. Depois do bloqueio dos sítios remanescentes com leite desnatado 5% (Molico) por 18 h a 4°C, as placas foram lavadas 1x com tampão nuclease S1 e a remoção de trechos de DNA fita simples foi obtida pela incubação de 100 µL/poço de uma solução contendo 4 U/mL de nuclease S1 (Gibco – BRL) em tampão nuclease S1 por 4 h em temperatura ambiente sob agitação. Após o tratamento com S1 as placas foram lavadas 2 x com PBS contendo Tween a 0,05% (PBS-Tween). Em seguida os soros foram testados em duplicata, diluídos (1:200) em diluente de soro, colocando-se 100 µL/poço e incubando-se por 90 minutos sob agitação em

temperatura ambiente. Após três lavagens com PBS-Tween um volume de 100 μL /poço de anticorpo anti-IgG ou IgM murino conjugada a peroxidase (Zymed), diluídos em diluente de conjugado, foi adicionado e as placas foram incubadas por 2 h sob agitação em temperatura ambiente. As placas foram lavadas 2 x com PBS-Tween e 1 x com PBS. Para detecção da reação, 100 μL /poço de o-fenilenodiamina (OPD, 1 mg/mL, Sigma) dissolvido em tampão citrato/fosfato 100 mM pH 5,8, contendo 0,05% (v/v) H_2O_2 (Perhidrol, Merck) foram adicionados e as placas foram mantidas ao abrigo da luz em temperatura ambiente. A reação foi interrompida após o aparecimento de cor com 50 μL /poço de H_2SO_4 4N. Os resultados foram avaliados por leitura espectrofotométrica (EIA reader Titetek, Multiskan, MCC340) em comprimento de onda 492 nm.

3.17. Análise estatística.

A análise estatística foi feita usando-se teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste *post hoc* de Tukey ou teste T de Student. Níveis de significância menor que 0,05 foram considerados.

4. Resultados

4.1. O modelo de irradiação seletiva e células B-1

Considerando-se dados da literatura que mostram efeito benéfico da irradiação ionizante na evolução do lúpus murino (37, 38, 93) e humano (94), animais (NZB/NZW) F1 fêmeas foram irradiados com 9 Gy na região toracoabdominal, protegendo-se a medula óssea dos membros anteriores e posteriores com dispositivo de chumbo, como ilustrado na Figura 1.

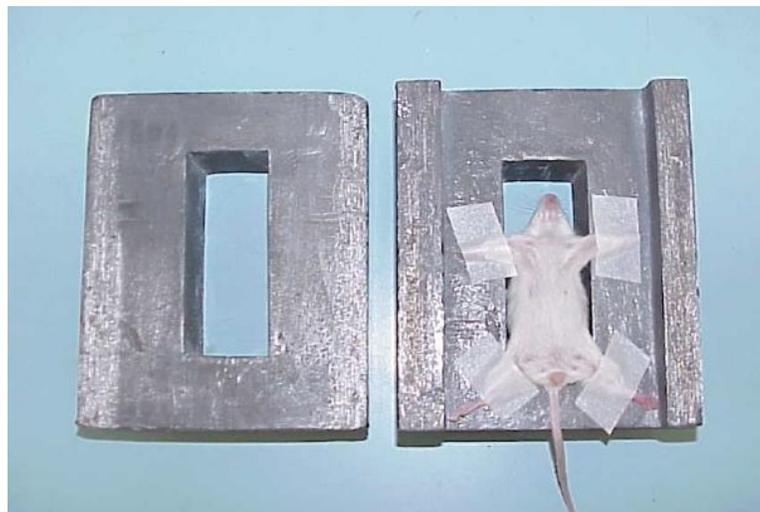


Figura 1: Dispositivo de chumbo para irradiação seletiva da região toracoabdominal.

Os animais foram anestesiados e em seguida foram submetidos à irradiação ionizante seletiva com 9 Gy em Gammacell®3000 Elan (Nordion International Inc.). A medula óssea dos membros anteriores e posteriores ficaram protegidas por peça de chumbo.

Dados da literatura mostram que a depleção de células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos previne a evolução do lúpus eritematoso sistêmico (85, 86)

Para se padronizar a depleção de células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos por irradiação, animais da linhagem BALB/c foram irradiados com 9 Gy na região toracoabdominal, protegendo-se a medula óssea dos membros anteriores e posteriores. Após 48 h, foi realizado lavado da cavidade peritoneal e as células coletadas submetidas à dupla marcação com anti-CD11b e anti-CD45 para análise em citômetro de fluxo.

A figura 2 mostra acentuada redução das células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c após irradiação. A porcentagem destas células nos animais não-irradiados fica em torno de 30%, enquanto que para os animais submetidos à irradiação, a população de células B-1 diminui para 1,94%.

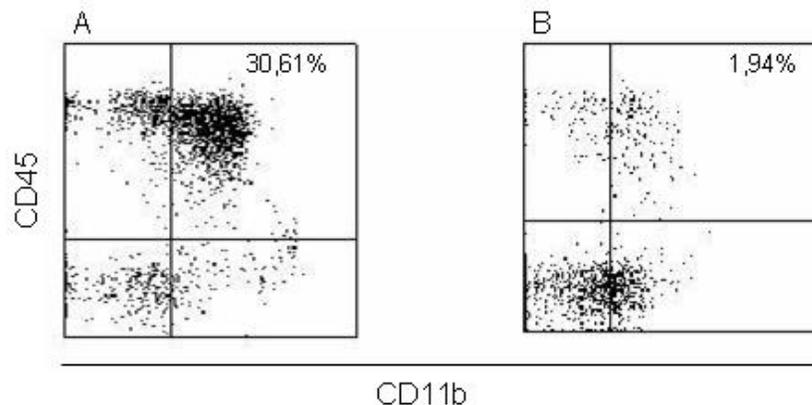


Figura 2: Eliminação da célula B-1 pela irradiação seletiva. Análise por citometria de fluxo das células da cavidade peritoneal de camundongos BALB/c. Células B-1 foram duplamente marcadas para anti-CD45 (PE) e anti-CD11b (FITC) **(A)** não-irradiado e **(B)** irradiado.

4.2. Efeito da irradiação seletiva no lúpus murino

4.2.1. Sobrevida

A sobrevida dos animais (NZB/NZW) F1 tratados com irradiação foi estatisticamente maior quando comparada aos camundongos não-irradiados (controle) (Figura 3). Ao longo do experimento, foi observado que os animais do grupo controle morreram entre 8 e 10 meses de idade, enquanto que os animais tratados, sobreviveram até os 16 meses de idade .

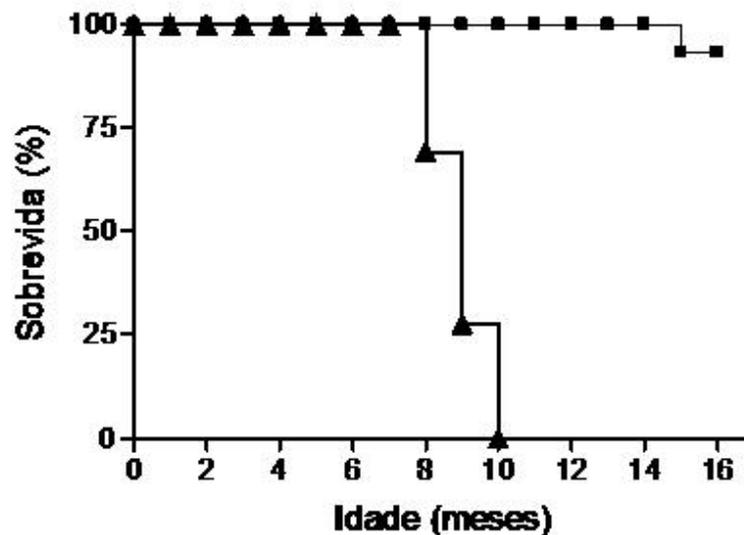


Figura 3: Repetidas doses de radiação ionizante aumentam sobrevida em modelo experimental de lúpus. Aos três meses de idade, camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas foram expostos a 9 Gy de irradiação por dez meses consecutivos (quadrados). Camundongos não-irradiados foram usados como controle (triângulos). A sobrevida dos animais foi monitorada até os 16 meses de idade. A diferença estatística foi avaliada pelo teste Student's *t*. $P < 0.001$.

4.2.2. Análise macroscópica

A análise do baço dos animais mostrou que o peso, coloração e dimensões apresentavam variações entre o grupo irradiado e não-irradiado. Nos animais do grupo controle, os baços apresentavam-se maiores e mais escuros que os dos camundongos irradiados (Figura 4). Além disso, os animais irradiados não apresentaram anasarca nem pêlos eriçados (dados não mostrados), características comuns em camundongos lúpicos.

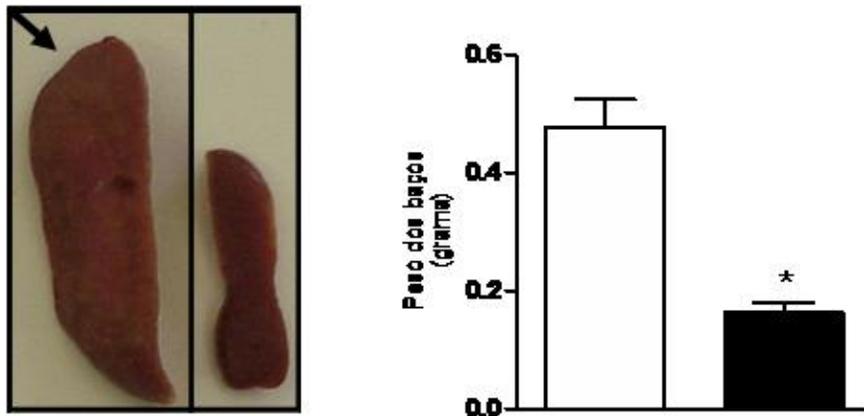


Figura 4: Radiação seletiva diminui consideravelmente esplenomegalia. Fotomicrografia e gráfico comparativo do peso do baço de animais (NZB/NZW) F1. A seta indica o baço de animal controle (não-irradiado). * $P < 0,01$; em relação ao controle.

4.2.3. Histopatologia dos rins

Os rins dos camundongos (NZB/NZW) F1 jovens (seis semanas), lúpicos e tratados foram fixados em líquido de Bouin, incluídos em parafina e cortados em micrótomo. Os cortes foram fixados em lâminas de vidro e corados por hematoxilina e eosina.

A figura 5A mostra corte histológico do rim de animal (NZB/NZW) F1 jovem (6 semanas) quando ainda não apresentava sinais da doença (grupo controle). Pode-se notar que o parênquima renal está com estrutura geral preservada. Os glomérulos apresentam arquitetura normal, sem alterações histológicas. Não há hiperplasia endo ou extracapilar e a membrana basal capilar está íntegra. Não se observam alterações túbulo-intersticiais inflamatórias ou esclero-atróficas. O compartimento vascular não está alterado. Em contraposição, nos animais não-irradiados (doentes), os cortes histológicos revelam comprometimento difuso, global e homogêneo dos glomérulos. As alterações glomerulares são caracterizadas por hiperplasia endocapilar, exsudação neutrofílica, acentuação da lobulação e isquemia. Focalmente, a membrana glomerular capilar está espessada por depósitos submembranosos. Os túbulos exibem alterações degenerativas vacuolares. Nos interstícios, predominantemente junto aos vasos, observam-se acúmulos inflamatórios linfomono-plasmocitários. O compartimento vascular está preservado. O conjunto de alterações é consistente com nefrite lúpica classe IV da OMS (Figura 5 B e C).

A análise histopatológica dos rins dos animais irradiados mostra parênquima renal com estrutura geral preservada. Os glomérulos têm arquitetura normal, parênquima renal com estrutura geral preservada, exibindo focalmente discreta celularidade mesangial. Não há alterações histológicas tubulares ou intersticiais significativas (Figura 5 D).

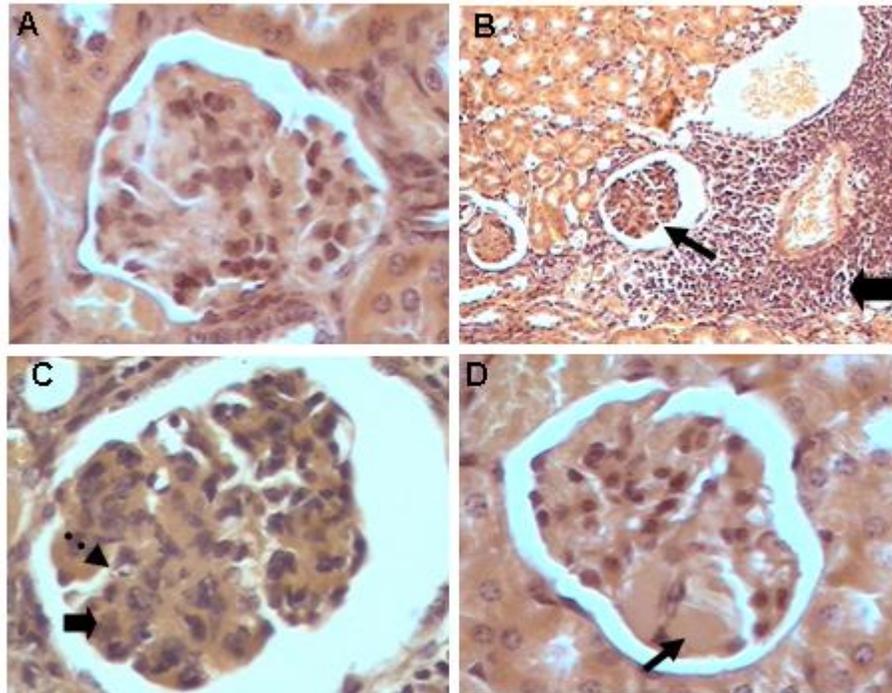


Figura 5: Cortes histológicos para avaliação do parênquima renal de animais sadios, lúpicos e tratados. Os fragmentos dos rins foram fixados em líquido de Bouin e os cortes corados pela técnica de hematoxilina eosina (H.E.). (A) Grupo Controle: parênquima renal com estrutura geral preservada, glomérulos com arquitetura íntegra, sem alterações histológicas; (B) Grupo não tratado (doentes): cortes histológicos revelam comprometimento difuso, global e homogêneo dos glomérulos, com acentuada lobulação glomerular (seta fina) e acúmulos inflamatórios linfomono-plasmocitários (seta larga) (10x); (C) Grupo não tratado (doentes): hiper celularidade endocapilar (seta larga) e exsudação neutrofílica (seta pontilhada) (40x); (D) Irradiado (tratado): parênquima renal com estrutura geral preservada, glomérulos com arquitetura normal. No interior de alças capilares, observam-se massas hialinas com aspecto consistente com pseudotrombos (seta) (40x).

4.2.4. Produção de auto-anticorpos séricos

4.2.4.1. Imunofluorescência

Para verificar a presença de auto-anticorpos no soro dos animais, foi utilizado o método de imunofluorescência indireta, que utiliza lâminas preparadas a partir de cultura de *Crithidia luciliae*. Foi observada a presença de auto-anticorpos anti-DNA em camundongos controle, mas não em camundongos tratados (Figura 6).

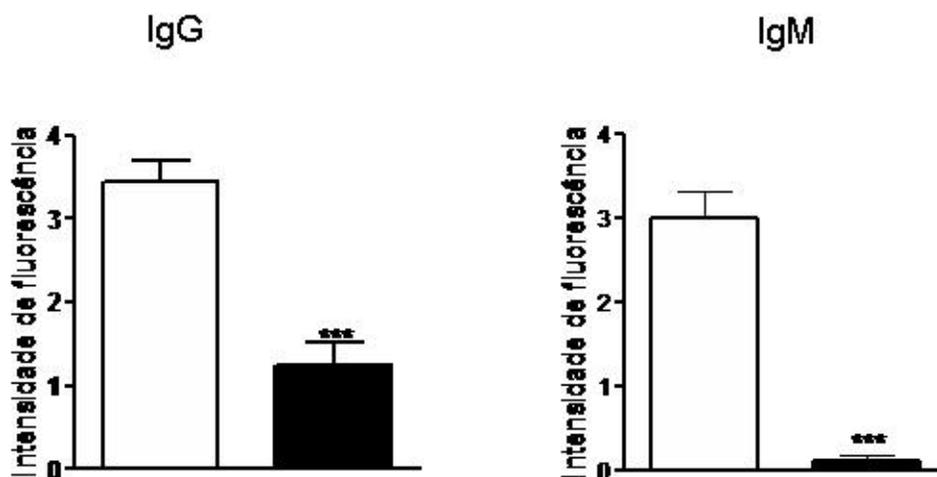


Figura 6: Irradiação seletiva diminui IgG e IgM anti-DNA em soro de (NZB/NZW) F1. A imunofluorescência indireta (IFI) para detecção de anticorpos anti-DNA foi realizada a partir de lâminas de *Crithidia luciliae*. É observada a presença de altos títulos de anticorpos anti-DNA em camundongos não-irradiados (barras brancas), mas não em camundongos tratados (barras pretas). (***) $P < 0.0001$.

4.2.4.2. ELISA

Corroborando os dados da figura anterior, a figura 7 mostra ELISA para detecção de anticorpos anti-DNA. DNA de timo de vitelo foi utilizado como substrato. Tanto a produção de IgG quanto de IgM para antígenos próprios foi significativamente diminuída nos soros dos camundongos irradiados, quando comparados com os animais controle (não-irradiados). Além disso, interessante, os níveis de IgG e IgM totais dos soros dos camundongos mantiveram-se estáveis (Figura 8), havendo, porém, uma redução específica para anticorpos contra DNA (Figura 7). Esses dados sugerem que a irradiação seletiva afetaria somente a produção de anticorpos “patogênicos”, deixando intactos os clones produtores de outras imunoglobulinas.

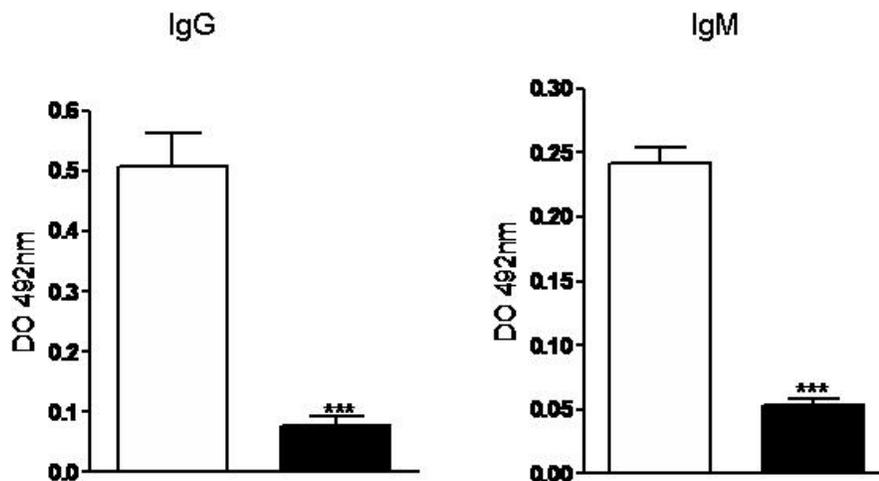


Figura 7: Irradiação diminui auto-anticorpos contra DNA no soro de animais (NZB/NZW) F1. A detecção de anticorpos anti-DNA nativo nos soros dos animais foi realizada por ensaio imunoenzimático (EIA). Placas de polivinil foram revestidas com DNA de timo de vitelo. Anticorpos anti-IgG ou IgM murinos conjugados a peroxidase foram usados para detecção dos auto-anticorpos. É observada a presença de altos títulos de anticorpos anti-DNA no soro de camundongos não-irradiados (barras brancas), mas não em camundongos tratados (barras pretas). (***) $P < 0.0001$.

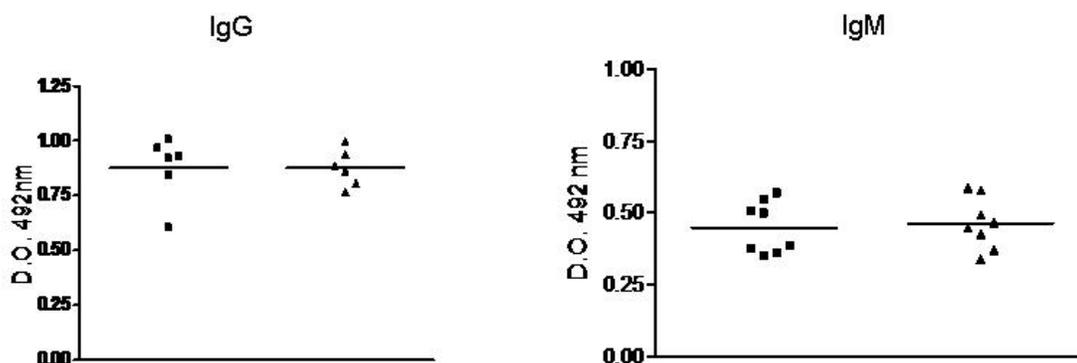


Figura 8: Níveis séricos de IgG e IgM totais não são alterados após irradiação. Quadrados – grupo irradiado; Triângulos - grupo não-irradiado.

4.3 Radiação ionizante não modifica a população de células B-1 peritoneais em camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas.

Camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas foram submetidos a consecutivas doses de irradiação ionizante. Ao contrário do observado nos camundongos BALB/c, animais desta linhagem não apresentaram redução na população de células B-1 da cavidade peritoneal 48 h após irradiação. A Figura 9 mostra citometria de fluxo de lavado peritoneal de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas irradiados ou não. É possível observar que não houve diferença entre a população de células B-1 nos animais irradiados (Figura 9B), em relação aos animais controle (Figura 9A). Outrossim, essas células resistentes à radiação são predominantemente CD5⁺, caracterizando-as como células B-1a (Figura 9C).

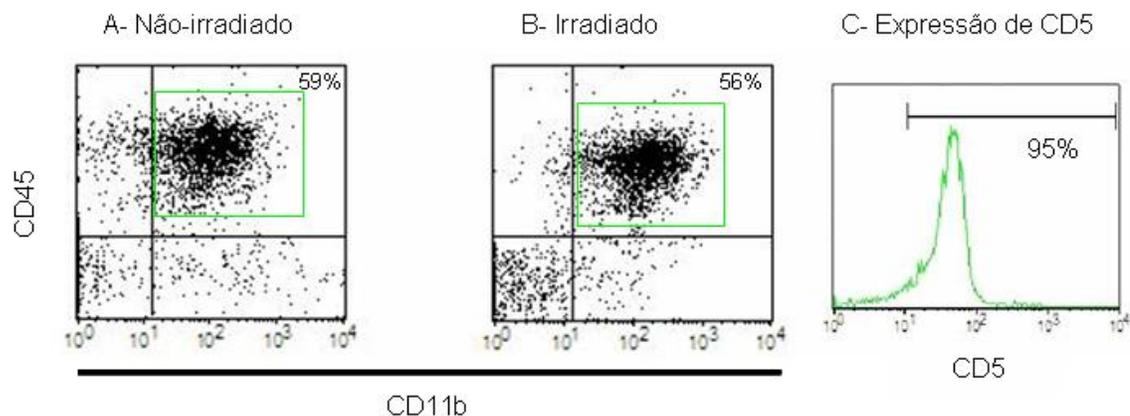


Figura 9: Radiação ionizante não modifica a população de células B-1 em camundongos (NZB/NZW) F1, que são predominantemente B-1a. Análise por citometria de fluxo das células da cavidade peritoneal de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas irradiados ou não. Não houve redução das células B-1 nos animais irradiados (B) em relação aos animais controle (A). Essas células são CD5⁺, caracterizando-as como células B-1a (C).

4.4. Radiorresistência em células B-1 é inerente ao camundongo (NZB/NZW)

F1 fêmeo.

No intuito de verificar se a radiorresistência das células B-1 nas fêmeas dos camundongos (NZB/NZW) F1 era também observada nas linhagens parentais, camundongos das linhagens NZB e NZW, foram irradiados com 9 Gy na região toracoabdominal, como descrito em material e métodos. Surpreendentemente, assim como mostrado nos camundongos BALB/c (Figura 2), houve considerável depleção das células B-1 na cavidade peritoneal destas linhagens quando analisadas por citometria de fluxo (Figura 10). Este dado indica que a resistência à radiação parece ser própria da linhagem do camundongo, visto que, somente nos animais (NZB/NZW) F1 fêmeos, as populações de B-1 mantiveram-se estáveis mesmo após consecutivas doses de irradiação.

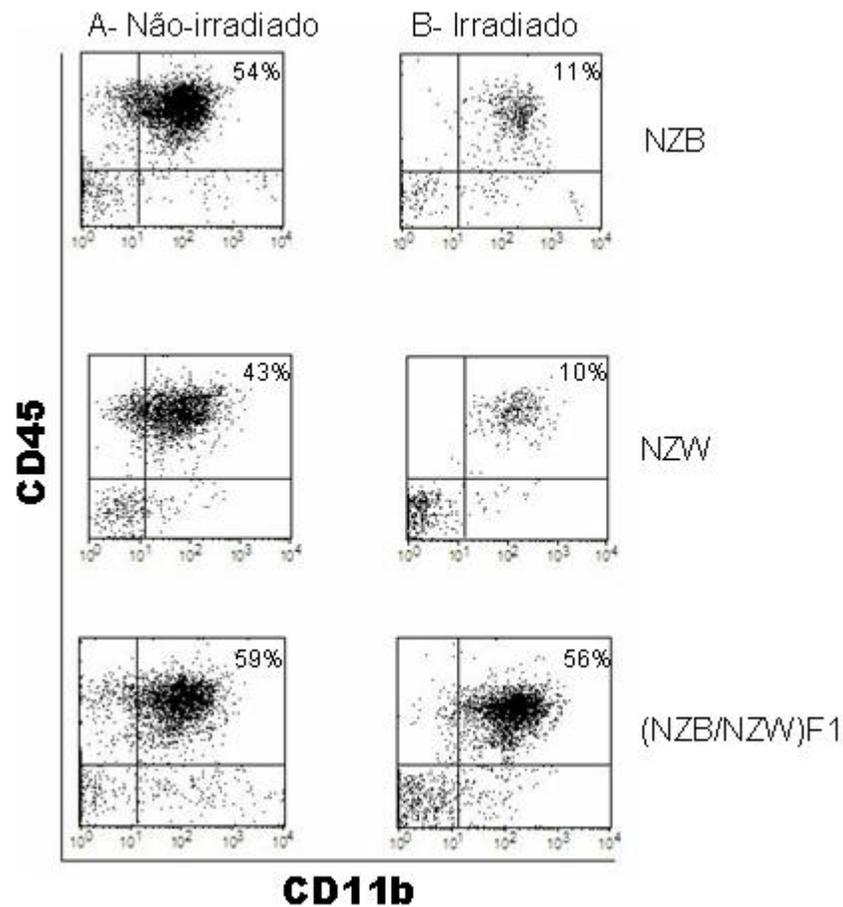


Figura 10: Radiorresistência em células B-1 é própria dos camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas. Citometria de fluxo de lavado peritoneal de camundongos das linhagens NZB, NZW, e (NZB/NZW) F1 fêmeas. Houve considerável depleção das células B-1 na cavidade peritoneal destas linhagens, com exceção dos animais (NZB/NZW) F1 fêmeas. (A) Não-irradiado, (B) Irradiado.

4.5. Células B-1 são mantidas *in vitro* após irradiação seletiva e produzem continuamente IL-10 e IgM.

Culturas de células peritoneais de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas foram realizadas, conforme descrito em material e métodos, para verificar possível diferença na produção de fatores nas populações celulares após o tratamento dos animais com irradiação. A Figura 11 mostra que as células B-1 em cultura mantiveram-se com porcentagens muito aproximadas entre os grupos irradiado ou não-irradiado.

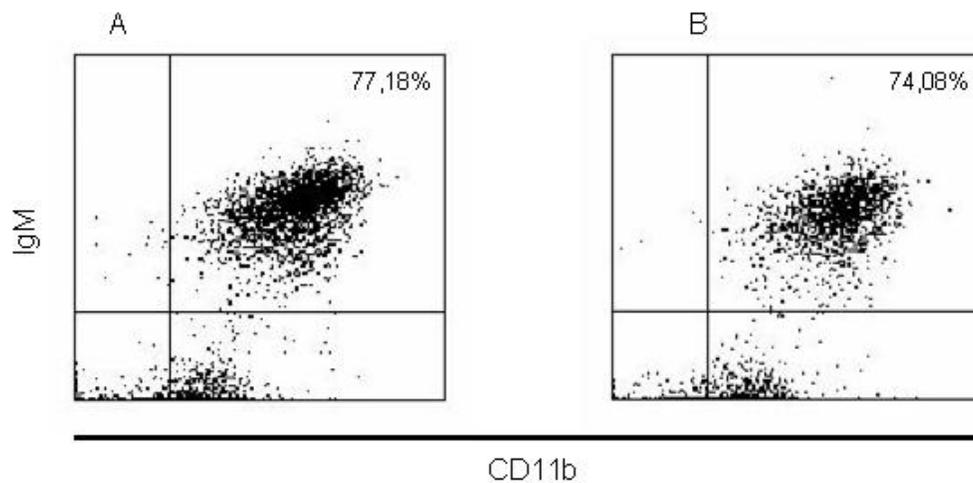


Figura 11: Células B-1 permanecem em cultura após irradiação. Citometria de fluxo mostrando porcentagem de células B-1 (CD11b+ IgM+) em cultura de cinco dias da cavidade peritoneal de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas não-irradiados (A) e irradiados (B).

Dados da literatura mostraram que células B-1 produzem altas quantidades de IL-10 (95) e que utilizam esta citocina como fator de auto-renovação. Além disso, este subtipo de linfócitos B tem a capacidade de secretar espontaneamente anticorpos da classe IgM. Dessa maneira, a produção de IL10 e IgM pelas células B-1 dos camundongos irradiados e não-irradiados foi testada *in vitro*. Esses fatores foram medidos nos sobrenadantes de cultura de células B-1 após períodos pré-determinados de cultura. As Figuras 12 e 13 mostram que, apesar da irradiação, células B-1 continuamente produzem IL10 e IgM em quantidades similares às aquelas produzidas por células B-1 de animais não-irradiados.

Esses dados sugerem que a população de células B-1 radorresistentes na cavidade peritoneal destes animais, sobrevivem em cultura e estão, aparentemente, funcionalmente inalteradas, mesmo após sucessivas doses de irradiação.

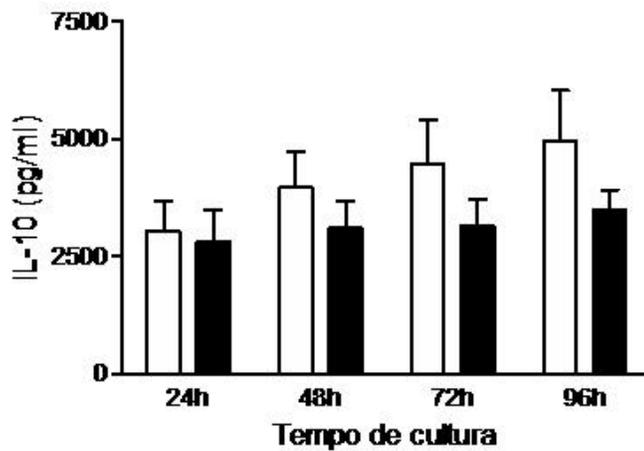


Figura 12: Irradiação não interfere na síntese de IL-10 pelas células B-1 *in vitro*. Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos diariamente após o cultivo das células. As barras não-preenchidas (brancas) indicam a quantidade de IL-10 em pg/mL produzida pelas células B-1 de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas não-irradiados; as barras preenchidas (pretas), dos animais irradiados. Observa-se que não há diferença na síntese de IL-10 por células B-1 provenientes dos dois grupos de camundongos.

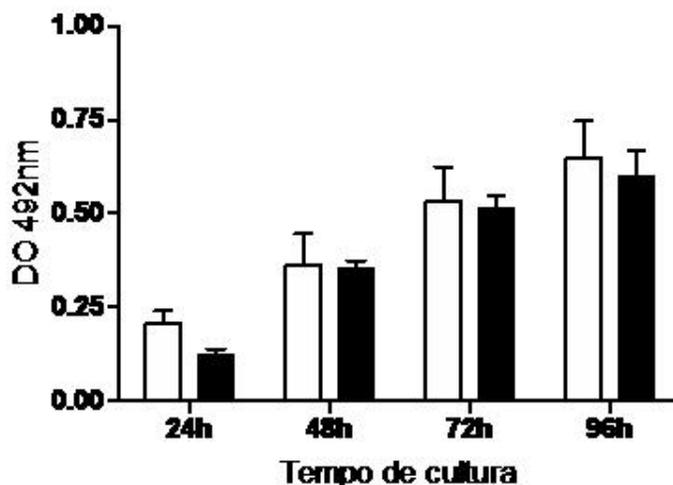


Figura 13: Irradiação não interfere na produção de IgM pelas células B-1 *in vitro*. Os sobrenadantes das culturas foram recolhidos diariamente após o cultivo das células. As barras brancas indicam a densidade óptica (DO) de IgM produzida pelas células B-1 de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas não-irradiados. As barras pretas representam os animais irradiados. Observa-se que não há diferença na síntese de IgM por células B-1 provenientes dos dois grupos de camundongos.

4.6. Células B-1 radorresistentes superexpressam Bcl-2

Na tentativa de encontrar um mecanismo que sustentasse a radorresistência nos linfócitos B-1, células recém coletadas da cavidade peritoneal foram submetidas à purificação por *beads* magnéticas. Após a eluição, as células foram analisadas por citometria de fluxo para confirmação da pureza da amostra (Figura 14). Extratos celulares foram obtidos de células B-1 purificadas e as dosagens protéicas foram realizadas segundo o método de Bradford (1). As amostras em análise foram diluídas, fervidas e aplicadas no gel de poliacrilamida, como descrito em material e métodos. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados pelo método *Coomassie brilliant blue* para a

coloração de proteínas ou então transferidos para membranas de nitrocelulose. A Figura 15 mostra intensa reação por *immunoblotting* em membrana de nitrocelulose para o anticorpo anti-Bcl-2 nas células B-1 dos camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos irradiados ou não.

O dado obtido sugere que camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos apresentam, na população de células B-1 da cavidade peritoneal, expressão constitutiva da molécula anti-apoptótica Bcl-2. É provável que essa proteína seja a principal responsável na resistência à irradiação observada nessas células.

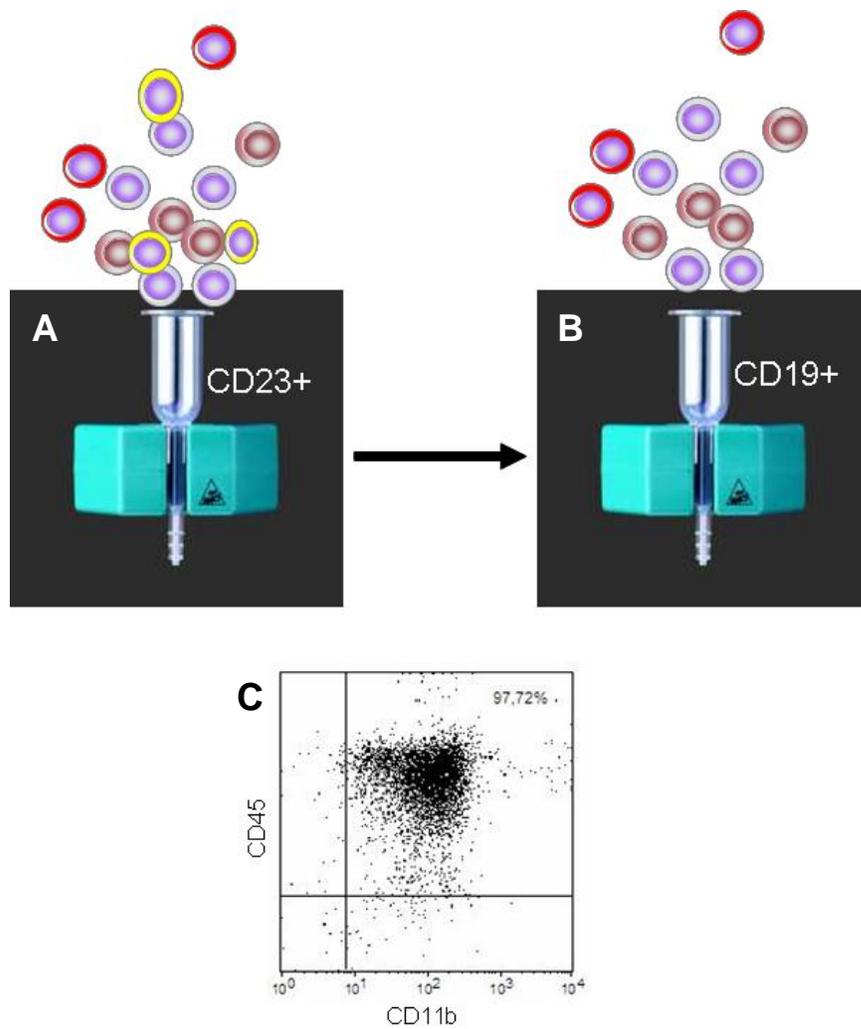


Figura 14: Figura 2: Porcentagem de células B-1 da população celular peritoneal após purificação. Células coletadas diretamente do lavado peritoneal, 6h após última irradiação, foram purificadas por *beads* magnéticas, utilizando-se inicialmente *beads* magnéticas revestidas com anti-CD23 para retirada de células B-2 (A). Após esta primeira seleção, este conjunto de células negativas para CD23, foi positivamente selecionada com *beads* magnéticas revestidas com anti-CD19 (B). Depois da eluição, as células foram submetidas à análise por citometria de fluxo para confirmação da pureza das células B-1. Estas células foram marcadas para CD11b e CD45 (C).

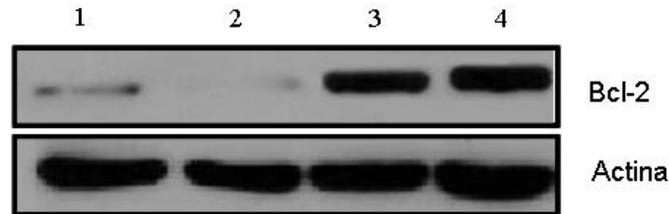


Figura 15: Células B-1 radorresistentes superexpressam Bcl-2. Para o *immunoblotting* em membrana de nitrocelulose, os extratos celulares foram obtidos de células B-1 purificadas e as dosagens protéicas foram realizadas segundo método de Bradford (1). Observa-se intensa reação com o anticorpo anti-Bcl-2 nas células B-1 dos camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos irradiados ou não e níveis basais para o mesmo anticorpo em camundongos BALB/c. Nesta figura, (1) indica extrato protéico de células B-1 purificadas de camundongo BALB/c não-irradiado, (2) BALB/c irradiado, (3) células B-1 de camundongo (NZB/NZW) F1 fêmeos não-irradiado e (4) (NZB/NZW) F1 irradiado.

4.7. Como a irradiação confere resistência ao lúpus murino após irradiação?

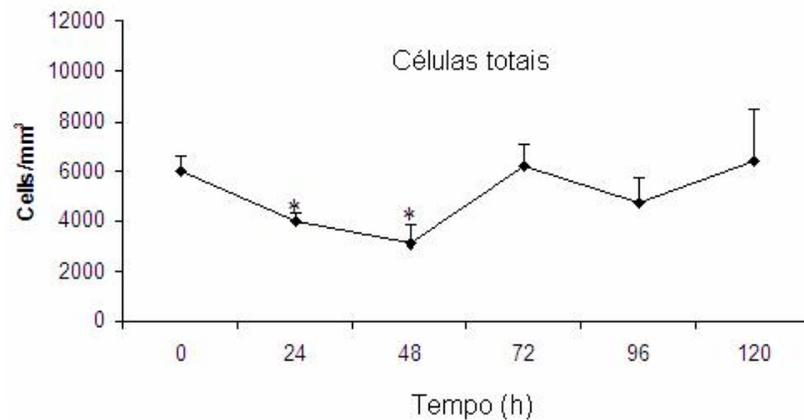
Considerando que as células B-1 parecem não estar diretamente envolvidas com o lúpus eritematoso sistêmico neste modelo experimental, decidimos verificar se a irradiação seletiva poderia alterar outras populações celulares que eventualmente estariam envolvidas na patogênese do LES. Assim, as células da cavidade peritoneal, sangue periférico e baço foram avaliadas.

A irradiação seletiva induziu significativa alteração no padrão de leucócitos circulantes, induzindo mudanças no número total dos glóbulos brancos. Após 24 e 48 h da irradiação, foi observada uma queda significativa no número dos leucócitos (Figura 16A). A contagem diferencial leucocitária mostrou declínio significativo no número de linfócitos

24 h e 48 h após irradiação (Figura 16B). Entretanto, os valores das contagens total e diferencial foram normalizados 72 h após irradiação. A contagem do número absoluto e das porcentagens das células TCD4, TCD8, B-2 e macrófagos da cavidade peritoneal também foram restabelecidas 72 h após irradiação (Figura 17). Contudo, interessante, as mesmas células (TCD4, TCD8, B-2 e macrófagos) exibiram um longo atraso em repopular o baço (aproximadamente vinte dias), como mostrado na Figura 18.

Esses resultados sugerem que os possíveis clones auto-reativos que poderiam estar presentes no baço dos animais, foram eliminados após irradiação ionizante. Assim, parece razoável especular que o tratamento periódico com irradiação seletiva, pode elidir células auto-reativas do baço, não havendo tempo hábil para que as populações celulares neste órgão sejam restauradas e induzam doença auto-imune.

A- Número total de leucócitos do sangue periférico:



B- Contagem leucocitária diferencial do sangue periférico:

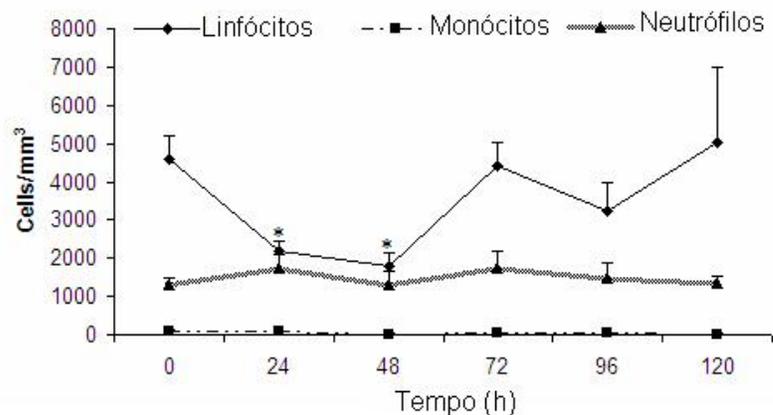


Figura 16: População leucocitária do sangue periférico é restabelecida 72h após irradiação seletiva em camundongos (NZB/NZW) F1. (A) Número total de leucócitos circulantes no sangue periférico antes (tempo 0) e 24, 48, 72, 96 e 120 horas após a irradiação seletiva dos camundongos (NZB/NZW) F1. Os resultados expressam a média \pm e.p.m. * $P < 0,05$, por comparação dos animais dos grupos 24, 48h com o tempo inicial (0h). (B) Contagem leucocitária diferencial do sangue periférico. Os dados mostram a média \pm e.p.m. * $P < 0,05$, por comparação dos linfócitos dos animais dos grupos 24, 48h com o tempo inicial (0h). Não há diferença na contagem de monócitos e neutrófilos do sangue periférico após irradiação dos animais.

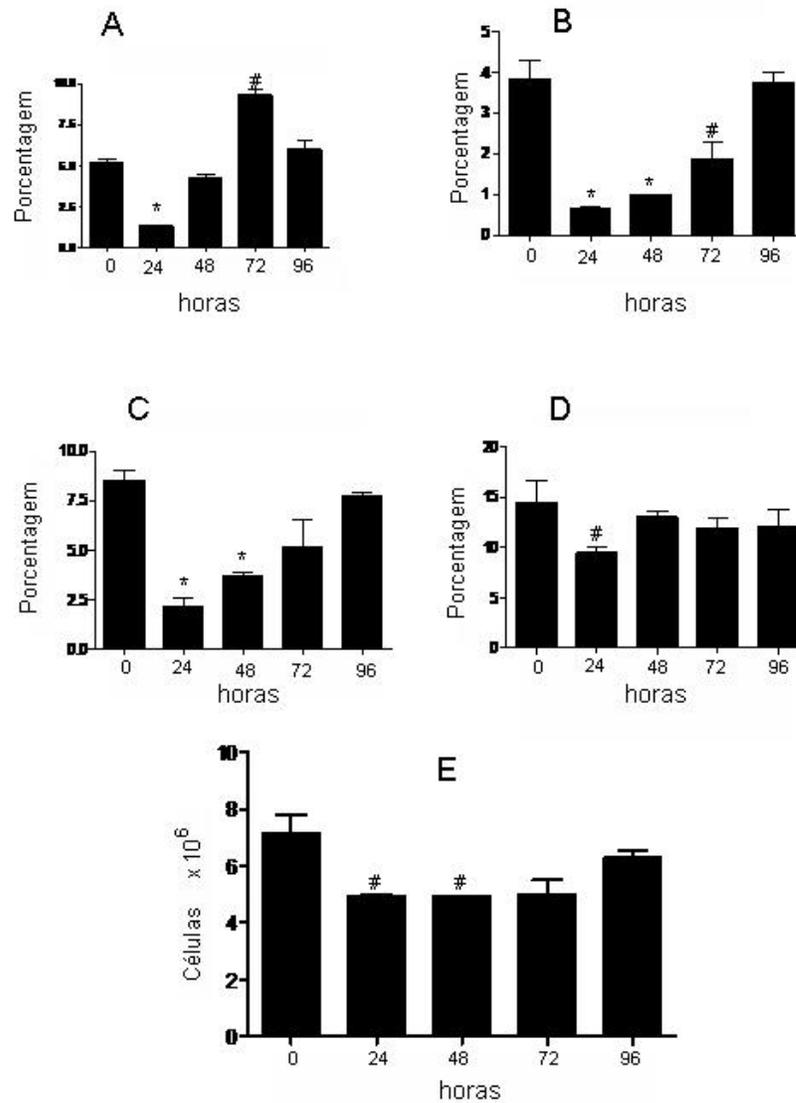


Figura 17: Porcentagens e contagem do número absoluto de células peritoneais após irradiação seletiva em camundongos (NZB/NZW) F1. As populações celulares de TCD4, TCD8, B-2, macrófagos (citometria de fluxo) e a contagem do número absoluto das células da cavidade peritoneal de animais (NZB/NZW) F1 irradiados, foram restabelecidas 72 h após irradiação. **(A)** TCD4 (CD4+ CD3+ CD5+), **(B)** TCD8 (CD8+ CD3+ CD5+), **(C)** B-2 (CD23+ CD19+ CD11b-), **(D)** MØ (CD11b+ CD5- CD19-) e **(E)** contagem do número total de células peritoneais em câmara de Neubauer. Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (0h). Teste Student: *P<0.005, #P<0.05.

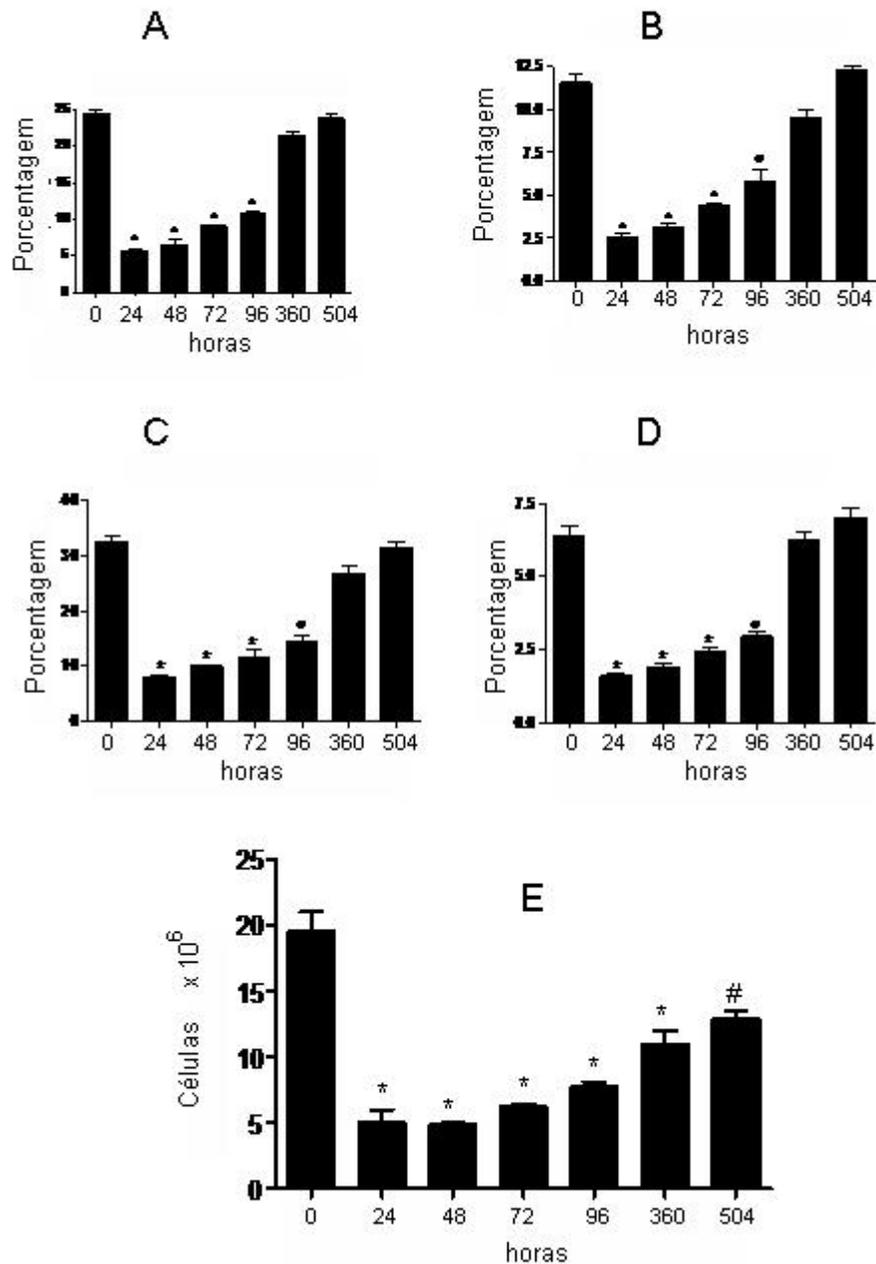


Figura 18: Atraso em repopular células do baço de camundongos (NZB/NZW) F1 após irradiação seletiva. Porcentagem e contagem do número absoluto dos esplenócitos apresentam longo atraso em restaurar populações celulares do baço. Observa-se que a restituição dos esplenócitos ocorre aproximadamente no vigésimo dia após irradiação. (A) TCD4 (CD4+ CD3+ CD5+), (B) TCD8 (CD8+ CD3+ CD5+), (C) B-2 (CD23+ CD19+ CD11b-), (D) MØ (CD11b+ CD5- CD19-) e (E) contagem do número total de células peritoneais em câmara de Neubauer. Estatisticamente significativo quando comparado com o controle (0h). Teste Student: *P<0.005, #P<0.05.

5. Discussão

Dados da literatura mostram resultados positivos no controle da progressão do Lúpus Eritematoso Sistêmico em camundongos (38, 93, 96) e humanos (94, 97) com doses de irradiação fracionada, conhecida como irradiação linfóide total (ILT). Este tratamento induz remissão de doenças em alguns modelos, incluindo artrite (98, 99) e lúpus (93, 100). Entretanto, não é totalmente esclarecido como a irradiação exerce efeitos benéficos em doenças auto-imunes.

O envolvimento de células B-1 em doenças auto-imunes é relatado em alguns trabalhos. Por exemplo, em camundongos NZB/xid e (NZB/NZW) F1/xid, que congenitamente não possuem células B-1 (81), há produção diminuída de auto-anticorpos e os sinais da doença estão reduzidos (54, 82). *In vivo*, a eliminação de células B-1 peritoneais por injeções repetidas de anticorpos anti-IL-10 (83, 84) ou injeção peritoneal de água (85) em camundongos (NZB/NZW) F1, os sinais da doença são consideravelmente reprimidos. Quando células B-1, mas não células B-2, são transferidas de camundongos transgênicos 2-12H/Fas^{lpr} para animais Fas^{lpr}, são geradas células secretoras de anticorpos anti-Sm nos linfonodos mesentéricos e lamina própria (101).

Existem evidências que as células B-1 são sensíveis à radiação ionizante (88). Dessa maneira, em nosso estudo, o principal objetivo foi aplicar a irradiação gama toracoabdominal em camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos para investigar a evolução dos sinais do lúpus nesses animais e estabelecer uma possível relação entre a evolução da doença e células B-1.

O modelo experimental constituiu na aplicação de doses de irradiação de 9 Gy na região toracoabdominal, durante 10 meses consecutivos. Ao longo do experimento, animais do grupo controle (não-irradiados) morreram com idade média de 8 meses. No grupo dos animais irradiados, todos os animais estavam vivos aos 13 meses de idade.

Nesta idade, parte dos animais tratados foi sacrificada e parte mantida sob observação até 16 meses, quando foram também sacrificados. A diferença na sobrevivência dos animais tratados e controles foi estatisticamente significativa, já que 100% da população tratada com radiação sobreviveu. Estes resultados confirmam os dados da literatura, onde se relata que 90% da população de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas morrem neste mesmo período (52). Além disso, a radiação ionizante suprime a esplenomegalia e edema generalizado, bem como a nefrite lúpica e a produção de auto-anticorpos. Esses achados corroboram dados da literatura mostrando expressiva melhora da doença em camundongos MRL-*lpr/lpr* (37, 102) e (NZB/NZW) F1 (96) submetidos a irradiação.

O método aqui utilizado, indubitavelmente, depleta a população de células B-1 em camundongos BALB/c, NZB e NZW. Surpreendentemente, ao contrário das outras linhagens, o número de células B-1 da cavidade peritoneal de animais (NZB/NZW) F1 fêmeas não apresentou redução após a irradiação. Observamos cerca de 60% desta população celular nos animais não-irradiados e 56% nos camundongos irradiados. Não somente as células estavam presentes na cavidade peritoneal, como foram observadas em cultura de células peritoneais de sete dias, o que indica resistência à radiação ionizante neste modelo experimental de lúpus.

Além disso, as células B-1 mostraram atividade normal quanto à produção de IL-10 e IgM *in vitro*. Dados da literatura demonstram que a IL-10 é uma das principais citocinas antiinflamatória produzida por células do sistema imune (95).

Demonstramos que um provável mecanismo de radiorresistência das células B-1 é a superexpressão da proteína anti-apoptótica Bcl-2. A família da proteína Bcl-2 tem papel importante na regulação em muitos sistemas celulares (97). Membros da família Bcl-2 são capazes de impedir morte celular induzida por numerosos estímulos, incluindo radiação

ionizante (80, 103). Além da superexpressão de Bcl-2 observada nas células B-1 de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos, é possível que a diferença da porcentagem de células B-1 da cavidade peritoneal de (NZB/NZW) F1 fêmeos, quando comparada a outras linhagens após irradiação, seja devido a distintas suscetibilidades à radiação, inerente a cada linhagem de camundongo. Uma explicação plausível para este fenômeno é que o mecanismo regulatório de proliferação celular possa ter sido danificado pela radiação, o qual poderia conferir resistência à radiação destas células nos camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos.

Assim, os dados que mostram a permanência de células B-1 viáveis, concomitante com a melhora da doença dos animais depois de repetidas doses de irradiação, leva-nos a crer que as referidas células possam não estar diretamente ligadas com o LES em camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeos. Neste contexto, dados da literatura mostram a não participação de células B-1 em auto-imunidade (104, 105). Em camundongos deficientes para Fas, células B-1 não contribuem para a produção de auto-anticorpos (87). Em adição, a superexpressão de IL-5 em camundongos (NZB/NZW) F1 aumenta consideravelmente o número de células B-1a. Entretanto, há notável redução da produção de anticorpos anti-DNA e ocorrência de nefrite lúpica (106).

Anticorpos contra ds-DNA são caracteristicamente encontrados e correlacionados com a atividade do LES em modelos murinos e em humanos (107). Auto-anticorpos secretados por plasmócitos auto-reativos são comuns em doenças auto-imunes sistêmicas ou órgão-específicas (108, 109). Na busca de outros fatores que possam ter levado à proteção dos camundongos em nosso modelo experimental, um dado que merece destaque foi o fato de que níveis séricos totais de IgG e IgM não foram alterados nos camundongos (NZB/NZW) F1 irradiados quando comparados aos animais controle, ao

passo que a produção de anticorpos anti-DNA foi significativamente diminuída. Dessa maneira, podemos concluir que a remissão da doença pode estar associada com a significativa queda dos níveis de auto-anticorpos pela irradiação toracoabdominal dos animais, visto que os auto-anticorpos podem contribuir direta ou indiretamente para a patogênese de doenças auto-imunes por mecanismos efetores clássicos, como a formação e deposição extensiva de imunocomplexos (107, 110).

Hoyer e colaboradores mostraram que plasmócitos de vida longa contribuem para a auto-imunidade humoral em camundongos (NZB/NZW) F1 (111). No entanto, se células secretoras de auto-anticorpos poderão se tornar plasmócitos de vida longa, dependerá do tempo e modo de geração das mesmas. Ainda não está esclarecido o mecanismo pelo qual a sobrevivência e migração de plasmócitos são reguladas. Dados da literatura sugerem que a longevidade dos plasmócitos não é (somente) uma capacidade intrínseca da célula, mas depende do ambiente aprobativo, que são nichos específicos de sobrevivência, os quais podem ser encontrados na medula óssea, tecido inflamado e baço auto-imune (112). Dados recentes da literatura mostraram que plasmócitos auto-reativos com especificidade para antígenos glomerulares, estão presentes em maior número nos rins que no baço e sangue periférico de camundongos lúpicos (113). Em pacientes com síndrome de Sjögren, auto-anticorpos anti-Ro/SSA e anti-La/SSB são produzidos por linfócitos infiltrados nas glândulas salivares desses pacientes (114). Esses dados sugerem um potencial envolvimento de auto-anticorpos produzidos localmente no tecido injuriado. Dessa maneira, em nosso modelo experimental, é possível que após irradiação ionizante, tenha ocorrido depleção de plasmócitos patogênicos localizados nos tecidos, contribuindo assim, para a remissão do LES nos camundongos (NZB/NZW) F1.

O fato de que muito mais plasmócitos são gerados durante a resposta imune adaptativa em relação àqueles que sobrevivem e tornam-se plasmócitos de vida longa, sugere que somente uma fração seleta de plasmócitos entra no “*pool*” de plasmócitos de vida longa. A competição de plasmócitos por nichos de sobrevivência presumivelmente controla o estabelecimento da imunidade humoral e imunopatologia (112). É surpreendente que os baços de camundongos (NZB/NZW) F1 forneçam dez vezes mais nichos de sobrevivência que em camundongos normais (111). Assim, pode-se especular que a irradiação inibe a emergência de clones linfóides que secretam auto-anticorpos envolvidos com a formação de imunocomplexos, ao mesmo tempo sem necessariamente afetar as células B não-patogênicas pré-existentes ou plasmócitos radorresistentes.

Acreditamos ainda que as modificações imunológicas nos camundongos irradiados têm papel importante na supressão da doença, visto que a exposição a doses sub-letais de radiação pode estimular o sistema homeostático nos camundongos (NZB/NZW) F1. É possível que esse tratamento ative o sistema imunológico aumentando o número de células imunes ativas e diminuindo o de células anômalas, embora os detalhes deste mecanismo, como mediadores solúveis e moléculas transdutoras de sinal, precisem ser esclarecidos.

O efeito protetor da irradiação neste trabalho pode também ser devido à eliminação ou redução significativa de exequíveis clones patogênicos de células B-2 e T do baço dos camundongos (NZB/NZW) F1 após irradiação. Dados da literatura descrevem diminuição de esplenócitos similar aos nossos resultados, embora de menor magnitude, após exposição a íons de ferro (115) e raios gama (116).

Pode existir uma taxa ideal de radiação para diminuição de células anormais além da escala de radiação empregada neste estudo. Entretanto, supomos que a redução dos

esplenócitos ajude a esclarecer, pelo menos em parte, a melhoria do LES neste modelo experimental, embora outros fatores possam também estar envolvidos. Dessa maneira, os dados aqui apresentados indicam que células do baço são mais afetadas pela irradiação que aquelas da cavidade peritoneal e sangue periférico. Os resultados sugerem também que a resposta dos linfócitos nos diversos compartimentos corpóreos do camundongo pode ser variável.

Assim, supomos que, em nosso protocolo com as doses mensais de irradiação, as células anormais não teriam tempo hábil para repopular os compartimentos que abrigariam nichos de clones patogênicos nem seus precursores. O efeito imunossupressivo transiente da irradiação pode ser explicado pela depleção direta de células imunocompetentes de compartimentos linfóides, ao mesmo tempo em que mantêm a capacidade generativa das células tronco dos compartimentos protegidos pelo chumbo, que também restaura o sistema imunológico ao longo do tempo.

Em conjunto, nossos resultados indicam que o tratamento com radiação ionizante toracoabdominal em camundongos (NZB/NZW) F1 influencia consideravelmente a evolução da doença. Contudo, uma relação direta entre a população de células B-1 e a evolução do LES murino não pode ser claramente estabelecida. Outrossim, células B-1 poderiam contribuir ativamente na resposta imune como células reguladoras [117] e não somente simbolizando um subgrupo celular vestigial de uma primeira linha de defesa ancestral. Além disso, a descoberta que as células B-1 de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas são resistentes à radiação ionizante abre um novo campo de investigação, não só voltado para a biologia da célula B-1, mas como sobre as possíveis implicações desse fenômeno na patogenia de doenças auto-imunes.

6. Conclusões

Os dados aqui apresentados permitem-nos concluir que a radiação parcial de camundongos (NZB/NZW) F1 atenua de maneira marcante, o desenvolvimento do LES neste modelo experimental.

Animais irradiados tiveram sobrevivência de até 16 meses sem apresentar sinais da doença, enquanto que os camundongos controles (não-irradiados) sobreviveram entre 8 e 10 meses de idade. Animais irradiados não apresentaram esplenomegalia, anasarca, lesões glomerulares nem produção de anticorpos anti-DNA. Foi demonstrado ainda que, contrariamente ao observado em camundongos BALB/c, NZB e NZW, células B-1 da cavidade peritoneal de camundongos (NZB/NZW) F1 fêmeas são resistentes à radiação ionizante. Este fenômeno ocorre provavelmente pela superexpressão da molécula anti-apoptótica Bcl-2. Células B-1 radiorresistentes produzem IL-10 e IgM em quantidades similares aos animais controle.

A possível participação dessas células radiorresistentes na patogênese do lúpus murino ainda não pode ser esclarecida. Contudo, esplenócitos exibiram um longo atraso em restituir o baço, sugerindo que possíveis células auto-reativas que poderiam estar presentes no baço dos animais, foram eliminadas após irradiação. Assim, parece razoável especular que a irradiação seletiva periódica pode suprimir clones auto-reativos do baço, não havendo tempo hábil para que este órgão seja restaurado e induza doença auto-imune.

7. Referências

1. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
2. Linker-Israeli, M., D.J. Wallace, J.L. Prehn, R. Nand, L. Li, and J.R. Klinenberg. 1996. A greater variability in the 3' flanking region of the IL-6 gene in patients with systemic lupus erythematosus (SLE). *Autoimmunity* 23:199-209.
3. Tsao, B.P., R.M. Cantor, K.C. Kalunian, C.J. Chen, H. Badsha, R. Singh, D.J. Wallace, R.C. Kitridou, S.L. Chen, N. Shen, Y.W. Song, D.A. Isenberg, C.L. Yu, B.H. Hahn, and J.I. Rotter. 1997. Evidence for linkage of a candidate chromosome 1 region to human systemic lupus erythematosus. *J Clin Invest* 99:725-731.
4. Tsao, B.P., and D.J. Wallace. 1997. Genetics of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 9:377-379.
5. Smith, C.D., and M. Cyr. 1988. The history of lupus erythematosus. From Hippocrates to Osler. *Rheum Dis Clin North Am* 14:1-14.
6. Friou, G.J. 1958. Identification of the nuclear component of the interaction of lupus erythematosus globulin and nuclei. *J Immunol* 80:476-481.
7. Koffler, D. 1987. Immunology of systemic lupus erythematosus and related rheumatic diseases. *Clin Symp* 39:2-36.
8. Steinberg, A.D., M.F. Gourley, D.M. Klinman, G.C. Tsokos, D.E. Scott, and A.M. Krieg. 1991. NIH conference. Systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 115:548-559.
9. Beeson, P.B. 1994. Age and sex associations of 40 autoimmune diseases. *Am J Med* 96:457-462.

10. Masi, A.T., and R.A. Kaslow. 1978. Sex effects in systemic lupus erythematosus: a clue to pathogenesis. *Arthritis Rheum* 21:480-484.
11. Roubinian, J., N. Talal, P.K. Siiteri, and J.A. Sadakian. 1979. Sex hormone modulation of autoimmunity in NZB/NZW mice. *Arthritis Rheum* 22:1162-1169.
12. Fessel, W.J. 1974. Systemic lupus erythematosus in the community. Incidence, prevalence, outcome, and first symptoms; the high prevalence in black women. *Arch Intern Med* 134:1027-1035.
13. Hochberg, M.C. 1990. Systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 16:617-639.
14. Buckman, K.J., S.K. Moore, A.J. Ebbin, M.B. Cox, and E.L. Dubois. 1978. Familial systemic lupus erythematosus. *Arch Intern Med* 138:1674-1676.
15. Morteo, O.G., E.C. Franklin, C. McEwen, J. Phythyon, and M. Tanner. 1961. Studies of relatives of patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 4:356-363.
16. Lowenstein, M.B., and N.F. Rothfield. 1977. Family study of systemic lupus erythematosus: analysis of the clinical history, skin immunofluorescence, and serologic parameters. *Arthritis Rheum* 20:1293-1303.
17. Pollak, V.E. 1964. Antinuclear Antibodies in Families of Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *N Engl J Med* 271:165-171.
18. Block, S.R., J.B. Winfield, M.D. Lockshin, W.A. D'Angelo, and C.L. Christian. 1975. Studies of twins with systemic lupus erythematosus. A review of the literature and presentation of 12 additional sets. *Am J Med* 59:533-552.

19. Deapen, D., A. Escalante, L. Weinrib, D. Horwitz, B. Bachman, P. Roy-Burman, A. Walker, and T.M. Mack. 1992. A revised estimate of twin concordance in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 35:311-318.
20. Fitzgerald, A., and A.S. Russell. 1983. Identical twins discordant for S.L.E. *Clin Exp Rheumatol* 1:73-74.
21. Steinberg, A.D. 1992. Concepts of pathogenesis of systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol Immunopathol* 63:19-22.
22. Lehmann, P., E. Holzle, P. Kind, G. Goerz, and G. Plewig. 1990. Experimental reproduction of skin lesions in lupus erythematosus by UVA and UVB radiation. *J Am Acad Dermatol* 22:181-187.
23. Cochrane, C.G., and D. Koffler. 1973. Immune complex disease in experimental animals and man. *Adv Immunol* 16:185-264.
24. Koffler, D., and H.G. Kunkel. 1968. Mechanisms of renal injury in systemic lupus erythematosus. *Am J Med* 45:165-169.
25. Gladman, D.D. 1994. Indicators of disease activity, prognosis, and treatment of systemic lupus erythematosus. *Curr Opin Rheumatol* 6:487-492.
26. Cervera, R., M.A. Khamashta, J. Font, G.D. Sebastiani, A. Gil, P. Lavilla, I. Domenech, A.O. Aydintug, A. Jedryka-Goral, E. de Ramon, and et al. 1993. Systemic lupus erythematosus: clinical and immunologic patterns of disease expression in a cohort of 1,000 patients. The European Working Party on Systemic Lupus Erythematosus. *Medicine (Baltimore)* 72:113-124.

27. Tan, E.M., E.K. Chan, K.F. Sullivan, and R.L. Rubin. 1988. Antinuclear antibodies (ANAs): diagnostically specific immune markers and clues toward the understanding of systemic autoimmunity. *Clin Immunol Immunopathol* 47:121-141.
28. Holman, H.R., and H.G. Kunkel. 1957. Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science* 126:162-163.
29. Tan, E.M., A.S. Cohen, J.F. Fries, A.T. Masi, D.J. McShane, N.F. Rothfield, J.G. Schaller, N. Talal, and R.J. Winchester. 1982. The 1982 revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 25:1271-1277.
30. Pisetsky, D.S. 1992. Anti-DNA antibodies in systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am* 18:437-454.
31. Arbuckle, M.R., M.T. McClain, M.V. Rubertone, R.H. Scofield, G.J. Dennis, J.A. James, and J.B. Harley. 2003. Development of autoantibodies before the clinical onset of systemic lupus erythematosus. *N Engl J Med* 349:1526-1533.
32. Reeves, W.H., M. Satoh, J. Wang, C.H. Chou, and A.K. Ajmani. 1994. Systemic lupus erythematosus. Antibodies to DNA, DNA-binding proteins, and histones. *Rheum Dis Clin North Am* 20:1-28.
33. Miles, S., and D. Isenberg. 1993. A review of serological abnormalities in relatives of SLE patients. *Lupus* 2:145-150.
34. Mackworth-Young, C.G., J. David, S.H. Morgan, and G.R. Hughes. 1988. A double blind, placebo controlled trial of intravenous methylprednisolone in systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 47:496-502.

35. Wallace, D.J., M. Linker-Israeli, A.L. Metzger, and V.J. Stecher. 1993. The relevance of antimalarial therapy with regard to thrombosis, hypercholesterolemia and cytokines in SLE. *Lupus* 2 Suppl 1:S13-15.
36. Felson, D.T., and J. Anderson. 1984. Evidence for the superiority of immunosuppressive drugs and prednisone over prednisone alone in lupus nephritis. Results of a pooled analysis. *N Engl J Med* 311:1528-1533.
37. Moscovitch, M., E. Rosenmann, Z. Neeman, and S. Slavin. 1983. Successful treatment of autoimmune manifestations in MRL/l and MRL/n mice using total lymphoid irradiation (TLI). *Exp Mol Pathol* 38:33-47.
38. Slavin, S. 1979. Successful treatment of autoimmune disease in (NZB/NZW)F1 female mice by using fractionated total lymphoid irradiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:5274-5276.
39. Strober, S., E. Field, R.T. Hoppe, B.L. Kotzin, O. Shemesh, E. Engleman, J.C. Ross, and B.D. Myers. 1985. Treatment of intractable lupus nephritis with total lymphoid irradiation. *Ann Intern Med* 102:450-458.
40. Strober, S., A. Tanay, E. Field, R.T. Hoppe, A. Calin, E.G. Engleman, B. Kotzin, B.W. Brown, and H.S. Kaplan. 1985. Efficacy of total lymphoid irradiation in intractable rheumatoid arthritis. A double-blind, randomized trial. *Ann Intern Med* 102:441-449.
41. Furukawa, F. 1997. Animal models of cutaneous lupus erythematosus and lupus erythematosus photosensitivity. *Lupus* 6:193-202.
42. Furukawa, F., and Y. Hamashima. 1982. Lupus band test in New Zealand mice and MRL mice. *J Dermatol* 9:467-471.

43. Morel, L., C. Mohan, Y. Yu, B.P. Croker, N. Tian, A. Deng, and E.K. Wakeland. 1997. Functional dissection of systemic lupus erythematosus using congenic mouse strains. *J Immunol* 158:6019-6028.
44. Talal, N. 1978. Natural history of murine lupus. Modulation by sex hormones. *Arthritis Rheum* 21:S58-63.
45. Bielschowsky, M., and C.M. Goodall. 1970. Origin of inbred NZ mouse strains. *Cancer Res* 30:834-836.
46. Helyer, B.J., and J.B. Howie. 1963. Renal disease associated with positive lupus erythematosus tests in a cross-bred strain of mice. *Nature* 197:197.
47. Holmes, M.C., and F.M. Burnet. 1963. The Natural History of Autoimmune Disease in Nzb Mice. a Comparison with the Pattern of Human Autoimmune Manifestations. *Ann Intern Med* 59:265-276.
48. Burnet, F.M., and M.C. Holmes. 1965. The natural history of the NZB/NZW F1 hybrid mouse: a laboratory model of systemic lupus erythematosus. *Australas Ann Med* 14:185-191.
49. Staples, P.J., and N. Talal. 1969. Relative inability to induce tolerance in adult NZB and NZB-NZW F1 mice. *J Exp Med* 129:123-139.
50. Howie, J.B., and B.J. Helyer. 1968. The immunology and pathology of NZB mice. *Adv Immunol* 9:215-266.
51. Theofilopoulos, A.N., and F.J. Dixon. 1985. Murine models of systemic lupus erythematosus. *Adv Immunol* 37:269-390.

52. Yoshida, S., J.J. Castles, and M.E. Gershwin. 1990. The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand mice. *Semin Arthritis Rheum* 19:224-242.
53. Theofilopoulos, A.N., and F.J. Dixon. 1981. Etiopathogenesis of murine SLE. *Immunol Rev* 55:179-216.
54. Steinberg, A.D., D.P. Huston, J.D. Taurog, J.S. Cowdery, and E.S. Ravechee. 1981. The cellular and genetic basis of murine lupus. *Immunol Rev* 55:121-154.
55. Talal, N., H. Dang, S.A. Ahmed, E. Kraig, and M. Fischbach. 1987. Interleukin 2, T cell receptor and sex hormone studies in autoimmune mice. *J Rheumatol Suppl* 14 Suppl 13:21-25.
56. Roubinian, J.R., N. Talal, J.S. Greenspan, J.R. Goodman, and P.K. Siiteri. 1979. Delayed androgen treatment prolongs survival in murine lupus. *J Clin Invest* 63:902-911.
57. Shear, H.L., J.R. Roubinian, P. Gil, and N. Talal. 1981. Clearance of sensitized erythrocytes in NZB/NZW mice. Effects of castration and sex hormone treatment. *Eur J Immunol* 11:776-780.
58. Sommer, V.M., U.H. Rudofsky, and A.E. Gabrielsen. 1975. Immune complexes in skin of NZB/NZW mice. *Clin Exp Immunol* 22:461-467.
59. Gilliam, J.N., E.R. Hurd, and M. Ziff. 1975. Subepidermal deposition of immunoglobulin in NZB/NZW F hybrid mice. *J Immunol* 114:133-137.
60. Gilliam, J.N. 1975. The significance of cutaneous immunoglobulin deposits in lupus erythematosus and NZB/NZW F1 hybrid mice. *J Invest Dermatol* 65:154-161.

61. Bao, S., K.W. Beagley, A.M. Murray, V. Caristo, K.I. Matthaei, I.G. Young, and A.J. Husband. 1998. Intestinal IgA plasma cells of the B1 lineage are IL-5 dependent. *Immunology* 94:181-188.
62. Herzenberg, L.A., A.M. Stall, P.A. Lalor, C. Sidman, W.A. Moore, D.R. Parks, and L.A. Herzenberg. 1986. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 93:81-102.
63. Hayakawa, K., R.R. Hardy, A.M. Stall, L.A. Herzenberg, and L.A. Herzenberg. 1986. Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage. *Eur J Immunol* 16:1313-1316.
64. Hayakawa, K., R.R. Hardy, and L.A. Herzenberg. 1986. Peritoneal Ly-1 B cells: genetic control, autoantibody production, increased lambda light chain expression. *Eur J Immunol* 16:450-456.
65. Berland, R., and H.H. Wortis. 2002. Origins and functions of B-1 cells with notes on the role of CD5. *Annu Rev Immunol* 20:253-300.
66. Hardy, R.R., and K. Hayakawa. 2001. B cell development pathways. *Annu Rev Immunol* 19:595-621.
67. Baumgarth, N., O.C. Herman, G.C. Jager, L.E. Brown, L.A. Herzenberg, and J. Chen. 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *J Exp Med* 192:271-280.
68. Herzenberg, L.A., A.M. Stall, P.A. Lalor, C. Sidman, W.A. Moore, and D.R. Parks. 1986. The Ly-1 B cell lineage. *Immunol Rev* 93:81-102.
69. Kantor, A.B., and L.A. Herzenberg. 1993. Origin of murine B cell lineages. *Annu Rev Immunol* 11:501-538.

70. Manohar, V., E. Brown, W.M. Leiserson, and T.M. Chused. 1982. Expression of Lyt-1 by a subset of B lymphocytes. *J Immunol* 129:532-538.
71. Caligaris-Cappio, F., M. Gobbi, M. Bofill, and G. Janossy. 1982. Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 155:623-628.
72. Hardy, R.R., and K. Hayakawa. 1994. CD5 B cells, a fetal B cell lineage. *Adv Immunol* 55:297-339.
73. Solvason, N., A. Lehuen, and J.F. Kearney. 1991. An embryonic source of Ly1 but not conventional B cells. *Int Immunol* 3:543-550.
74. Godin, I.E., J.A. Garcia-Porrero, A. Coutinho, F. Dieterlen-Lievre, and M.A. Marcos. 1993. Para-aortic splanchnopleura from early mouse embryos contains B1a cell progenitors. *Nature* 364:67-70.
75. Alugupalli, K.R., J.M. Leong, R.T. Woodland, M. Muramatsu, T. Honjo, and R.M. Gerstein. 2004. B1b lymphocytes confer T cell-independent long-lasting immunity. *Immunity* 21:379-390.
76. Haas, K.M., J.C. Poe, D.A. Steeber, and T.F. Tedder. 2005. B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*. *Immunity* 23:7-18.
77. Dauphinee, M., Z. Tovar, and N. Talal. 1988. B cells expressing CD5 are increased in Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 31:642-647.
78. Youinou, P., L. Mackenzie, P. Katsikis, G. Merdrignac, D.A. Isenberg, N. Tuailon, A. Lamour, P. Le Goff, J. Jouquan, A. Drogou, and et al. 1990. The relationship

between CD5-expressing B lymphocytes and serologic abnormalities in rheumatoid arthritis patients and their relatives. *Arthritis Rheum* 33:339-348.

79. Tsui, H.W., K.A. Siminovitch, L. de Souza, and F.W. Tsui. 1993. Mottled and viable mottled mice have mutations in the haematopoietic cell phosphatase gene. *Nat Genet* 4:124-129.
80. Mohan, C., L. Morel, P. Yang, and E.K. Wakeland. 1998. Accumulation of splenic B1a cells with potent antigen-presenting capability in NZM2410 lupus-prone mice. *Arthritis Rheum* 41:1652-1662.
81. Scher, I. 1982. CBA/N immune defective mice; evidence for the failure of a B cell subpopulation to be expressed. *Immunol Rev* 64:117-136.
82. Hayakawa, K., R.R. Hardy, M. Honda, L.A. Herzenberg, and A.D. Steinberg. 1984. Ly-1 B cells: functionally distinct lymphocytes that secrete IgM autoantibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81:2494-2498.
83. Ishida, H., R. Hastings, J. Kearney, and M. Howard. 1992. Continuous anti-interleukin 10 antibody administration depletes mice of Ly-1 B cells but not conventional B cells. *J Exp Med* 175:1213-1220.
84. Ishida, H., T. Muchamuel, S. Sakaguchi, S. Andrade, S. Menon, and M. Howard. 1994. Continuous administration of anti-interleukin 10 antibodies delays onset of autoimmunity in NZB/W F1 mice. *J Exp Med* 179:305-310.
85. Murakami, M., H. Yoshioka, T. Shirai, T. Tsubata, and T. Honjo. 1995. Prevention of autoimmune symptoms in autoimmune-prone mice by elimination of B-1 cells. *Int Immunol* 7:877-882.

86. Murakami, M., T. Tsubata, M. Okamoto, A. Shimizu, S. Kumagai, H. Imura, and T. Honjo. 1992. Antigen-induced apoptotic death of Ly-1 B cells responsible for autoimmune disease in transgenic mice. *Nature* 357:77-80.
87. Reap, E.A., E.S. Sobel, P.L. Cohen, and R.A. Eisenberg. 1993. Conventional B cells, not B-1 cells, are responsible for producing autoantibodies in lpr mice. *J Exp Med* 177:69-78.
88. Almeida, S.R., L.S. Aroeira, E. Frymuller, M.A. Dias, C.S. Bogsan, J.D. Lopes, and M. Mariano. 2001. Mouse B-1 cell-derived mononuclear phagocyte, a novel cellular component of acute non-specific inflammatory exudate. *Int Immunol* 13:1193-1201.
89. Popi, A.F., J.D. Lopes, and M. Mariano. 2004. Interleukin-10 secreted by B-1 cells modulates the phagocytic activity of murine macrophages in vitro. *Immunology* 113:348-354.
90. Bogsan, C.S., R.R. Novaes e Brito, C. Palos Mda, R.A. Mortara, S.R. Almeida, J.D. Lopes, and M. Mariano. 2005. B-1 cells are pivotal for in vivo inflammatory giant cell formation. *Int J Exp Pathol* 86:257-265.
91. Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
92. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
93. Kotzin, B.L., and S. Strober. 1979. Reversal of nzb/nzw disease with total lymphoid irradiation. *J Exp Med* 150:371-378.

94. Strober, S., E. Field, R.T. Hoppe, B.L. Kotzin, O. Shemesh, E. Engleman, J.C. Ross, and B.D. Myers. 1985. Treatment of intractable lupus nephritis with total lymphoid irradiation. *Ann Intern Med* 102:450-458.
95. O'Garra, A., R. Chang, N. Go, R. Hastings, G. Houghton, and M. Howard. 1992. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol* 22:711-717.
96. Waer, M., B. Van Damme, P. Leenaerts, L. Roels, E. Van der Schueren, M. Vandeputte, and P. Michielsen. 1988. Treatment of murine lupus nephritis with cyclophosphamide or total lymphoid irradiation. *Kidney Int* 34:678-682.
97. Ben-Chetrit, E., D.J. Gross, A. Braverman, Z. Weshler, Z. Fuks, S. Slavin, and M. Eliakim. 1986. Total lymphoid irradiation in refractory systemic lupus erythematosus. *Ann Intern Med* 105:58-60.
98. Uhrin, Z., B.W. Wang, Y. Matsuda, S. Strober, and M.C. Genovese. 2001. Treatment of rheumatoid arthritis with total lymphoid irradiation: long-term survival. *Arthritis Rheum* 44:1525-1528.
99. Schurman, D.J., H.P. Hirshman, and S. Strober. 1981. Total lymphoid and local joint irradiation in the treatment of adjuvant arthritis. *Arthritis Rheum* 24:38-44.
100. Theofilopoulos, A.N., R. Balderas, D.L. Shawler, S. Izui, B.L. Kotzin, S. Strober, and F.J. Dixon. 1980. Inhibition of T cells proliferation and SLE-like syndrome of MRL/1 mice by whole body or total lymphoid irradiation. *J Immunol* 125:2137-2142.
101. Qian, Y., K.L. Conway, X. Lu, H.M. Seitz, G.K. Matsushima, and S.H. Clarke. 2006. Autoreactive MZ and B-1 B-cell activation by Fas^{lpr} is coincident with an increased frequency of apoptotic lymphocytes and a defect in macrophage clearance. *Blood* 108:974-982.

102. Ina, Y., and K. Sakai. 2004. Prolongation of life span associated with immunological modification by chronic low-dose-rate irradiation in MRL-lpr/lpr mice. *Radiat Res* 161:168-173.
103. Reed, J.C. 1994. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol* 124:1-6.
104. Reap, E.A., E.S. Sobel, J.C. Jennette, P.L. Cohen, and R.A. Eisenberg. 1993. Conventional B cells, not B1 cells, are the source of autoantibodies in chronic graft-versus-host disease. *J Immunol* 151:7316-7323.
105. Reap, E.A., E.S. Sobel, P.L. Cohen, and R.A. Eisenberg. 1993. Conventional B cells, not B-1 cells, are responsible for producing autoantibodies in lpr mice. *J Exp Med* 177:69-78.
106. Wen, X., D. Zhang, Y. Kikuchi, Y. Jiang, K. Nakamura, Y. Xiu, H. Tsurui, K. Takahashi, M. Abe, M. Ohtsuji, H. Nishimura, K. Takatsu, T. Shirai, and S. Hirose. 2004. Transgene-mediated hyper-expression of IL-5 inhibits autoimmune disease but increases the risk of B cell chronic lymphocytic leukemia in a model of murine lupus. *Eur J Immunol* 34:2740-2749.
107. Hahn, B.H. 1998. Antibodies to DNA. *N Engl J Med* 338:1359-1368.
108. Davidson, A., and B. Diamond. 2001. Autoimmune diseases. *N Engl J Med* 345:340-350.
109. Tan, E.M. 1991. Autoantibodies in pathology and cell biology. *Cell* 67:841-842.
110. Martin, F., and A.C. Chan. 2004. Pathogenic roles of B cells in human autoimmunity; insights from the clinic. *Immunity* 20:517-527.

111. Hoyer, B.F., R.A. Manz, A. Radbruch, and F. Hiepe. 2005. Long-lived plasma cells and their contribution to autoimmunity. *Ann N Y Acad Sci* 1050:124-133.
112. Manz, R.A., S. Arce, G. Cassese, A.E. Hauser, F. Hiepe, and A. Radbruch. 2002. Humoral immunity and long-lived plasma cells. *Curr Opin Immunol* 14:517-521.
113. Sekine, H., H. Watanabe, and G.S. Gilkeson. 2004. Enrichment of anti-glomerular antigen antibody-producing cells in the kidneys of MRL/MpJ-Fas(lpr) mice. *J Immunol* 172:3913-3921.
114. Salomonsson, S., M.V. Jonsson, K. Skarstein, K.A. Brokstad, P. Hjelmstrom, M. Wahren-Herlenius, and R. Jonsson. 2003. Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* 48:3187-3201.
115. Pecaut, M.J., R. Dutta-Roy, A.L. Smith, T.A. Jones, G.A. Nelson, and D.S. Gridley. 2006. Acute effects of iron-particle radiation on immunity. Part I: Population distributions. *Radiat Res* 165:68-77.
116. Pecaut, M.J., G.A. Nelson, and D.S. Gridley. 2001. Dose and dose rate effects of whole-body gamma-irradiation: I. Lymphocytes and lymphoid organs. *In Vivo* 15:195-208.
117. De Lorenzo BHP; Godoy LC; Brito RRN; Lopes JD and Mariano M. 2007. Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction. *Immunology* (submetido).

8. Abstract

The New Zealand Black x New Zealand White F1 [(NZB/NZW) F1] mouse develops an autoimmune condition in all similar to the systemic lupus erythematosus that occurs in humans. Among all the cellular alterations described, the number of B-1 cells increases in (NZB/NZW) F1 mice and in patients with rheumatoid arthritis and Sjögren disease. Considering evidences that B-1 cells could play a role in the development of lupus-like condition in female (NZB/NZW) F1 mice, a lead device was developed in order to deplete the animals of B-1 cells by selective irradiation. Apparatus protects the front and hind limbs of the animals against radiation, leaving the thoracic and abdominal region exposed. Cells were characterized by FACS. Survival of irradiated mice was significantly higher when compared with non-irradiated animals. Histological analysis of kidneys of irradiated animals showed milder lesions. Further, autoantibody was lower in irradiated mice when compared to controls. Radiation lead to marked reduction of B-1 cells in BALB/c but not in (NZB/NZW) F1 female mice. The radioresistance observed in B-1 cells from (NZB/NZW) F1 female mice is probably due to the overexpression of Bcl-2. The possible relationship between the radioresistance of these cells and the impairment of SLE is discussed.

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](#)