

**Células B são importantes na geração de memória em modelo
de vacinação com DNA-Hsp65**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de
concentração: Imunologia Básica e Aplicada

Orientadora: Prof (a). Dr (a). Arlete A. M. Coelho-Castelo

Ribeirão Preto
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **ACF**: adjuvante completo de Freund
- **AIDS**: *acquired immunodeficiency syndrome*- síndrome da imunodeficiência adquirida
- **AIF**: adjuvante incompleto de Freund
- **APCs**: células apresentadoras de antígeno
- **Apc**: alofocianina
- **AS**: anti-sense
- **BCR**: receptor de células B
- **Breg**: células B reguladoras
- **Bko t**: camundongos deficientes de células B que receberam transferência adotiva de células B
- **Bko**: camundongo deficiente de células B- ($\mu M^{-/-}$)
- **$\beta 2M$** : beta 2 microglobulina
- **cDNA**: DNA complementar
- **CMV**: citomegalovírus
- **CpG**: dinucleotídeos citosina -fosfato- guanosina
- **CRH**: hormônio corticotropina
- **DEPC**: dietilpirocarbonato
- **DMT**: dimicolato de trealose
- **DNA**: ácido desoxirribonucléico
- **DNase**: enzima que degrada RNA
- **dNTPs**: desoxinucleotídeos fosfatados
- **D.O.**: densidade óptica
- **EAE**: encefalomielite autoimune

- **FDCs:** células dendríticas foliculares
- **FITC:** isotiocianato de fluoresceína
- **FoxP3:** forkhead box 3
- **FSC:** *forward scatter*
- **HIV:** vírus da imunodeficiência humana
- **Hsp:** proteína de choque térmico
- **Hsp65:** proteína de choque térmico 65 kDa de *Mycobacterium leprae*
- **IFN- γ :** interferon gama
- **IgM:** imunoglobulina M
- **IgG:** imunoglobulina G
- **IL:** interleucina
- **LAL:** lisado de amebócitos de *Lyminulus polyphemus*
- **LCMV:** vírus da coriomeningite linfocítica
- **LPS:** lipopolissacarídeo
- **MHC:** complexo de histocompatibilidade principal
- **MZB:** células B da zona marginal
- **NKT:** linfócitos naturalmente citotóxicos
- **NPT:** núcleo de pesquisas em tuberculose
- **OVA:** ovoalbumina de ovo de galinha
- **PBS:** tampão fosfato tamponado
- **PCR:** reação em cadeia da polimerase
- **pcDNA3-Hsp65:** DNA plasmideal que codifica a proteína de choque térmico (Hsp) de 65 kDa do *Mycobacterium leprae*
- **PE:** ficoeritrina
- **PERCP:** peridina clorofila-a

- **PLGA:** co-polímero derivado de ácidos láctico e glicólico
- **RNA:** ácido ribonucléico
- **RNase:** enzima que degrada RNA
- **S:** *sense*
- **SBF:** soro bovino fetal
- **SCID:** imunodeficiência combinada grave
- **SSC:** *side scatter*
- **SV40:** vírus Simian 40
- **T CD4⁺:** linfócitos T CD4⁺
- **T CD8⁺:** linfócitos T CD8⁺
- **TCM:** células T de memória central
- **TCR:** receptor de células T
- **TEM:** células T de memória efetora
- **TGF- β :** fator de crescimento transformante
- **Th:** Resposta immune de linfócitos T *helper* (auxiliar)
- **Th1:** resposta immune de linfócitos T *helper* (auxiliar) do tipo 1
- **Th2:** resposta immune de linfócitos T *helper* (auxiliar) do tipo 2
- **TLR:** receptores do tipo Toll
- **TNF- α :** fator de necrose tumoral alfa
- **T2- MZB:** precursores de células B da zona marginal em fase 2 de transição
- **WT:** camundongo C57Bl/6 *wild type* (tipo selvagem)
- **Treg:** célula T reguladora

RESUMO

O campo da vacinologia gênica abriu perspectivas de desenvolvimento de vacinas e terapias contra diferentes patógenos. Um exemplo disso é a vacina DNA-Hsp65 que se mostrou protetora contra a tuberculose experimental. Embora vários aspectos desse novo tipo de vacina tenham sido estudados, o desenvolvimento de células de memória é muito pouco explorado. O conhecimento dos mecanismos envolvidos para gerar memória nesse tipo de estratégia pode favorecer a escolha de vetores e de *booster* para atingir a proteção necessária. Nesse trabalho foi avaliado o papel de células B na modulação da resposta de células T e indução de memória, após a imunização com antígeno protéico e de DNA (pcDNA3-Hsp65). Os resultados mostraram que as células B foram importantes na geração de células T CD4⁺/CD44^{high}/CD62L^{low} (memória efetora), em todos os períodos de tempo analisados para ambos os grupos de imunização, e, na geração de células T CD8⁺ CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺, aos 15 e 30 dias após as imunizações, mas não para TCD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}. Além disso, estas células foram mais importantes para produção de citocinas inflamatórias aos 15 dias após imunização, ou seja, nos estágios mais iniciais da resposta imune. Também foi detectada por PCR em tempo real, a expressão de IL-10 por células B no baço dos animais. Estas células foram melhor caracterizadas por citometria de fluxo. Interessantemente, a população de células B que mais produziu IL-10 apresentou um fenótipo CD19⁺/CD5⁺/CD43⁻. Enquanto a população CD19⁺/CD5⁻/CD43⁻ mostrou pouca produção de IL-10. Esses dados sugerem que essa subpopulação seja importante no esquema de vacinação para geração de células de memória. Além disso, as células B purificadas expressaram o fator de transcrição Foxp3 que é característico de células T reguladoras. Essa é a primeira detecção de Foxp3 em células B, mas novos ensaios devem ser conduzidos para caracterizar essa subpopulação. No entanto, os dados apresentados nos permitem sugerir que diferentes subpopulações de células B possam contribuir para o desenvolvimento de células T de memória, e que seus efeitos devem ser considerados em modelos de vacinação.

Palavras- chave: Células B, células de memória, vacinas de DNA

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Mecanismos de ação das vacinas de DNA plasmideal	3
1.2. Vacina DNA-Hsp65	5
1.3. Geração de células de memória	6
1.4. Participação de células B na ativação de linfócitos T e na manutenção da memória	9
<i>1.4.1. Tipos de células B</i>	11
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1. Camundongos	17
3.2. Plasmídeos	17
<i>3.2.1. Obtenção dos plasmídeos recombinantes pcDNA3-Hsp65 e pcDNA3</i>	17
<i>3.2.2. Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados</i>	18
<i>3.2.3. Análise da pureza da vacina gênica</i>	19
3.3. Obtenção da proteína Hsp65 recombinante	20
3.4. Imunizações	21
3.5. Detecção do fenótipo celular de memória por citometria de fluxo	23
<i>3.5.1. Fenotipagem das células do baço 7 dias após a última imunização</i>	23
<i>3.5.2. Fenotipagem das células do baço 15 ou 30 dias após a última imunização</i>	25
3.6. Transferência adotiva de células B CD43⁺ (B-2) para animais Bko	25
<i>3.6.1. Purificação das células B CD43⁺ (B-2)</i>	26
<i>3.6.2. Transferência das células para os animais Bko</i>	26
<i>3.6.3. Fenotipagem das células do baço</i>	27

3.7. Caracterização do perfil de expressão de citocinas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real no baço dos animais 15 e 30 dias após a última imunização.....	27
3.7.1. Extração do RNA total das células	27
3.7.2 Construção do cDNA a partir do RNA total.....	28
3.7.2.1 Tratamento com DNase I.....	28
3.7.2.2 Síntese de cDNA	28
3.7.2.3 Amplificação do cDNA específico por PCR em tempo real	29
3.8. Caracterização do perfil de expressão de citocinas pelas células B	30
3.9. Fenotipagem das células B produtoras de IL-10	30
3.10. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS	33
4.1. Obtenção dos plasmídeos	33
4.1.1. Sequenciamento dos plasmídeos	33
4.2. Animais Bko apresentam maior porcentagem de células T	35
4.3. Ausência de células B promove diminuição de células T CD4⁺ de memória efetora mas não interferem em T CD8⁺ TEM.....	38
4.4. Ausência de células B promove diminuição das células T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺	47
4.5. Transferência adotiva de células B CD43⁻ (B-2) para animais Bko recuperou a porcentagem normal de células T CD4⁺ de memória no baço desses animais.	50
4.6 Avaliação do perfil de expressão de citocinas no baço dos animais imunizados.....	56
4.7. Células B são importantes na produção de citocinas pro- inflamatórias	63
4.8. Células B do baço possuem uma subpopulação expressando IL-10 e FoxP366	

5. DISCUSSÃO	70
6. CONCLUSÕES.....	85
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86

1. INTRODUÇÃO

O campo da terapia gênica abriu, nos últimos anos, possibilidades virtualmente ilimitadas de aplicações na medicina. Além de correções genéticas de problemas hereditários como fibrose cística, também está sendo utilizada na prevenção de doenças degenerativas como Alzheimer, artrite e arterosclerose. Novas abordagens de tratamentos como para tumores e imunização contra o vírus da imunodeficiência humana (HIV), varíola, entre muitas outras doenças também estão sendo desenvolvidas (Hellermann e Mohapatra, 2003).

Uma possibilidade bastante importante é a produção por longos períodos de proteínas a partir do ácido desoxirribonucléico (DNA) de interesse. Desse modo, a utilização de material genético para induzir imunidade específica contra patógenos, abriu novas perspectivas no campo da vacinologia. No entanto, embora o campo da medicina gênica tenha se desenvolvido rapidamente, muito ainda precisa ser feito para elucidar os mecanismos de ação deste material genético (Hellermann e Mohapatra, 2003).

A demonstração de que a inoculação, em camundongos, de um DNA plasmideal contendo um determinado gene induzia uma resposta imune contra a proteína codificada por esse gene provocou, nos últimos dez anos, o surgimento de uma nova estratégia em vacinação (Tang, DeVit *et al.*, 1992; Ulmer, Donnelly *et al.*, 1993). As vacinas de DNA, como passaram a ser conhecidas, se mostraram eficazes em modelos animais contra uma série de agentes patogênicos como vírus, bactérias, fungos e parasitas (Wells, 1993; Gregoriadis, Saffie *et al.*, 1997; Macgregor, Boyer *et al.*, 1998; Svanholm, Bandholtz *et al.*, 2000; Yoshida, Kashiwamura *et al.*, 2000). Algumas dessas novas vacinas, principalmente aquelas contra a síndrome da imunodeficiência adquirida

(AIDS) e influenza, apresentaram excelente resposta em primatas, e já se encontram em fase de testes clínicos em humanos (Macgregor, Boyer *et al.*, 1998).

Os plasmídeos estão sendo amplamente utilizados como vetores para as construções dessas vacinas, pois conseguem com sucesso atravessar a barreira nuclear para que a proteína possa ser expressa dentro de célula. Além disso, apresentam alguns requisitos que auxiliam na otimização de sua transfecção e expressão em células eucarióticas. Isto inclui seqüências de DNA que são necessárias para: (i) seleção e replicação em bactérias; (ii) promotores especiais para processos de transcrição e tradução; (iii) seqüências específicas que permitem a expressão gênica em células procarióticas e eucarióticas (Silva, 1997). Os promotores mais eficazes encontrados são os promotores virais do Simian vírus 40 (SV40) e citomegalovírus (CMV). A inserção desses promotores promove uma maior eficácia na transfecção podendo minimizar a quantidade da dose da vacina a ser administrada (Dean, Dean *et al.*, 1999).

Após a clonagem do gene que codifica o antígeno vacinal (frequentemente relacionado com a virulência ou patogenicidade dos agentes infecciosos) no plasmídeo, ele é introduzido em uma bactéria hospedeira, geralmente *Escherichia coli*, com a finalidade de se produzir o plasmídeo em larga escala e se obter uma quantidade suficiente de DNA para a vacinação propriamente dita (Silva, 1997). Além de todos esses requerimentos acima citados, os plasmídeos ainda contêm seqüências que são muito importantes na imunogenicidade das vacinas. Estas seqüências são formadas por repetições de dinucleotídeos citosina-fosfato-guanosina (CpG). Estes motivos se ligam aos receptores do tipo Toll (TLR), Toll 9 e ativam células dendríticas, além de atuarem diretamente nas células B promovendo a secreção de anticorpos (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

1.1. Mecanismos de ação das vacinas de DNA plasmideal

Sabe-se que as vacinas de DNA plasmideal podem ativar tanto a imunidade celular quanto a imunidade humoral. Isto promove uma imunização mais eficiente contra patógenos intracelulares que requerem uma maior ativação de linfócitos T, principalmente T CD8⁺ (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000). Mas os mecanismos envolvidos na ativação do sistema imune nesses tipos de respostas ainda não foram completamente elucidados. Outro ponto também não esclarecido envolve o processo de captura deste DNA plasmideal pela célula eucariótica *in vivo*. Durante este trajeto, o plasmídeo enfrenta barreiras extra e intracelulares antes de atingir o núcleo celular para promover a transcrição do antígeno de interesse (Dean, Dean *et al.*, 1999). A elucidação desses mecanismos pode levar a uma redução da dose utilizada ou mesmo levar a um controle maior dos mecanismos desencadeados *in vivo*.

Alguns autores propõem que a indução da resposta imune possa ter início após a transfecção de uma célula somática, não apresentadora de antígeno profissional. Outros autores têm demonstrado a importância de células dendríticas da medula óssea na indução da resposta imune (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000). Embora a importância das células apresentadoras de antígenos (APCs) profissionais fique clara na maioria dos modelos testados, não existe um consenso sobre a necessidade de estas células serem diretamente transfectadas, ou capturarem o antígeno sintetizado em outras células para dar início a resposta imune (Torres, Iwasaki *et al.*, 1997; Akbari, Panjwani *et al.*, 1999). Após a captura do DNA plasmideal por uma APC, o antígeno produzido no citoplasma entra na rota de degradação endógena, sendo apresentado na superfície celular no contexto de moléculas de histocompatibilidade principal (MHC) de classe I, levando à ativação de linfócitos T CD8⁺ específicos. Por outro lado, parte dos antígenos produzidos endogenamente, quando secretados pelas células e/ou liberados destas após

a morte celular, podem ativar tanto linfócitos T CD4⁺ quanto T CD8⁺. Neste último caso por meio de um mecanismo denominado apresentação cruzada. Além disso, os linfócitos B também podem capturar antígenos liberados levando a produção de anticorpos específicos (Liu, Wu *et al.*, 1995; Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000). No entanto, a apresentação antigênica após a injeção de DNA plasmideal parece ser mais complexa do que o habitual. Askew, Chu *et al.*, 2000, demonstraram que os motivos CpG não metilados presentes no plasmídeo, além de induzir a maturação de células dendríticas, também foram capazes de promover um aumento transiente na apresentação de alguns peptídeos por moléculas de MHC de classe II. Assim, quando as sequências contendo CpG são internalizadas pelas células em repouso, ligam-se aos receptores TLR 9 presentes principalmente em vesículas intracelulares (Latz, Alfrink *et al.*, 2004). Esta ligação promove ativação destas células e uma polarização da resposta para um padrão T *helper* 1 (Th1) de resposta (Krieg, 2002). Tal efeito sugere que a própria molécula de DNA plasmideal pode interferir na apresentação antigênica durante a indução da resposta imune. O entendimento dos mecanismos envolvidos no processamento antigênico em vacinas de DNA pode favorecer o desenvolvimento de vetores com estratégias que visem melhorar a apresentação de antígenos. Desse modo, a grande vantagem da utilização de vacinas de DNA plasmideal é que elas fornecem as informações genéticas necessárias para que o organismo produza o antígeno endogenamente (ativação específica), o que traz implicações diretas na indução de linfócitos T CD8⁺. Além disso, como os vetores plasmídeos apresentam propriedades imunoestimulantes, decorrentes da presença dos motivos CpG, podem agir como adjuvante aumentando a magnitude da resposta imune (ativação inespecífica) (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

1.2. Vacina DNA-Hsp65

Utilizando uma vacina de DNA plasmideal que codifica a proteína de choque térmico (Hsp) de 65 kDa do *Mycobacterium leprae* (pcDNA3-Hsp65), o Núcleo de Pesquisa em Tuberculose (NPT), vem apresentando resultados eficazes contra a tuberculose experimental. A imunização intramuscular de camundongos BALB/c com o pcDNA3-Hsp65 foi efetiva em induzir uma resposta imune protetora, do padrão Th1, contra o subsequente desafio com *Mycobacterium tuberculosis* (Lowrie, Tascon *et al.*, 1999). Nesse modelo experimental, a proteção foi correlacionada com a ativação e a manutenção de linfócitos T CD8⁺ antígeno-específicos, produtores de interferon gama (IFN- γ) e com alta expressão CD44, um marcador fenotípico de memória (Bonato, Lima *et al.*, 1998; Lima, Bonato *et al.*, 2001). A vacina de DNA-Hsp65 também mostrou uma importante ação terapêutica, quando usada juntamente com drogas anti-tuberculose, sugerindo um papel mais abrangente para as vacinas de DNA do que somente profilaxia (Lowrie, Tascon *et al.*, 1999).

As proteínas da família das Hsps, são altamente conservadas entre os organismos e são expressas em várias situações de estresse, dentre elas, exposição a fatores pro-inflamatórios como citocinas fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e IFN- γ (Morimoto e Santoro, 1998; Fink, 1999; Naylor e Hartl, 2001). Várias evidências mostraram que essas Hsps são altamente imunogênicas, pois além de serem conservadas entre as várias espécies de bactérias, quando um organismo é infectado, ele monta uma resposta imune contra o patógeno e isto se torna uma situação de estresse para a bactéria, promovendo um aumento na expressão dessas proteínas nesses patógenos. Assim, elas se tornam alvos mais fáceis durante a resposta imune do hospedeiro. Outro fator importante é que as proteínas da família das Hsps funcionam como chaperonas e podem auxiliar no dobramento de peptídeos recém gerados durante a resposta imune, o

que facilita na entrada desses peptídeos na fenda do MHC. Assim, as Hsps além de auxiliarem no desenvolvimento da resposta imune, funcionam como o próprio antígeno (Srivastava, 2002).

Uma alternativa para a redução tanto da dose utilizada quanto do número de imunizações tem sido a combinação dessas vacinas com sistemas de liberação controlada e adjuvantes. Assim, no caso da Hsp65, uma única imunização feita com pcDNA3-Hsp65 em micro esferas com co-polímero derivado de ácido láctico e glicolítico (PLGA) contendo dimicolato de trealose (DMT) foi capaz de induzir uma eficiente resposta imune protetora contra a tuberculose experimental nos animais imunizados, abrindo perspectivas para o uso desse sistema como veículos em vacinas de DNA (Lima, Bonato *et al.*, 2001). E assim como foi demonstrado em Trombone, Silva *et al.*, 2007, com este sistema de entrega, o DNA plasmideal obteve uma maior permanência em APCs nos linfonodos, podendo favorecer a apresentação antigênica.

Nossa observação de que, após a imunização intramuscular, o DNA plasmideal também pode ser capturado *in vivo* por linfócitos B da medula óssea e do linfonodo drenante, (Coelho-Castelo, Santos Junior *et al.*, 2003), abre novas perspectivas no entendimento da participação de diferentes tipos celulares na ativação da resposta imune mediada por vacinas de DNA. Células B podem agir como APCs e produzir citocinas que modulem a resposta de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, contribuindo para a geração de memória.

1.3. Geração de células de memória

O principal requerimento no desenvolvimento de vacinas é a formação de células de memória de vida longa. Como já foi visto, no caso de vacinas contra patógenos intracelulares, os linfócitos T CD8⁺ constituem um importante mecanismo na

defesa contra esse tipo de microorganismo (Esser, Marchese *et al.*, 2003). Os linfócitos T *naive* em contato com o antígeno, se diferenciam e proliferam para se tornar células T efetoras. A expansão clonal de células T CD8⁺ antígeno-específicas asseguram a produção de um grande número de células efetoras, que secretam uma grande quantidade de citocinas tais como IFN- γ , além de realizarem uma função citotóxica promovendo a morte de células infectadas. Após o desenvolvimento de uma resposta imune, as células T de memória são as únicas que permanecem, sendo capazes de diferenciação adicional rápida e proliferação no caso de uma possível re-infecção, tendo um papel importante na imunidade protetora (Asano e Ahmed, 1996). Já as células T CD4⁺, são importantes por funcionarem como células T auxiliares que também potencializam a função de células T CD8⁺, por meio da secreção de citocinas, bem como na cooperação com linfócitos B para a produção de anticorpos (Foulds, Rotte *et al.*, 2006). Isto demonstra a importância da geração de ambas as células de memória na construção de uma vacina. Diferentemente das vacinas de subunidade e de microorganismos atenuados que ativam preferencialmente uma resposta humoral, as vacinas de DNA ativam uma resposta celular, que como foi dito são mais eficientes para a eliminação de patógenos intracelulares como vírus e bactérias tais como o *M. tuberculosis* (Revisto em Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

As células de memória podem ser divididas em dois subtipos: células de memória central (TCM) e células de memória efetora (TEM). Estes dois subtipos podem ser caracterizados pela expressão de alguns marcadores na superfície, pela sua capacidade de resposta a um segundo encontro com o antígeno e a localização destas (Esser, Marchese *et al.*, 2003). As células TCM são caracterizadas pelo fenótipo CD62L^{high}/CCR7^{high}, e tendem a se localizar em órgãos linfóides secundários, por onde migram para promover a vigilância do sistema imune. Já as células TEM apresentam o

fenótipo CD62L^{low}/CCR7^{low} e migram entre os órgãos não-linfóides (Sallusto, Lenig *et al.*, 1999). As células TEM respondem rapidamente em um segundo contato com o antígeno, promovendo proteção imediata contra uma re-infecção. Já as células TCM se expandem imediatamente em um segundo contato com o antígeno, se diferenciando em células efetoras que podem migrar para os órgãos periféricos (Esser, Marchese *et al.*, 2003).

Existem alguns fatores que podem auxiliar na geração e na manutenção das células de memória. Por exemplo, a indução de linfócitos de memória é dependente da exposição ao antígeno e de citocinas, como interleucina 2 (IL-2), IL-4, e principalmente IL-7 e IL-15, que são importantes na regulação da homeostasia dos linfócitos (Weng, Liu *et al.*, 2002). A IL-15 é uma citocina que sinaliza por meio de um receptor trimérico, sendo a subunidade alfa deste receptor muito importante para exercer sua função. A IL-15R α é importante para a realização de dois mecanismos característicos da IL-15. A apresentação *in trans* que demonstra que para que uma célula possa responder a esta citocina, ela precisa expressar somente a cadeia alfa desse receptor (Schluns K. S. Stoklasek, 2005). O outro mecanismo importante e característico da IL-15, é a reciclagem do receptor, o que permite que uma célula de memória possa sofrer a ação da IL-15 por longos períodos, promovendo sobrevivência a longo prazo destas células, principalmente T CD8⁺. Mas o exato mecanismo pelo qual ela age ainda não é conhecido (Sato, Patel *et al.*, 2007). Já a IL-7 é responsável pela manutenção tanto de células *naive* na periferia quanto de células de memória. O que determina a resposta dessas células à IL-7 é a expressão também da cadeia alfa do seu receptor (CD127). Esta molécula é altamente expressa em células *naive*, pois estas células necessitam deste estímulo para se manterem vivas na periferia. Quando são ativadas, elas perdem a expressão de CD127, pois nesta fase possuem o estímulo de sobrevivência dado pelo

antígeno. Quando o antígeno é eliminado, as células que sobreviveram na fase de contração da resposta imune voltam a expressar o receptor para se manterem vivas (Schluns, Kieper *et al.*, 2000). O mecanismo primordial de ação desta citocina é promover uma maior proliferação das células na fase de contração da resposta imune, aumentando assim, a quantidade de células vivas após esta fase e conseqüentemente uma maior porcentagem de células de memória (Schluns, Kieper *et al.*, 2000). A IL-7 também age pelo mecanismo de promover a expressão de fatores antiapoptóticos pelas células durante a resposta imune (Nanjappa, Walent *et al.*, 2008).

Outro mecanismo que é descrito como auxiliar na manutenção das células de memória é a deposição de complexos de antígeno-anticorpo que persistem nas células dendríticas foliculares (FDCs) fornecendo estímulo para a manutenção das células T memória. As FDCs podem capturar os imunocomplexos retendo-os em sua superfície por um longo período. Uma vez que estas FDCs são ineficientes no processamento de antígenos, postulou-se que as células B escolhem estes antígenos presos nas FDCs e os apresentam às células T, auxiliando na sustentando da memória a longo prazo (Esser, Marchese *et al.*, 2003).

1.4. Participação de células B na ativação de linfócitos T e na manutenção da memória

Recentemente, o papel das células B na modulação da resposta de células T tem sido estudado em diferentes modelos experimentais e parece diferir de acordo com o estímulo antigênico e com o agente infeccioso. Linfócitos B podem capturar, processar e apresentar antígenos solúveis podendo participar, (Liu, Wu *et al.*, 1995; Constant, 1999; Linton, Harbertson *et al.*, 2000), ou não, (Ronchese e Hausmann, 1993; Epstein,

Di Rosa *et al.*, 1995; Topham, Tripp *et al.*, 1996; Van Essen, Dullforce *et al.*, 2000) da indução da resposta de linfócitos T CD4⁺.

A resposta de células T CD8⁺ em animais deficientes de células B é normal durante a infecção aguda com vírus da coriomeningite linfocítica (LCMV), mas não durante a infecção crônica (Asano e Ahmed, 1996). Células B desempenham, ainda, um importante papel na modulação da ativação de linfócitos T CD8⁺ após a infecção com *Listeria monocytogenes* (Shen, Whitmire *et al.*, 2003). Na infecção por *Trypanosoma cruzi* as células B tiveram uma função importante na fase aguda, pois animais deficientes dessas células falharam em conter a parasitemia, além de possuírem menor porcentagem de linfócitos T CD8⁺ em infiltrados inflamatórios. Esses animais também tiveram uma diminuição da expressão de citocinas do padrão Th1 que é importante para o controle da doença (Cardillo, Postol *et al.*, 2007). Recentemente, também foi demonstrado por (Whitmire, Asano *et al.*, 2009), que as células B são fundamentais para a manutenção de células T CD4⁺ de memória em infecção por LCMV e, indiretamente, de T CD8⁺ durante a infecção crônica.

O papel das células B durante a infecção com *M. tuberculosis* ainda não está claro. Alguns relatos sugerem que essas células apresentam pouca contribuição no controle ou exacerbação da fase crônica da infecção experimental (Vordermeier, Venkataprasad *et al.*, 1996; Johnson, Cooper *et al.*, 1997). Por outro lado, Bosio, Gardner *et al.*, 2000, demonstraram que animais deficientes de células B apresentaram menor disseminação de bactérias para outros órgãos e formação de lesões granulomatosas de menor gravidade, pois estes animais possuem uma deficiência na formação do granuloma. Na ausência de células B, há uma menor ativação de células T

e conseqüentemente, um menor número de células dendríticas e macrófagos ativados que são células importantes na formação da estrutura do granuloma.

Células B também contribuem para o aumento da resposta de linfócitos T CD4⁺ que mantém o controle por longo tempo durante a infecção por *Plasmodium chabaudi* (Meding e Langhorne, 1991; Von Der Weid e Langhorne, 1993; Von Der Weid, Honarvar *et al.*, 1996). Desse modo, as células B podem estar envolvidas na ativação e manutenção da memória, no contexto de muitas infecções. Porém seu preciso papel na indução da resposta imune em modelos de vacinas de DNA ainda não está definido.

1.4.1. Tipos de células B

As células B são classicamente conhecidas como reguladoras positivas do sistema imune, pois, além de secretarem anticorpos e promoverem a ativação de células T CD4⁺, estas células também secretam várias citocinas como IL-4, IL-6 e IFN- γ (Harris, Haynes *et al.*, 2000; Tian, Sun *et al.*, 2000). As células B também são fontes de produção de anticorpos contra microorganismos invasores, sendo que, em algumas circunstâncias alguns anticorpos atuam como autorreativos que promovem conseqüências patogênicas em doenças autoimunes (Bouaziz, Yanaba *et al.*, 2008). Estas são classicamente conhecidas como células B-2 (clássicas) ou células B convencionais e se localizam preferencialmente em órgãos linfóides secundários (baço e linfonodo). Assim, são importantes tanto na imunidade humoral quanto na imunidade celular (Allman e Pillai, 2008).

Atualmente, a ação das células B vem sendo ampliada. Evidências de sua habilidade em suprimir uma resposta de hipersensibilidade já foi descrita por (Katz, Parker *et al.*, 1974). Em 1996, Janeway e colaboradores foram os primeiros a mostrarem

um papel regulador de fato dessas células em modelo de encefalomielite autoimune experimental (EAE). Mas só receberam a denominação de células B reguladoras (Bregs), em 1997 (Mizoguchi, Mizoguchi *et al.*, 1997), quando estudaram seu papel em modelo de colite autoimune. A partir destes trabalhos, sua função de supressão vem sendo descrita em vários outros modelos de autoimunidade, inflamação e câncer (Mizoguchi e Bhan, 2006; Mauri e Ehrenstein, 2008). As células B promovem regulação do sistema imune por meio de uma série de mecanismos. Essas células B podem funcionar como APCs secundárias, minimizando a ativação de células T que foram previamente ativadas por células dendríticas (Knoechel, Lohr *et al.*, 2005). Também, foram capazes de suprimir o desenvolvimento da inflamação em modelos de colite, pela inibição da proliferação de células T via interação CD40-CD40L (Mizoguchi e Bhan, 2006). Similarmente, foram capazes de inibir uma reação inflamatória autoimune sistêmica da pele por promover a diminuição da expressão do receptor de célula T (TCR) em células T já ativadas (Knoechel, Lohr *et al.*, 2005). Além disso, podem promover uma diminuição da ativação e migração de APCs profissionais pela produção de IL-10 e CXCL13 (Moulin, Andris *et al.*, 2000; Mizoguchi, Mizoguchi *et al.*, 2002; Yu, Wang *et al.*, 2002). Outro mecanismo clássico de regulação promovido por células B na inflamação é a indução de células T CD8⁺ reguladoras via dependente de beta-2 microglobulina (β 2M) (Langermans, Doherty *et al.*, 2005).

Além de promoverem regulação da resposta imune por mecanismos dependentes de interações celulares, essas células também podem promover supressão da resposta imune por meio da secreção de anticorpos. Nesse sentido, a ligação de anticorpos em seus receptores Fc γ RIIB por imunoglobulinas G (IgGs), ou por imunocomplexos promove a inibição da resposta imune pela fosforilação de ITIMs. Levando-se em consideração que cerca de 75% dos receptores Fc γ em camundongos são do tipo

Fc γ RIIB, este é um mecanismo importante na manutenção da tolerância (Bolland, 2005). As células B podem ainda, secretar anticorpos que neutralizem possíveis autoantígenos como aqueles derivados de células apoptóticas, podendo impedir o desencadeamento de uma resposta inflamatória (Savill, Fadok *et al.*, 1993; Bellone, 2000).

As células B reguladoras também produzem citocinas como IL-10 e fator de crescimento transformante beta (TGF- β). A secreção de IL-10 é importante para manter um equilíbrio entre Th1/Th2, e prejudicar a ativação de células da resposta imune inata, impedindo o início da inflamação (Fiorentino, Zlotnik *et al.*, 1991). Essas células foram capazes de produzir IL-10 pela estimulação com CpG, lipopolissacarídeos (LPS), e Hsp60 (Zanin-Zhorov, Tal *et al.*, 2005). A produção de TGF- β foi detectada pela estimulação dessas células *in vitro* com LPS (Parekh, Prasad *et al.*, 2003). A transferência destas células produtoras de TGF- β para animais diabéticos, foi capaz de suprimir a doença por promover a apoptose de células T efetoras. Entretanto, ainda não houve a detecção da produção desta citocina por células B *in vivo* (Mizoguchi e Bhan, 2006).

Segundo Allman e Pillai, 2008, as células B são divididas em 3 populações. As células B-1, Células B da Zona Marginal (MZB), e células B foliculares ou células B-2 (convencionais). Estas últimas como já foi falado, tem a capacidade de ativar células T CD4⁺ e produzir anticorpos, e se localizam no sangue, linfonodos, baço e placas de Payer (revisto em Allman e Pillai, 2008).

As células B da zona marginal (MZB), se localizam na interface de encontro de células B e T no baço e linfonodos. Podem se tornar plasmócitos de vida curta na ausência de ligação de antígenos ao receptor de célula B (BCR). Possuem uma alta expressão de CD21. Assim, estão estreitamente envolvidas na captura de

imunocomplexos e transporte destes até a zona de células B foliculares (revisto em Allman e Pillai, 2008). Sua expressão de CD1d evidencia que estas células estejam participando da apresentação de antígenos para linfócitos naturalmente citotóxicos (NKT). Leadbetter, Brigl *et al.*, 2008; Mauri e Ehrenstein, 2008, demonstraram que há a presença de uma subpopulação de células MZB produtoras de altos níveis de IL-10 após estimulação com LPS ou CpG. Estas células derivam de uma população precursora de células B na fase 2 de transição (T2- MZB). Esta população T2-MZB produtora de IL-10 é encontrada em baço de animais *naive*. Tem sua população reduzida no pico da inflamação e depois volta á sua população normal na fase de remissão da doença. Seu potencial regulador é dependente da produção de IL-10, pois a transferência destas células T2-MZB isoladas de animais nocautes de IL-10, falharam na proteção ao desenvolvimento de artrite experimental (Evans, Chavez-Rueda *et al.*, 2007).

A subpopulação B-1 se localiza no peritônio, nas cavidades pleurais e na lâmina própria do intestino, e recirculam através destes órgãos (revisto em Allman e Pillai, 2008). Se diferenciam das células B-2 pelo fenótipo, localização anatômica, capacidade de autorrenovação e produção de anticorpos naturais e IL-10 (Kantor, Stall *et al.*, 1992). Estas, ainda se dividem em outras 2 subpopulações: as células B-1a e B-1b. As B-1a se diferenciam das células B1-b pela expressão de CD5 e sua capacidade de secreção de IL-10 (Harris, Haynes *et al.*, 2000; Fillatreau, Sweenie *et al.*, 2002; Evans, Chavez-Rueda *et al.*, 2007; Mauri e Ehrenstein, 2008). Essas células CD5⁺ do baço foram capazes de produzir IL-10 em resposta à estimulação por IL-12, enquanto células CD5⁻ não produziram IL-10 sob estas condições (Spencer, Poynter *et al.*, 1997).

Como foi visto, há várias evidências da existência de células B com funções reguladoras, tanto dentro do subtipo B-1 quanto do subtipo B-2. Mesmo assim, o exato

fenótipo dessas células ainda não foi estabelecido. Sabe-se que as Bregs possuem a expressão da molécula CD5 e geralmente secretam IL-10 (Bouaziz, Yanaba *et al.*, 2008).

2. OBJETIVOS

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que células B são capazes de capturar o DNA plasmideal Hsp65 *in vivo*, (Coelho-Castelo, Santos Junior *et al.*, 2003), e apresentarem peptídeos derivados da proteína Hsp65 para as células T, o que foi demonstrado pela proliferação dessas células (Almeida, comunicação pessoal). Esses dados em conjunto, sugerem novas perspectivas da participação de diferentes tipos celulares na ativação da resposta imune mediada por vacinas de DNA, pois mostram que as células B também podem agir como APC e produzir citocinas que modulem a resposta de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, contribuindo para a geração/manutenção da memória imunológica de vida longa. Diante destes resultados, o objetivo proposto no presente trabalho foi avaliar a importância dos linfócitos B na geração e manutenção de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória, após a imunização com DNA-Hsp65 ou antígeno protéico.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos deficientes de células B ($\mu\text{M}^{-/-}$ - Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME)- Bko ou o tipo selvagem (C57BL/6)- WT, machos com 4-6 semanas de idade. Os animais foram fornecidos pelo biotério de animais isogênicos do departamento de bioquímica e imunologia da Faculdade de medicina de Ribeirão Preto-USP. Estes foram mantidos em micro isoladores de animais, com temperatura, umidade, fluxo de ar e ciclo de luz claro/escuro controlados, com livre acesso à água e ração devidamente autoclavados. A troca das caixas foi feita semanalmente. Em intervalos quinzenais, foi colocado um suplemento Vita Gold (TORTUGA) na água dos animais, a fim de melhorar o suprimento nutricional dos mesmos, principalmente dos animais nocautes que são bastante frágeis. Estes procedimentos foram adotados pois muitos morriam durante o experimento, desfazendo o n experimental. Estas medidas garantiram uma maior sobrevivência dos animais.

3.2. Plasmídeos

3.2.1. Obtenção dos plasmídeos recombinantes *pcDNA3-Hsp65* e *pcDNA3*

Os plasmídeos *pcDNA3-Hsp65*, e *pcDNA3* (vetor) gentilmente cedidos pelo prof. Célio Lopes Silva, foram purificados por cromatografia de troca iônica, utilizando-se o Endofree Plasmid Giga Kit™ (QIAGEN Inc., Valencia, CA, USA). Para a realização desse protocolo, uma colônia de bactérias *E. coli* DH5 α ™ transformada com o plasmídeo recombinante *pcDNA3* ou *pcDNA3-Hsp65*, foi retirada de uma placa recém

preparada contendo meio LB Agar (SIGMA, Germany) e ampicilina (Cilidon™) na concentração de 100 µg/ml. Esta colônia foi inoculada em 5,0 ml de caldo LB BROTH BASE (GIBCO BRL, Scotland) com ampicilina (100 µg/ml) e incubada durante 8 horas a 37°C sob agitação vigorosa em incubadora com agitação (Incubador shaker series 25, New Brunswick, Edison, New Jersey, USA). A cultura inicial foi diluída 1/500 em 2,5 litros de caldo LB BROTH BASE, contendo ampicilina (100 µg/ml), e incubada a 37°C sob agitação durante 16 horas. Após incubação o material foi centrifugado a 3.180 g por 15 minutos a 4 °C e o sedimento ressuspendido em 125 ml de tampão P1 (Tris-HCl 50 mM pH 8,0; EDTA 10 mM e RNase 100 µg/ml). Em seguida foram adicionados 125 ml de tampão P2 (NaOH 200 mM; SDS1%) e após 5 minutos adicionou-se 125 ml do tampão P3 (acetato de potássio 3,0 M pH 5,5). O material foi filtrado, adicionado ao tampão ER (para remoção do LPS – composição não revelada pelo fabricante) e mantido no gelo por 30 minutos. O filtrado foi aplicado à resina da QIAGEN™ previamente equilibrada com tampão QBT (NaCl 750 mM; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15% e Triton X-100 0,15 %). Após a aplicação do filtrado, a resina foi lavada com 600 ml de tampão QC (NaCl 1,0 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %) e o DNA plasmideal foi eluído com 30 ml de tampão QF (NaCl 1,25 M; MOPS 50 mM pH 7,0; etanol 15 %). O DNA eluído foi precipitado em 52,5 ml de isopropanol e em seguida centrifugado a 20.000 g por 45 minutos a 4°C e o sedimento ressuspendido em 0,5 - 1,0 ml de água.

3.2.2. Quantificação e avaliação da integridade dos plasmídeos purificados

A quantificação dos plasmídeos pcDNA3 e pcDNA3-Hsp65 foi realizada por espectrofotometria nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm utilizando o aparelho Gene Quant II™ (Pharmacia Biotech, Cambridge - England).

A presença do inserto da Hsp65 no plasmídeo pcDNA3-Hsp65 foi verificada utilizando as enzimas de restrição *Bam* H I e *Not* I (Invitrogen, life technologies). Um micrograma do pcDNA3 foi digerido com *Bam* H I, e plasmídeo pcDNA3-Hsp65 foi incubado com *Bam* H I (1 unidade/ μ g de DNA) e *Not* I (1 unidade/ μ g de DNA) a 37°C por 3 horas. Em seguida os produtos da digestão de cada amostra, e também os plasmídeos não digeridos, foram submetidos a eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich, Germany) a 1%. As amostras foram ressuspensas em tampão de eletroforese 6 vezes concentrado (0,25 % azul de bromofenol; 40 % de sucrose em água) e o material submetido a eletroforese em tampão TAE (Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8,3). A corrida foi realizada a 76 V por 1 hora utilizando o aparelho da Life Technologies Inc., Modelo 250 (BRL). O padrão de 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, life technologies) foi utilizado como marcador de peso molecular. O gel foi corado com 0,5 μ g/ml de brometo de etídio (Gibco BRL) e a visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta no ImageMaster VDS (Pharmacia Biotech).

3.2.3. Análise da pureza da vacina gênica

A determinação da presença de endotoxinas bacterianas nas vacinas purificadas pelo “kit” Qiagen Giga Plasmid Purification EndoFree foi realizada pelo teste cromogênico do lisado de amebócito de *Limulus polyphemus* (LAL), que é um teste quantitativo para mensuração de endotoxinas de bactérias gram-negativas utilizando o “QCL-100 LAL kit” (*Bio Whittaker – CAMBREX Company*). Primeiramente, a endotoxina foi reconstituída pela adição de 1 ml de água fornecida pelo próprio kit seguido de agitação vigorosa e homogeneização em vórtex por 15 minutos. Com o auxílio de uma seringa de 10 ml, foi reconstituído o substrato cromogênico com a adição de 6,5 ml de água. O frasco foi protegido da luz e posteriormente incubado em

placa de 96 poços, a 37°C até o momento do uso. A seguir, o LAL foi reconstituído pela adição de 1,4 ml de água com auxílio de uma seringa. Uma vez com os reagentes reconstituídos, retirou-se a placa da estufa e preparou-se a curva padrão por diluições sucessivas da endotoxina partindo de uma concentração 1 Unidade de endotoxina por ml (UE/ml) até 0,1 UE/ml. Posteriormente as amostras foram depositadas na placa e foram adicionados 50 µl do LAL e incubado a 37°C por 10 minutos.

Com auxílio de uma micropipeta, foram depositados 100 µl do substrato cromogênico em todos os poços (amostras e curva), seguidos de homogeneização e incubação a 37°C por 6 minutos. Posteriormente foram acrescentados 100 µl de uma solução de ácido acético 25% para interrupção da reação. Finalmente foi feita a determinação das densidades ópticas (D.O.) em espectrofotômetro a 405 nm e os resultados foram determinados correlacionando à curva padrão com a diluição das amostras, levando em consideração a absorbância e a concentração de endotoxina para esse ponto de cada uma das amostras, em relação à curva padrão. A fórmula aplicada para calcular a quantidade de LPS por micrograma de DNA foi:

$$\text{UE}/\mu\text{g DNA} = \frac{\text{UE/mL X diluição}}{\text{amostra } \mu\text{g/mL}}$$

Consideraram-se amostras livres de endotoxina, aquelas que apresentaram valores menores a 0,1 UE/µg DNA

3.3. Obtenção da proteína Hsp65 recombinante

Bactérias *E. coli* ER2566 transformadas com o plasmídeo pET28a (Novagen, USA) contendo o gene da Hsp65 foram cultivadas em 2,5 litros de meio LB líquido

(Gibco BRL, USA) contendo canamicina na concentração de 100 µg/ml e 300 mM do indutor IPTG (*Isopropylthio-β-D-Galactoside*, Gibco BRL) a 37°C sob agitação de por 18 horas. Após incubação, as células foram coletadas por coletor de alta pressão. Após centrifugação a 5000 g por 15 minutos em centrífuga J2HS (Beckman, rotor JS-7.5), as células foram ressuspensas em 20 ml de tampão fosfato tamponado (PBS) e lisadas em homogeneizador de alta pressão. Após centrifugação a 20600 g por 20 minutos, o sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspensado em 30 ml de PBS contendo uréia a 5 M e agitado por 1 hora. A suspensão foi então centrifugada a 20600 g por mais 20 minutos e o sobrenadante coletado e submetido à cromatografia de afinidade utilizando-se a coluna HiTrap Chelating HP (Amersham Pharmacia, USA), conforme o protocolo especificado pelo fornecedor. A amostra de proteína foi eluída da coluna por concentrações crescentes de imidazol. Após eluição a proteína foi dialisada contra PBS 1X durante 16 horas a 4°C.

Para a quantificação da proteína Hsp65 recombinante utilizou-se Coomassie® *Protein Assay Reagent* (Pierce, USA) e para a quantificação de endotoxinas o teste de LAL.

3.4. Imunizações

Os animais receberam 3 imunizações de 100 µg de pcDNA3-Hsp65 no músculo quadríceps, a intervalos quinzenais. O DNA plasmideal foi diluído em solução salina e em sacarose 25%. A sacarose promove uma pequena inflamação no local da imunização, o que auxilia na captura do DNA plasmideal pelas células. As injeções foram feitas em dois sítios (cada músculo quadríceps), sendo 50 µl por injeção. Para o controle de imunização protéica, os animais foram imunizados com 50 µg de ovoalbumina de ovo de galinha (OVA) emulsificados em 50 µl de adjuvante completo

de Freund (ACF), sendo a segunda e a terceira imunizações em adjuvante incompleto de Freund (AIF). Foram aplicados 100 µl de emulsão subcutaneamente. Animais também foram imunizados com 3 doses de 100 µg somente do vetor pcDNA3 e, 100 µl de solução salina como controles negativos do experimento. Segue abaixo o cronograma das imunizações.

GRUPOS (3 animais)	VIA DE ADMINISTRAÇÃO	1ª imunização Dia 0	2ª imunização Dia 15	3ª imunização Dia 30
BKO Salina	intramuscular (músculo quadríceps)	100µl salina	100µl salina	100µl salina
BKO Vetor	intramuscular (músculo quadríceps)	100µg pcDNA3 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3 diluídos em sacarose 25%
BKO Hsp65	intramuscular (músculo quadríceps)	100µg pcDNA3- Hsp65 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3- Hsp65 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3- Hsp65 diluídos em sacarose 25%
BKO OVA	subcutâneo	50µg OVA (diluídos em 50µl de PBS 1X) 50µl adjuvante ACF	50µg OVA (diluídos em 50µl de PBS 1X) 50µl adjuvante AIF	50µg OVA (diluídos em 50µl de PBS 1X) 50µl adjuvante AIF
WT Salina	intramuscular (músculo quadríceps)	100µl salina	100µl salina	100µl salina
WT Vetor	intramuscular (músculo quadríceps)	100µg pcDNA3 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3 diluídos em sacarose 25%
WT Hsp65	intramuscular (músculo quadríceps)	100µg pcDNA3- Hsp65 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3- Hsp65 diluídos em sacarose 25%	100µg pcDNA3- Hsp65 diluídos em sacarose 25%
WT OVA	subcutâneo	50µg OVA (diluídos em 50µl de PBS 1X) 50µl adjuvante ACF	50µg OVA (diluídos em 50µl de PBS 1X) 50µl adjuvante AIF	50µg OVA (diluídos em 50µl de PBS 1X) 50µl adjuvante AIF

Tabela 1: Esquema mostrando o cronograma das imunizações realizadas.

3.5. Detecção do fenótipo celular de memória por citometria de fluxo

A indução e a manutenção da resposta imune foram avaliadas após a resposta primária e secundária. Para resposta primária, foram utilizadas células do baço obtidas dos animais sete dias após a última imunização. Para resposta secundária foram utilizadas células do baço obtidas de animais, 15 ou 30 dias após a imunização. A análise feita nestes períodos de tempo após as imunizações, foi importante para traçar a cinética de indução das células de memória. A fenotipagem está descrita no item abaixo.

3.5.1. Fenotipagem das células do baço 7 dias após a última imunização

Sete dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados. O baço foi retirado de maneira estéril e macerado. As hemácias foram lisadas com o tampão de lise Ack (NH_4Cl - 0,15M ; KHCO_3 - 10mM; EDTA- 0,1mM- PH= 7,3) estéril e livre de endotoxinas. Após a lise, as células foram centrifugadas a 405 g durante 15 minutos a 4°C e foi feita a determinação do número de células viáveis em câmara de Neubauer (corante azul de tripan). Devido ao pequeno intervalo de tempo da última imunização, não houve necessidade de reestímulo das células. Após a determinação do número e viabilidade estas células foram distribuídas em tubos de poliestireno, 1×10^6 células em volume de 100 μl por tubo, e incubadas durante 30 minutos, a 4°C, com anticorpo anti-CD16/CD32 (Fc BlockTM- PharMingen), na concentração de 0,5 $\mu\text{g}/10^6$ células. Esta incubação visa minimizar as ligações inespecíficas. Posteriormente, essas células foram incubadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse, de acordo com a tabela abaixo (0,5 – 2 μg de anticorpo/ 1×10^6 células) durante 30 minutos, a 4°C, protegidos da luz. Após o tempo de incubação, as células foram lavadas com 2 ml de PBS 1X contendo 2% de soro bovino fetal (SFB), centrifugadas a 405 g, por 10 minutos

a 4°C e ressuspendidas em 250 µl de PBS 1X contendo 1% de formol tamponado para a fixação das células. As preparações celulares foram adquiridas no aparelho FACsCanto™ (Becton & Dickinson, USA). Foram adquiridas 10.000 células por tubo, analisadas pelo software FACs DIVA, de acordo com parâmetros de tamanho, *forward scartter* (FSC), complexidade interna, *side scartter* (SSC) e intensidade de fluorescência dos anticorpos marcados com ficoeritrina (PE), isotiocianato de fluoresceína (FITC), alofococianina (Apc) e proteína peridina clorofila-a (PERCP).

Inicialmente, foi determinada a população de linfócitos, baseada nos parâmetros FSC e SSC, para detecção das porcentagens de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺). A expressão de CD44^{high} e CD62L^{low} (memória efetora) ou CD44^{high} CD62L^{high} (memória central) foi analisada nas populações de linfócitos CD4⁺ ou CD8⁺. Todos os anticorpos foram adquiridos da PharMingen e utilizados de acordo com as instruções do fabricante. O CD127 só foi utilizado nos períodos de 15 e 30 dias após as imunizações.

MARCAÇÕES	FITC	PE	APC	PERCP
A (isotipo controle)	Rat IgG2ak	Rat IgG2ak	Rat IgG2ak	Rat IgG2ak
B (compensação)	CD4	CD8	–	–
C (memória T CD4 ⁺)	CD62L	–	CD44	CD4
D (memória T CD8 ⁺)	CD62L	CD127	CD44	CD8
E (CD3 ⁺ /CD19 ⁺)	CD3	CD19	–	–

Tabela 2: Lista dos anticorpos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo, e seus respectivos fluorocromos. As marcações A, B e E foram feitas uma por cada grupo de imunização, enquanto que as demais marcações, C e D foram feitas para todos os animais.

3.5.2. Fenotipagem das células do baço 15 ou 30 dias após a última imunização

Quinze ou trinta dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados. O baço foi retirado e processado de acordo com o item **3.5.1**. Após a determinação do número de células, estas foram colocadas em placas de 24 poços contendo 1×10^6 células por poço em 1 ml de meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de SBF (Gibco), penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 mg/ml), gentamicina (10 mg/ml) (Gibco), e polimixina (30 μ g/ml). Estas células foram reestimuladas com 20 μ g de Hsp65 recombinante para as células daqueles animais que foram imunizados com DNA-Hsp65 ou pcDNA3, ou 20 μ g de OVA para as células daqueles animais que foram imunizados com OVA + adjuvante, durante 24 horas em estufa B.O.D. a 37°C 5% CO₂. Após a incubação, essas células foram retiradas da placa, distribuídas em tubos de poliestireno (1×10^6 células por poço) e tratadas com os respectivos anticorpos monoclonais de interesse, como descrito no item **3.5.1**. Nestes intervalos de tempo, houve também a marcação das células TCD8⁺ com o anticorpo monoclonal anti-CD127 (PE).

3.6. Transferência adotiva de células B CD43⁻ (B-2) para animais Bko

Para a realização da transferência adotiva de células B, foram usados animais Bko como receptores. As células B foram purificadas a partir de animais C57Bl/6 por micro esferas magnéticas e injetadas por via endovenosa nos animais *naive*. Após 24 horas, os animais foram imunizados seguindo o protocolo já descrito no item **3.4**.

3.6.1. Purificação das células B CD43⁻ (B-2)

Para a purificação dessas células foram usados camundongos C57Bl/6 com 6 semanas de idade. Os animais foram eutanasiados, o baço retirado, e as células processadas de acordo com o item 3.5.1. Após a determinação do número de células, estas foram ressuspensas em PBS contendo 2 mM de EDTA e 0,5% de SBF- (tampão de *beads*), 90 µl por cada 10⁷ células. Em seguida, essas células foram incubadas com o anticorpo anti-CD43 ligado à micro esferas magnéticas (MACS[®] MicroBeads system - Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) por 15 minutos a 4° C. Após a incubação, as células foram lavadas e ressuspensas em 500 µl de tampão de *beads*. A coluna de separação foi equilibrada com 3 ml deste mesmo tampão e em seguida a solução contendo as células foi aplicada. As células marcadas magneticamente (CD43⁺), ficam retidas na coluna dentro de um campo magnético e na primeira fração coletada, já contém somente os linfócitos CD43⁻ que corresponde aos linfócitos B-2. Em seguida, a coluna foi lavada com 3x de 3 ml de tampão de *beads*. Todo o processo foi feito seguindo-se o protocolo recomendado pelo fabricante e de maneira estéril.

3.6.2. Transferência das células para os animais Bko

Após o processo de separação das células B, novamente foi determinado o número de células em câmara de Neubauer (azul de tripan). Estas foram ressuspensas em solução salina e injetadas por via endovenosa 10⁶ células em 100 µl de salina por animal no plexo orbital. Após 24 horas da injeção das células, os animais receberam a primeira imunização seguindo o protocolo já descrito no item 3.4.

3.6.3. Fenotipagem das células do baço

Quinze ou trinta dias após a última imunização, os animais foram eutanasiados. O processamento das células do baço e a marcação com os respectivos anticorpos monoclonais foram feitos de acordo com o protocolo descrito no item **3.5.2**.

3.7. Caracterização do perfil de expressão de citocinas por reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real no baço dos animais 15 e 30 dias após a última imunização

Para determinação do perfil de citocinas produzidas, 15 ou 30 dias após as imunizações, os animais foram eutanasiados e foi retirado o baço. O processamento das células do baço e o reestímulo foram feitos seguindo o protocolo descrito no item **3.5.2**. Após as 24 horas de reestímulo, foram separadas 1×10^7 células que foram congeladas em TRIzol para posterior extração do ácido ribonucléico (RNA).

3.7.1. Extração do RNA total das células

O RNA total das células dos animais imunizados, foi obtido utilizando-se o reagente TRIzol (Gibco BRL). Foi usado 1 ml de TRIzol para até 1×10^7 células. Após as 24 horas de reestímulo, as células foram centrifugadas, todo o meio de cultura foi retirado, e em seguida foram ressuspensas diretamente no TRIzol e congeladas a -70°C . No momento da extração, as amostras foram incubadas por 5 minutos à temperatura ambiente para completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Adicionou-se 200 μl de clorofórmio para cada 1 ml de TRIzol utilizado no início da extração, e o material foi agitado vigorosamente por 15 segundos e mantido por mais 3 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas a 12.000 g a 4°C durante 15 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa (sobrenadante) foi

cuidadosamente recuperada, transferida para um novo tubo e o RNA foi precipitado pela adição 700 µl de isopropanol gelado. O material foi deixado por 10 minutos à temperatura ambiente e em seguida foi novamente centrifugado a 12.000 g durante 10 minutos a 4° C e o precipitado, lavado com etanol 75% gelado. Em seguida, o precipitado foi ressuspenso em 20 µl de água tratada com dietilpircarbonato (DEPC), livre de enzima que degrada RNA (RNase) e enzima que degrada DNA (DNase) (Gibco BRL) e estocado a -70°C.

3.7.2 Construção do cDNA a partir do RNA total

3.7.2.1 Tratamento com DNase I

Antes da síntese do DNA complementar (cDNA), 1 µg do RNA total obtido como descrito acima, foi tratado com a enzima *Amplification grade* DNase I (INVITROGEN) na presença de tampão contendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl e 2 mM de MgCl₂. Utilizou-se 1 unidade da enzima para cada 1µg de RNA. A reação foi mantida por 15 minutos a 25° C, seguida da adição de 1µl de EDTA a 25 mM e inativada a 70° C por adicionais 15 minutos.

3.7.2.2 Síntese de cDNA

O material obtido do tratamento com DNase I foi utilizado para a síntese de cDNA fita simples com a *SuperScript II* (Gibco BRL). Para cada 1 µg de RNA total foi adicionado 1 µl de oligo (dT)₁₂₋₁₈ [500 µg/ml] (Gibco BRL) e 1 µl da mistura de desoxinucleotídeos fosfatados (dNTPs) a 10 mM. A mistura foi mantida por 10 minutos a 70°C. Adicionou-se tampão da enzima para uma concentração final de 50 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 75 mM de KCl, 3 mM de MgCl₂ e 0,02 mM de DTT. O material foi mantido a 4°C durante 2 minutos e em seguida equilibrado a 42°C por 2 minutos e

incubado com 1 μ l (200 U) de *SuperScript* durante 50 minutos a 42-45°C. A reação foi inativada pela incubação a 70°C por 15 minutos e o material obtido foi utilizado para amplificação do cDNA específico.

3.7.2.3 Amplificação do cDNA específico por PCR em tempo real

Para estas reações, 200 ng de cDNA foram utilizados como molde para amplificação do alvo específico. A reação (25 μ l) foi conduzida na presença de 0,1 μ g/ μ l de cada *primer sense* (S) e *anti-sense* (AS) e Platinum SYBR Green qPCR Super Mix-UDG (Invitrogen). A temperatura de anelamento utilizada foi 58° C para os *primers* β - actina, IL-12 (p40), INF- γ , IL-10 e FoxP3. Já para os *primers* das citocinas IL-7 e IL-15 as temperaturas de anelamento foram 60° e 59°C respectivamente. As reações foram feitas no aparelho Rotor-Gene (Corbett Life Science, Mortlake, NSW, Australia). A amplificação do gene da β - actina foi feita como controle da integridade das amostras e para se fazer a quantificação relativa dos genes de interesse a este gene. Após a amplificação da β -actina, foram feitas as amplificações dos genes descritos a cima. A sequência de cada *primer* está descrita na tabela abaixo:

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' - 3')
β- actina	S- AGC TGC GTT TTA CAC CCT TT
	AS- AAG CCA TGC CAA TGT TGT CT
IL-12 (p40)	S- AGC ACC AGC TTC TTC ATC AGG
	AS- GCG CTG GAT TCG AAC AAA G
IFN-γ	S- GAT ATC TGG AGG AAC TGG CAA
	AS- GCT CTG CAG GAT TTT CAT GTC
IL-10	S- TGG ACA ACA TAC TGC TAA CCG
	AS- GGA TCA TTT CCG ATA AGG CT
FoxP3	S- AGC ACC AGC TTC TTC ATC AGG
	AS- GCG CTG GAT TCG AAC AAA G
IL-7	S- TCT GCT GCC TGT CAC ATC ATC
	AS- GGA CAT TGA ATT CTT ACT GAT ATT CA
IL-15	S- CCA TCT CGT GCT ACT TGT G
	AS- TCT GTG AAG TTT TCT CCT CA

Tabela 3: Sequência dos *primers* utilizados no experimento de caracterização do perfil de citocinas por PCR em tempo real.

3.8. Caracterização do perfil de expressão de citocinas pelas células B

Para caracterização do perfil de expressão de citocinas produzidas pelas células B, 15 ou 30 dias após a última imunização, as células B do baço de animais C57Bl/6 foram diretamente purificadas após as imunizações por micro esferas magnéticas como descrito no item 3.6.1. Essas células não foram reestimuladas, e o nível de expressão das citocinas foi avaliado por PCR em tempo real como descrito no item 3.7. Foram usadas citocinas IL-12 (p40) e IFN-γ, IL-10, assim como forkhead box 3 (FoxP3).

3.9. Fenotipagem das células B produtoras de IL-10

Para caracterização do fenótipo das células B produtoras de IL-10, as células B foram purificadas do baço de animais imunizados como descrito no item 3.5.1, e colocadas em placas de 24 poços contendo 1×10^6 células por poço em 1 ml de meio RPMI 1640 (Sigma), suplementado com 10% de SBF (Gibco), penicilina (100 U/ml),

estreptomicina (100 mg/ml), gentamicina (10 mg/ml) (Gibco), e polimixina (30 µg/ml). Estas células foram reestimuladas com 20 µg de Hsp65 recombinante para as células daqueles animais que foram imunizados com DNA-Hsp65 ou pcDNA3, ou 20 µg de OVA para as células daqueles animais que foram imunizados com OVA + adjuvante, durante 24 horas em estufa B.O.D. a 37°C 5% CO₂. Após o reestímulo, essas células foram retiradas da placa e incubadas com anti-CD16/CD32 para minimizar as marcações inespecíficas por 45 minutos. Em seguida, essas células foram incubadas com anticorpos de interesse: anti-CD19 (FITC), anti-CD5(PE). Após a marcação com estes anticorpos, as células foram fixadas em PBS 1X contendo formol tamponado 1% por 15 minutos, e em seguida, lavadas com PBS 1X contendo 2% de SBF. Após esta lavagem, as células foram incubadas com o anticorpo anti-IL-10 (Apc) intracelular diluído em PBS saponina (0,01%) para permeabilizar essas células para que houvesse a marcação efetiva do anticorpo. Após 30 minutos de incubação, as células foram novamente lavadas e fixadas em PBS 1X contendo formol tamponado 1% e a leitura foi feita em FACsCantoTM (Becton & Dickinson, USA) no software FACs DIVA. Este ensaio de caracterização destas células B foi realizado pois o método de separação destas células do baço por micro esferas magnéticas utilizado nos experimentos anteriores, somente purifica células B convencionais B-2 (CD43⁻). A população de células B produtoras de IL-10, segundo a literatura, é mais relacionada com o tipo B-1 (CD43⁺). Como encontramos dentro destas células B purificadas por micro esferas magnéticas que expressavam IL-10, fomos investigar qual era o fenótipo destas células. Assim, realizamos o ensaio de caracterização destas células B por citometria de fluxo.

3.10. Análise estatística

Para a realização das análises estatísticas, foi usado o programa Graph Pad Prism 5.0 (Graph Pad Software Inc.), e foi empregado o Teste ANOVA seguido do teste Tukey. A diferença significativa foi considerada entre valores com $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Obtenção dos plasmídeos

4.1.1. Sequenciamento dos plasmídeos

O plasmídeo pcDNA3-Hsp65 contém todo o gene que codifica a proteína Hsp65 do *M. leprae*. Esses plasmídeos foram então, obtidos através do kit comercial QIAGEN®. Antes de iniciar os experimentos com as imunizações, a integridade dos plasmídeos foi verificada utilizando as enzimas de restrição *Bam* H I para linearização do plasmídeo e *Not* I para liberação do enxerto da Hsp65. A análise de eletroforese em gel de agarose 1% mostrou que a digestão do pcDNA3-Hsp65 (*Bam* H I e *Not* I) produziu 2 bandas, uma de 5,4 kb representando o vetor (pcDNA3) e a outra de 3,3 kb representando todo o segmento gênico da Hsp65 juntamente com 1500 pares de base não transcritos (Figura 1, canaleta 5). Por outro lado, o pcDNA3 digerido (*Bam* H I), mostrou perfil eletroforético correspondente ao tamanho do vetor, com uma banda de 5,4 kb (Figura 1, canaleta 3). Cabe ressaltar que todas as amostras tiveram índices de endotoxina menores que 0,1 UE/μg de DNA, portanto aceitáveis para testes *in vivo*, como recomendado pela farmacopéia americana e européia.

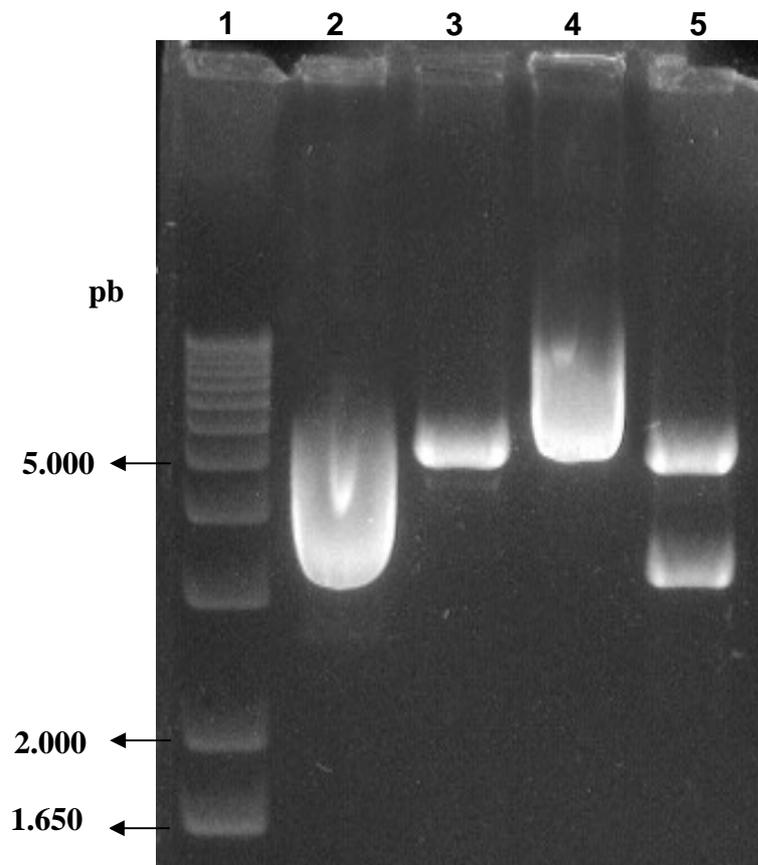


Figura 1. Perfil eletroforético dos plasmídeos pcDNA3 e pcDNA3-Hsp65. A eletroforese foi realizada em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Canaletas 1: 1kb DNA Ladder (Invitrogen), utilizado como marcador de pares de base (pb); Canaletas 2: pcDNA3 não digerido formando uma banda única; Canaletas 3: pcDNA3 digerido com *BamH I* tornando o plasmídeo linearizado, mostrando que este obteve o tamanho esperado; Canaletas 4: pcDNA3-Hsp65 não digerido mostrando a ausência de RNA; Canaletas 5: pcDNA₃-Hsp65 digerido com *BamH I* e *Not I*, liberando o fragmento correspondente ao gene da Hsp65.

4.2. Animais Bko apresentam maior porcentagem de células T

Primeiramente fomos avaliar o perfil de células T nos animais deficiente de células B. Optamos por avaliar a porcentagem das células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais no baço. Podemos observar de acordo com as Figuras 2 e 3, que há uma maior porcentagem tanto de T CD4⁺ quanto T CD8⁺ em animais deficientes de células B aos 15 e 30 dias após as imunizações. Observamos também que nos dois períodos de tempo analisados, há uma maior porcentagem de células T CD4⁺ em animais Bko (Figuras 2 e 3- esquerda) quando comparada às células T CD8⁺ (Figuras 3 e 4- direita). Em animais normais, não houve diferença significativa entre a porcentagem de T CD4⁺ e T CD8⁺. Quando analisamos a porcentagem de células entre os grupos de imunização (DNA-Hsp65 e OVA), observamos que aos 15 dias, há uma maior porcentagem de T CD4⁺ nos animais Bko imunizados com OVA, e uma maior porcentagem de T CD8⁺ imunizados com DNA-Hsp65 (Figura 2). Aos 30 dias, não observamos nenhuma diferença entre os grupos de imunização nem em animais Bko nem WT (Figura 3).

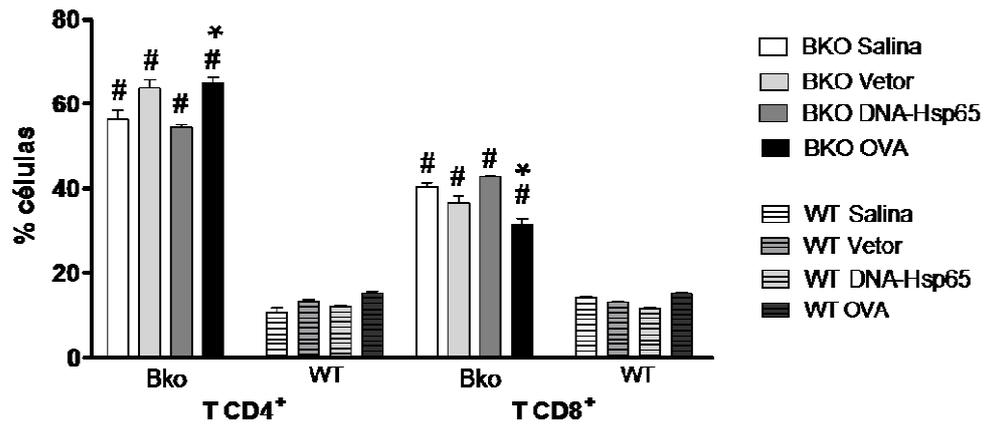


Figura 2: Porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais induzidas na presença ou ausência de células B, 15 dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais conforme descrito em materiais e métodos. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas e marcadas para CD4⁺ ou CD8⁺. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto em animais Bko quanto WT.

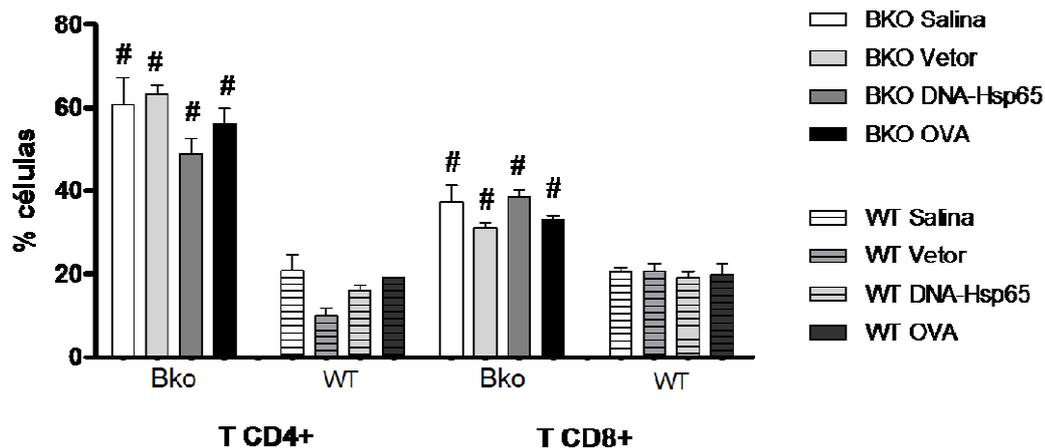


Figura 3: Porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais induzidas na presença ou ausência de células B 30 dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas e marcadas para CD4⁺ ou CD8⁺. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

4.3. Ausência de células B promove diminuição de células T CD4⁺ de memória efetora mas não interferem em T CD8⁺ TEM

O próximo passo, foi avaliar a cinética de geração das células T CD4⁺ e T CD8⁺ de memória induzidas nestes animais. Para isto, foram feitas análises por citometria de fluxo das células do baço aos 7, 15 e 30 dias após as imunizações para avaliação dos fenótipos de TEM – memória efetora (CD44^{high}/CD62L^{low}), e de TCM – memória central (CD44^{high}/CD62L^{high}).

Aos 7 dias após as imunizações, observamos a presença de células TEM enquanto que a porcentagem de células TCM foi indetectável (dados não mostrados). Células T com esses fenótipos foram obtidas independente do protocolo de imunização (DNA ou proteína), e encontrado tanto para T CD4⁺ quanto para T CD8⁺. Observamos também uma maior porcentagem de células T CD4⁺ em animais WT quando comparado com animais Bko em todos os grupos de imunização exceto no grupo DNA-Hsp65 (Figura 4 e 5). Somente houve diferença na porcentagem de células T CD8⁺ entre animais Bko e WT nos grupos imunizados com Vetor e DNA-Hsp65. Sendo que houve uma maior porcentagem dessas células em animais WT imunizados com Vetor, e uma menor porcentagem de T CD8⁺ em animais WT imunizados com DNA-Hsp65. Entre os grupos imunizados com DNA-Hsp65 e OVA, houve uma porcentagem maior de células CD4⁺ TEM, em animais imunizados com DNA-Hsp65 quando comparado com o grupo OVA, em animais Bko. Para T CD8⁺, também houve uma maior porcentagem de CD8⁺ TEM em animais Bko e WT imunizados com DNA-Hsp65.

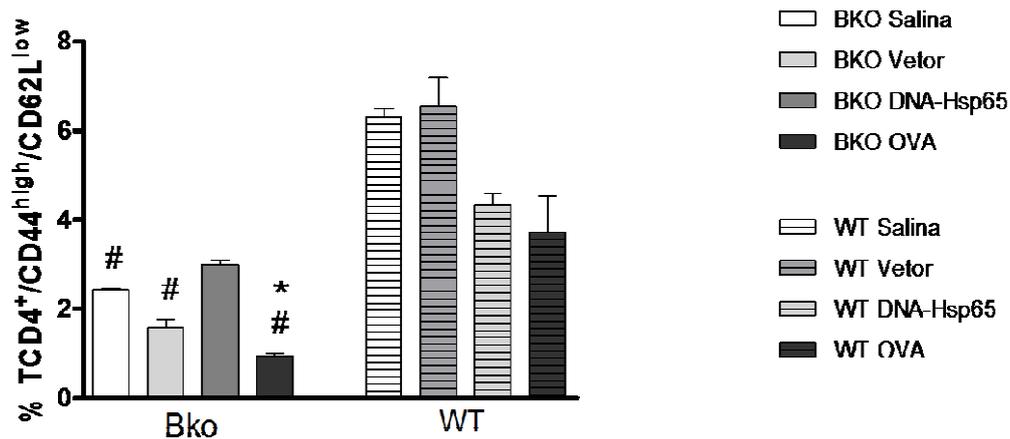


Figura 4: Perfil da população CD4⁺ com fenótipo TEM, sete dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Sete dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram avaliadas para fenótipo de memória efetora CD4⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bko.

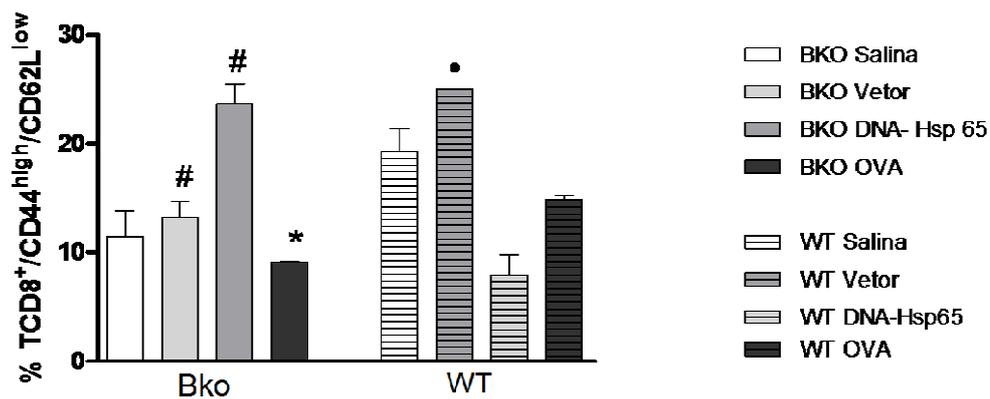


Figura 5: Perfil da população CD8⁺ com fenótipo TEM, sete dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Sete dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram avaliadas para fenótipo de memória efetora CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bko.

• p<0,05 em relação aos demais grupos de imunização nos animais WT.

O mesmo perfil fenotípico encontrado nas células aos 7 dias, se manteve aos 15 dias após a imunização (figuras 6 e 7). Novamente a porcentagem de células com fenótipo TCM foi indetectável (dados não mostrados). Em animais Bko, também foi observada uma menor porcentagem de células CD4⁺ TEM quando comparada aos animais WT (Figura 6), enquanto que não houve diferença significativa entre a porcentagem de células CD8⁺ TEM entre os animais Bko e WT (Figura 7). Comparando os dois grupos de imunização, somente notamos diferença na porcentagem de células T CD8⁺ em animais Bko, sendo estas maiores em animais imunizados com OVA. Observamos também uma porcentagem de células CD4⁺ TEM em animais WT, e CD8⁺ TEM em animais Bko e WT bastante alta nos grupos controles imunizados com Vetor plasmideal pcDNA3.

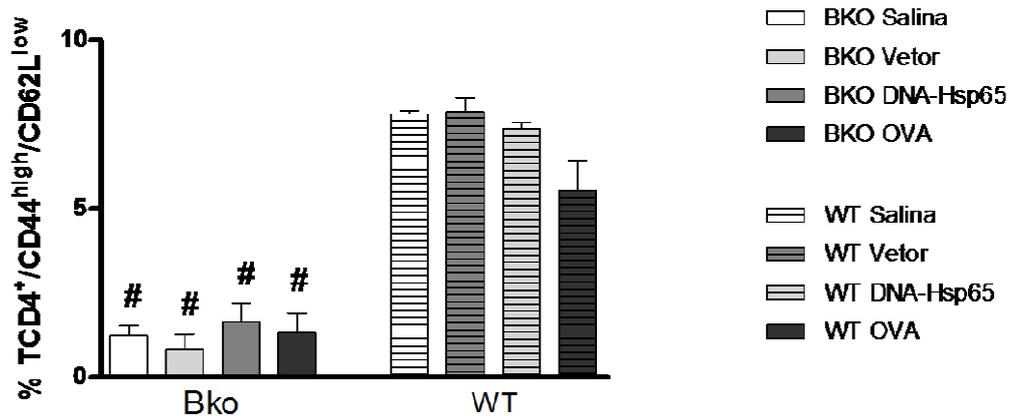


Figura 6: Perfil da população CD4⁺ com fenótipo TEM, quinze dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas e avaliadas para fenótipo de memória efetora CD4⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

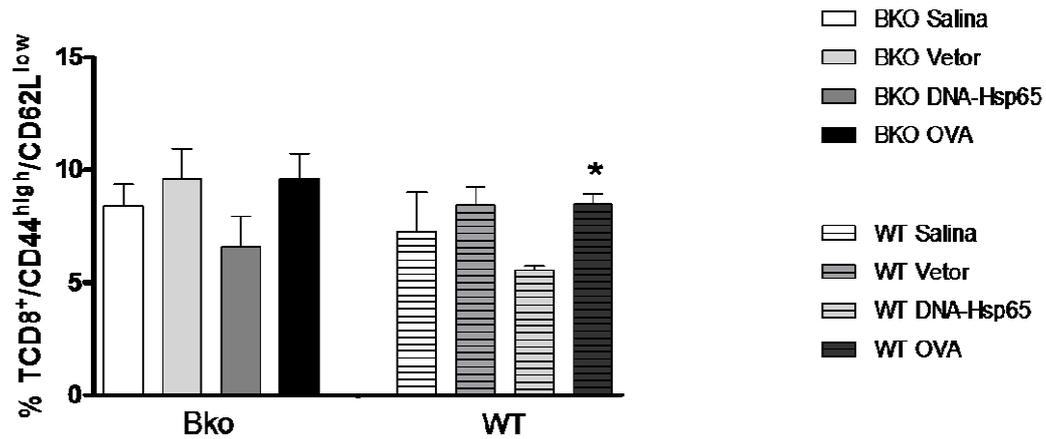


Figura 7: Perfil da população CD8⁺ com fenótipo TEM, quinze dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas e avaliadas para fenótipo de memória efetora CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais WT.

Observamos nas figuras 8 e 9 o aparecimento de células $CD4^+$ e $CD8^+$ TCM ($CD4^+$ ou $CD8^+/CD44^{high}/CD62L^{high}$) 30 dias após as imunizações. Esta população foi detectável de maneira mais robusta para T $CD8^+$ (Figura 9). Mais uma vez, a porcentagem de células $CD4^+$ TEM está diminuída nos animais Bko, mas para as TCM somente houve esta diferença no grupo imunizado com OVA (Figura 8). Entre os grupos de imunização, observamos uma maior porcentagem de $CD4^+$ TEM e TCM em animais Bko imunizados com OVA. Nos WT, também houve uma maior porcentagem de $CD4^+$ TCM nos animais do grupo OVA quando comparado com DNA-Hsp65. Para T $CD8^+$ novamente não foi encontrada nenhuma diferença na porcentagem de TEM e TCM entre os animais deficientes de células B e animais normais. Também não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos de imunização para T $CD8^+$.

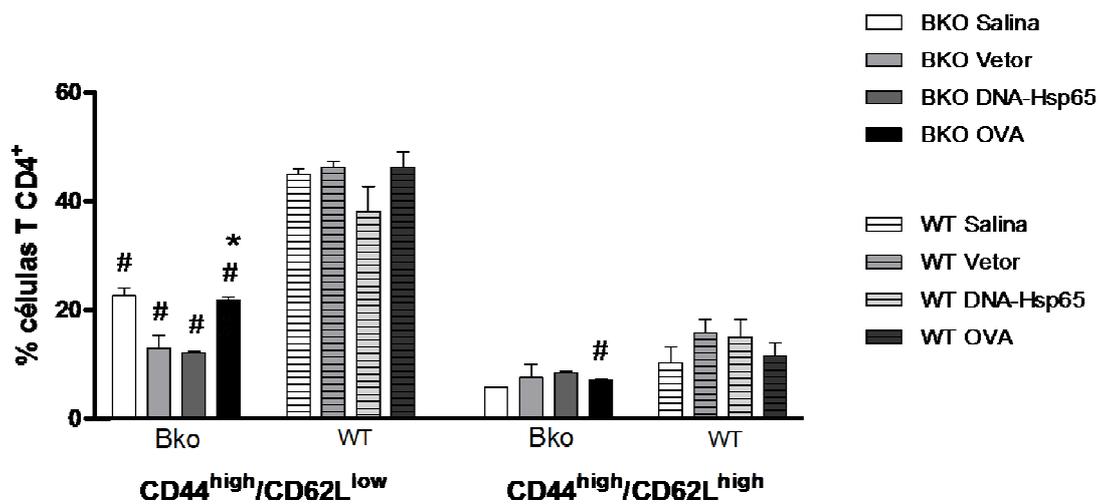


Figura 8: Perfil da população CD4⁺ com fenótipo TEM e TCM, trinta dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas e avaliadas para fenótipo de memória efetora CD4⁺/CD44^{high}/CD62L^{low} e memória central CD4⁺/CD44^{high}/CD62L^{high}. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bko.

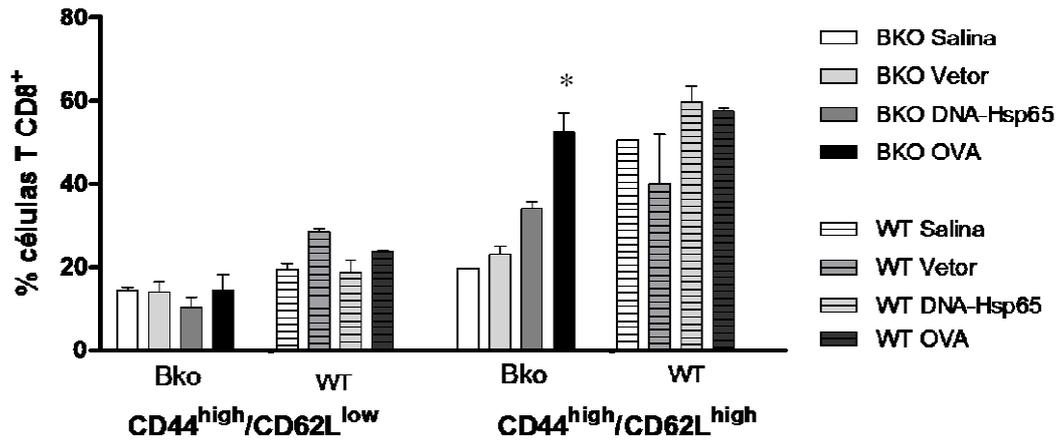


Figura 9: Perfil da população CD8⁺ com fenótipo TEM e TCM, trinta dias após as imunizações. Os animais receberam 3 imunizações em intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas e avaliadas para fenótipo de memória efetora CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low} e memória central CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{high}. As análises foram realizadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

P<0,05 em relação aos demais grupos de imunização nos animais Bko

4.4. Ausência de células B promove diminuição das células T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺

Como nossos dados mostravam que a ausência de células B não estava interferindo na porcentagem de células T CD8⁺ de memória efetora nos 3 períodos de tempo avaliados, o próximo passo foi analisar como estaria a expressão de CD127 nestas células. O CD127 é a cadeia alfa do receptor trimérico da IL-7. Esta citocina auxilia na manutenção das células T, principalmente células T CD8⁺ de memória. E a responsividade de uma célula à IL-7 depende da expressão deste receptor. Observamos que nos dois intervalos de tempo analisados (15 e 30 dias após as imunizações) a porcentagem de células T CD8⁺ que expressavam CD127 estava diminuída em animais Bko em relação aos animais WT (Figuras 10 e 11). Entre os grupos de imunização, aos 15 dias, observamos uma maior porcentagem de células CD127⁺ em animais Bko imunizados com OVA, e uma maior porcentagem de células CD127⁺ em animais WT imunizados com DNA-Hsp65 (Figura 10). Aos 30 dias após as imunizações, Houve uma maior porcentagem de células CD127⁺ tanto em animais Bko quanto WT imunizados com OVA (Figura 11).

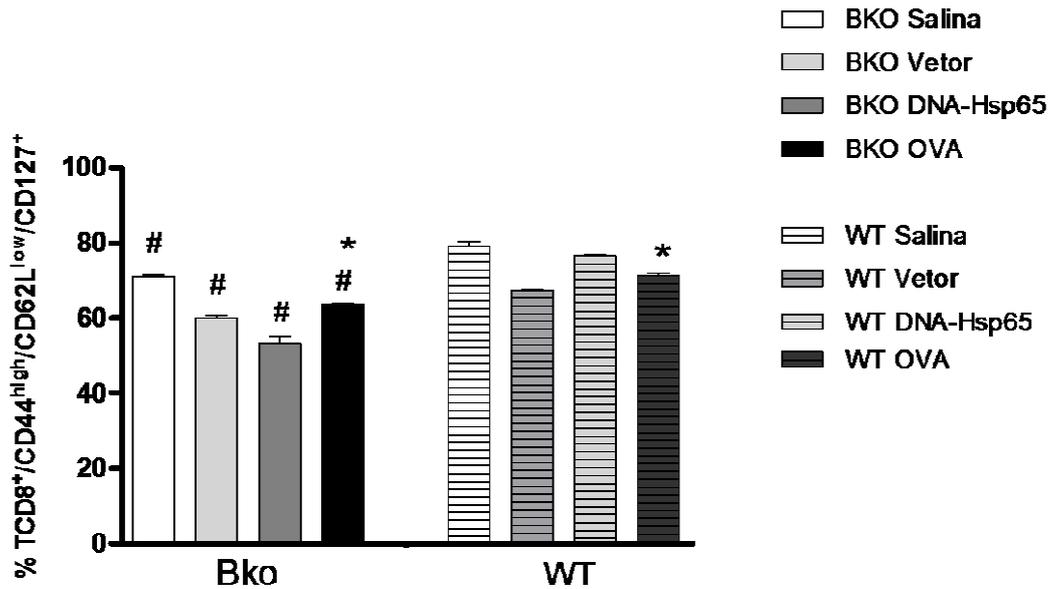


Figura 10: Análise da porcentagem de células T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺, em animais deficientes ou não de linfócitos B, 15 dias após a terceira imunização. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas durante 24 horas. Células com fenótipo T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺ foram avaliadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto nos animais Bko quanto WT.

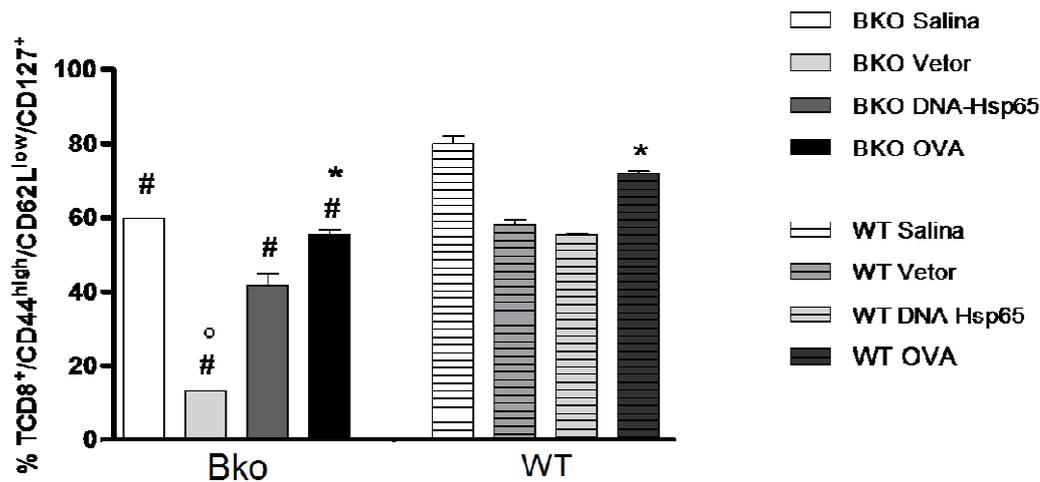


Figura 11: Análise da porcentagem de células T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺, em animais deficientes ou não de linfócitos B, 30 dias após a terceira imunização. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. Células com fenótipo T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺ foram avaliadas por citometria de fluxo com aquisição de 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto nos animais Bko quanto WT.

° p<0,05 em relação aos demais grupos de imunização nos animais Bko

4.5. Transferência adotiva de células B CD43⁻ (B-2) para animais Bko recuperou a porcentagem normal de células T CD4⁺ de memória no baço desses animais

Para verificarmos se era realmente a ausência de células B CD43⁻ que estava promovendo uma diminuição na porcentagem de células T CD4⁺ de memória, fizemos uma transferência adotiva dessas células para animais Bko, 24 horas antes das imunizações. Quinze dias após o término do protocolo de imunização, observamos que a porcentagem de célula CD4⁺ TEM, foi maior nos animais Bkot que receberam a transferência adotiva de células, quando comparada à porcentagem encontrada nos animais Bko que não receberam a transferência (Figura 12 e A e B). Entretanto, a população de células T CD4⁺ TEM foi ainda maior nos animais que receberam as células B do que nos próprios animais WT aos 15 dias (Figura 12 A). Comparando-se os grupos de imunização, observamos que houve uma maior porcentagem de células T CD4⁺ em animais do grupo DNA-Hsp65 que receberam a transferência de células tanto aos 15 dias após as imunizações para TEM. Para T CD8⁺, nenhuma diferença foi observada entre a porcentagem de células nos animais Bko e WT e os animais que receberam a transferência de células (Bkot), mas animais imunizados com DNA-Hsp65 que receberam a transferência de células apresentaram uma maior porcentagem de células T CD8⁺ quando comparados com animais imunizados com OVA que receberam a transferência (Figura 13 A e B).

Aos 30 dias após as imunizações, observamos que a porcentagem de células CD4⁺ TEM e TCM foi maior nos animais Bko que receberam transferência de células B, quando comparado com animais Bko que não receberam transferência de células (Figuras 14 A e B). E a porcentagem de células CD4⁺ TEM foi ainda maior em animais Bkot imunizados com DNA-Hsp65 quando comparado com animais WT imunizados com DNA-Hsp65. Entre os grupos de imunização, houve uma maior porcentagem de

células CD4⁺ TEM nos animais imunizados com DNA-Hsp65. Não houve diferença na porcentagem de células CD4⁺ TCM entre os grupos de imunização (Figura 14).

Para T CD8⁺, ao contrário de T CD4⁺ foi detectada uma menor porcentagem de células TEM nos animais Bko que receberam a transferência de células B, do que naqueles animais que não receberam a transferência de células. Para TCM houve uma maior porcentagem de células T CD8⁺ nos animais Bko quando comparados com os animais Bko (Figura 15, A e B). Não houve nenhuma diferença significativa entre os grupos de imunização para TEM ou TCM (Figuras 14 e 15). Cabe ressaltar que os resultados das porcentagens de células em animais Bko que receberam a transferência de células B e os resultados das porcentagens em animais Bko e WT foram experimentos independentes. Os dados da porcentagem de células nos animais Bko e WT foram retirados das figuras 5 a 8.

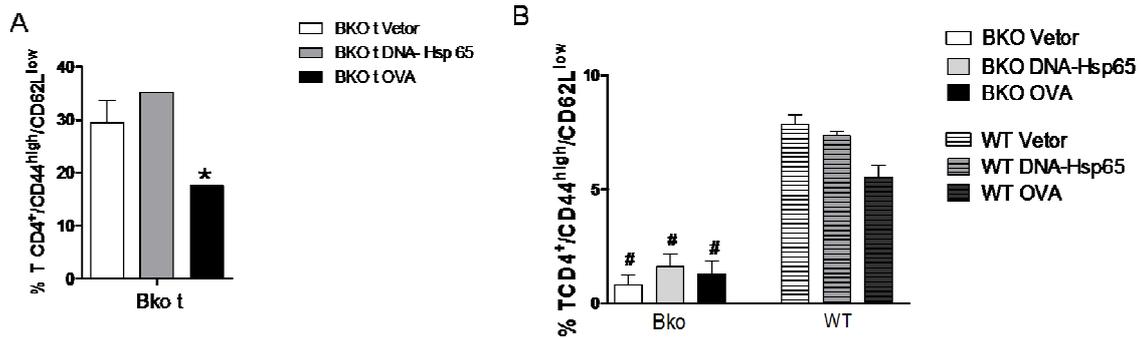


Figura 12: Perfil das células CD4⁺ TEM (CD44^{high}/CD62L^{low}) em animais Bko que receberam transferência de células B, 15 dias após a última imunização. (A) Porcentagem de células CD4⁺ TEM de animais Bko que receberam a transferência de células B (Bko t); (B) Porcentagem de células CD4⁺ TEM encontrada em animais Bko e WT após as imunizações (dados retirados da figura 6). Os animais Bko *naive* receberam 10⁶ células B (CD43⁻). Após 24 horas da transferência, os animais foram imunizados como descrito em materiais e métodos. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. As análises foram feitas por citometria de fluxo para o fenótipo de memória descrito a cima. Foram adquiridos 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bkot.

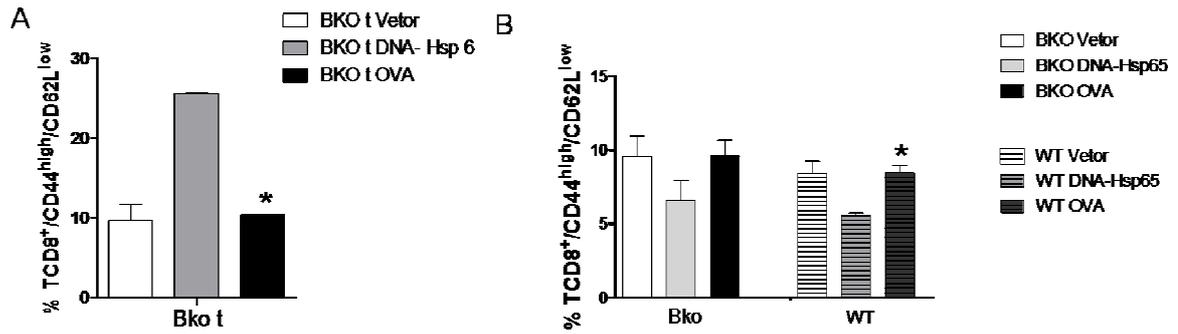


Figura 13: Perfil das células CD8⁺ TEM (CD44^{high}/CD62L^{low}) em animais Bko que receberam transferência de células B, 15 dias após a última imunização. (A) Porcentagem de células CD8⁺ TEM de animais Bko que receberam a transferência de células B (Bko t); (B) Porcentagem de células CD8⁺ TEM encontrada em animais Bko e WT após as imunizações (dados retirados da figura 7). Os animais Bko *naive* receberam 10⁶ células B (CD43⁻). Após 24 horas da transferência, os animais foram imunizados como descrito em materiais e métodos. Quinze dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. As análises foram feitas por citometria de fluxo para o fenótipo de memória descrito a cima. Foram adquiridos 10 mil eventos por animal.

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto nos animais Bko quanto WT.

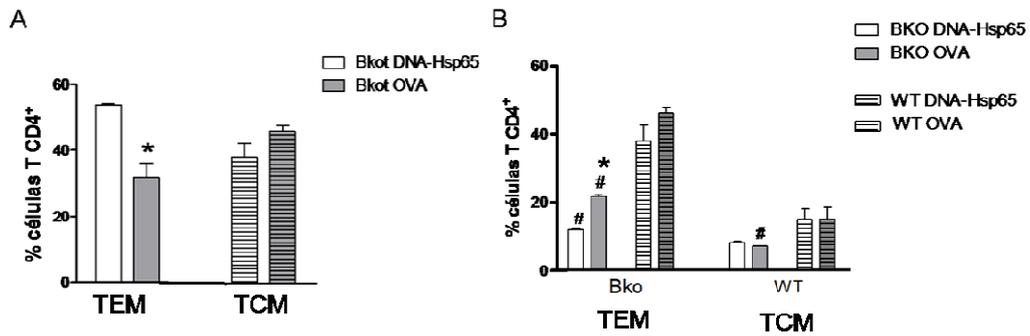


Figura 14: Perfil das células CD4⁺ TEM (CD44^{high}/CD62L^{low}) e TCM (CD44^{high}/CD62L^{low}) em animais Bko que receberam transferência de células B, 30 dias após a última imunização. (A) Porcentagem de células CD4⁺ TEM e TCM de animais Bko que receberam a transferência de células B (Bko t); (B) Porcentagem de células CD4⁺ TEM e TCM encontrada em animais Bko e WT após as imunizações (dados retirados da figura 8). Os animais Bko *naive* receberam 10⁶ células B (CD43⁻). Após 24 horas da transferência, os animais foram imunizados como descrito em materiais e métodos. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. As análises foram feitas por citometria de fluxo para o fenótipo de memória descrito a cima. Foram adquiridos 10 mil eventos por animal.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto nos animais Bkot quanto Bko.

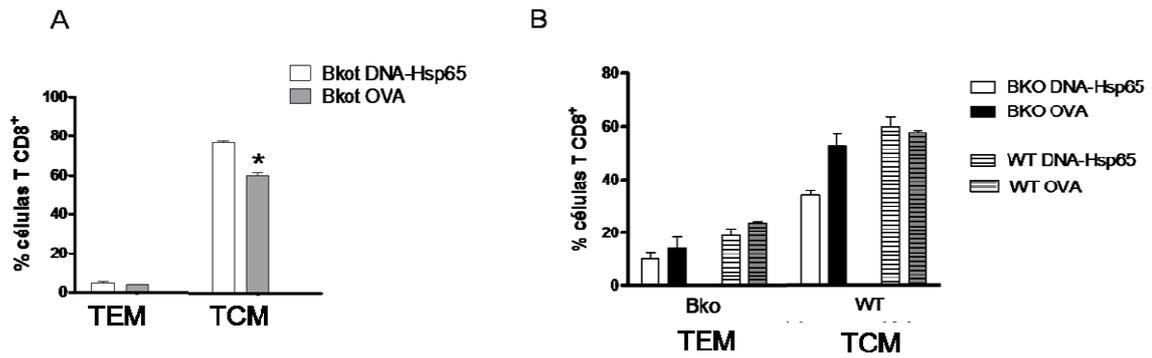


Figura 15: Perfil das células CD8⁺ TEM (CD44^{high}/CD62L^{low}) e TCM (CD44^{high}/CD62L^{low}) em animais Bko que receberam transferência de células B, 30 dias após a última imunização. (A) Porcentagem de células CD8⁺ TEM e TCM de animais Bko que receberam a transferência de células B (Bko t); (B) Porcentagem de células CD8⁺ TEM e TCM encontrada em animais Bko e WT após as imunizações (dados retirados da figura 9). Os animais Bko *naive* receberam 10⁶ células B (CD43⁺). Após 24 horas da transferência, os animais foram imunizados como descrito em materiais e métodos. Trinta dias após a última imunização, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. As análises foram feitas por citometria de fluxo para o fenótipo de memória descrito a cima. Foram adquiridos 10 mil eventos por animal.

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bko.

4.6 Avaliação do perfil de expressão de citocinas no baço dos animais imunizados

Para verificar se o perfil de citocinas no baço de animais imunizados com DNA plasmideal e OVA poderiam gerar um microambiente diferente para explicar nossos resultados, fizemos uma análise da produção de citocinas no baço dos animais nas duas condições de imunização. Primeiramente, fomos analisar o perfil de citocinas pro-inflamatórias IL-12 (p40) e INF- γ . Verificamos que, aos 15 dias após as imunizações, não houve diferença significativa na expressão de IL-12 (p40) entre animais WT e Bko, independente do estímulo (Figura 16 A). Sendo que, se compararmos apenas os animais vacinados com DNA e OVA, observa-se uma maior expressão nos animais que receberam o DNA. Aos 30 dias, no entanto, houve um aumento bastante significativo na expressão de IL-12 (p40) tanto em animais Bko quanto WT, (Figura 16 B). Surpreendentemente, houve uma maior expressão de IL-12 (p40) em animais Bko do que em animais WT. Quando comparamos a expressão de IL-12 (p40) entre os grupos de imunização, observamos uma maior expressão desta citocina no grupo DNA- Hsp65 somente em animais Bko aos 15 dias após as imunizações.

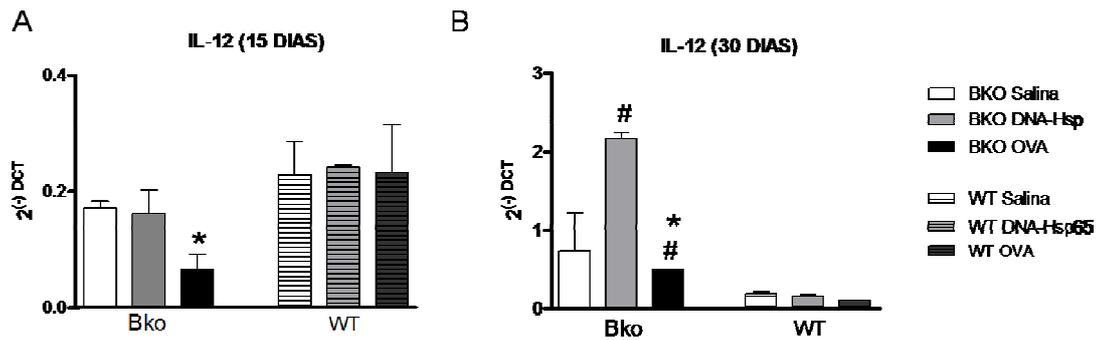


Figura 16: Análise da expressão do gene da IL-12 (p40) por PCR em tempo real no baço dos animais deficientes de células B ou não. (A) Expressão de IL-12 (p40) quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IL-12 (p40) trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. Após o reestímulo, as células foram coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bko.

A análise da expressão de IFN- γ (Figura 17 A e B) aos 15 dias mostrou uma imunomodulação entre os animais WT e Bko. Nessa fase os WT mostraram uma maior expressão de IFN- γ (Figura 17 A). Não houve diferença significativa entre os grupos de imunização. Já aos 30 dias após as imunizações, também houve um aumento significativo da expressão de IFN- γ tanto em animais Bko quanto WT em ambos os grupos de imunização analisados (Figura 17 B). E ao contrário do que observamos aos 15 dias após imunizações, aos 30 dias, houve uma maior expressão IFN- γ em animais Bko. E tanto em Bko quanto WT, animais imunizados com DNA-Hsp65 tiveram uma maior expressão desta citocina.

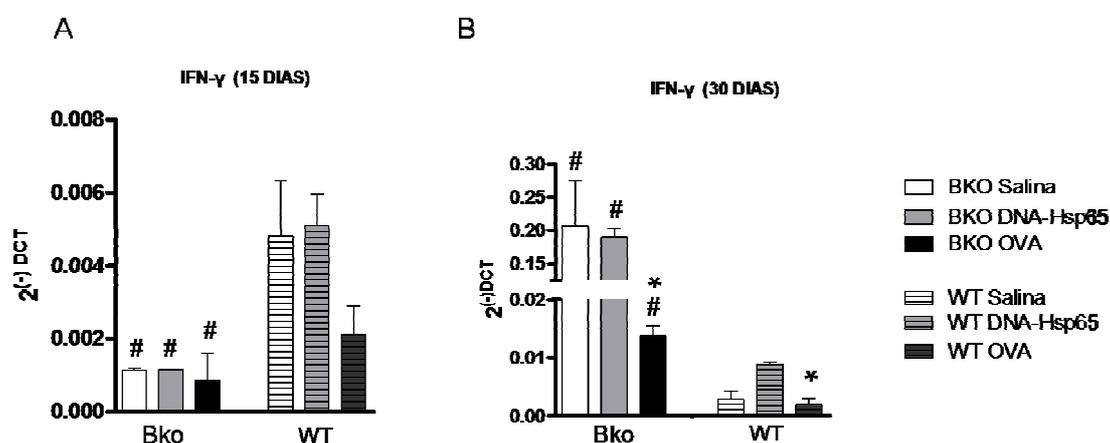


Figura 17: Análise da expressão do gene IFN- γ por PCR em tempo real no baço dos animais deficientes de células B ou não. (A) Expressão de IFN- γ quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IFN- γ trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. Após o reestímulo, as células foram coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

$p < 0,05$ em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* $p < 0,05$ em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto nos animais Bko quanto WT

Para verificar se estava havendo uma indução da expressão de citocinas antiinflamatórias, fomos avaliar a expressão de IL-10 pelas células do baço dos animais. Observamos aos 15 e 30 dias após as imunizações, que houve a expressão de IL-10 e uma maior expressão desta citocina entre animais WT quando comparados com animais Bko (Figura 18 A). Entre os grupos de imunização, houve diferença significativa aos 30 dias entre Bko, DNA-Hsp65 e OVA, com uma produção de IL-10 nos animais imunizados com OVA. Esta diferença também se repetiu nos animais WT. Em conjunto, esses dados mostram que na ausência de células B o perfil de citocinas induzido após a vacinação com DNA ou antígeno protéico é diferente, podendo influenciar na proteção.

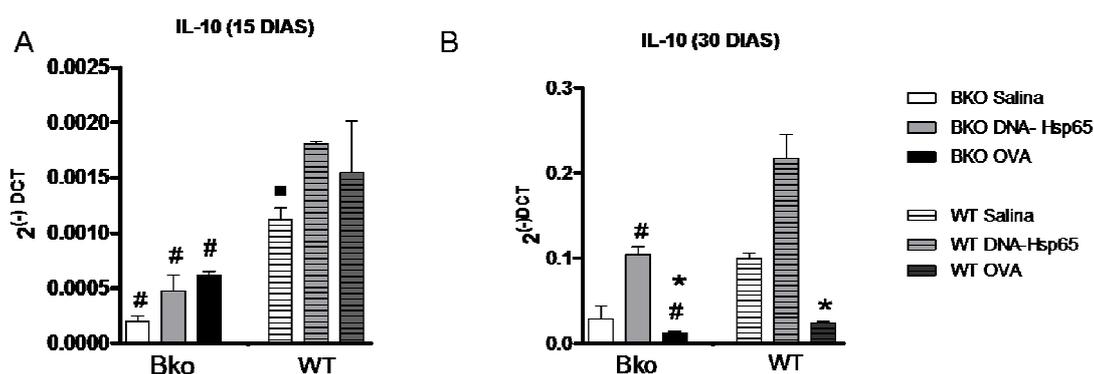


Figura 18: Análise da expressão do gene IL-10 por PCR em tempo real no baço dos animais deficientes de células B ou não. (A) Expressão de IL-10 quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IL-10 trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. Após o reestímulo, as células foram coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

p<0,05 em relação aos grupos de imunização correspondentes em animais WT (Bko X WT).

* p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 tanto nos animais Bko quanto WT

■ p<0,05 em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65 nos animais Bko.

Após verificarmos a expressão de citocinas inflamatórias e antiinflamatórias, fomos avaliar se a ausência de células B estaria influenciando na expressão de citocinas que auxiliam na manutenção das células de memória. Aos 15 dias após as imunizações, vimos que não houve diferença na expressão de IL-7 entre WT e Bko (Figura 19 A). Também não houve diferença na expressão desta citocina entre os grupos imunizados com DNA-Hsp65 e OVA. Aos 30 dias, novamente não observamos diferenças na expressão de IL-7 entre Bko e WT (Figura 19 B), mas vimos que os animais Bko imunizados com DNA-Hsp65 apresentaram uma menor expressão de IL-7 quando comparada com animais Bko imunizados com OVA. Já nos animais WT, aqueles que foram imunizados com OVA, a expressão do gene da IL-7 foi indetectável. Além disso, podemos observar que houve um aumento significativo na expressão de IL-7 aos 30 dias quando comparado aos 15 dias após as imunizações.

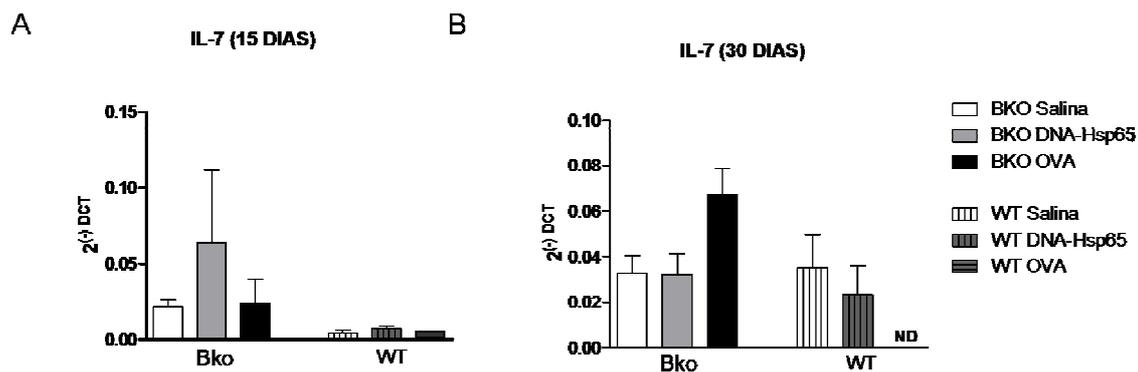


Figura 19: Análise da expressão do gene IL-7 por PCR em tempo real no baço dos animais deficientes de células B ou não. (A) Expressão de IL-7 quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IL-7 trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. Após o reestímulo, as células foram coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

ND: nível de expressão não detectável

A figura 20 mostra que também não houve nenhuma diferença na expressão de IL-15 entre animais Bko e WT nem aos 15 (Figura 20 A) nem aos 30 dias após as imunizações (Figura 20 B). Nenhuma diferença significativa foi encontrada entre nenhum grupo de imunização nos dois períodos de tempo analisados.

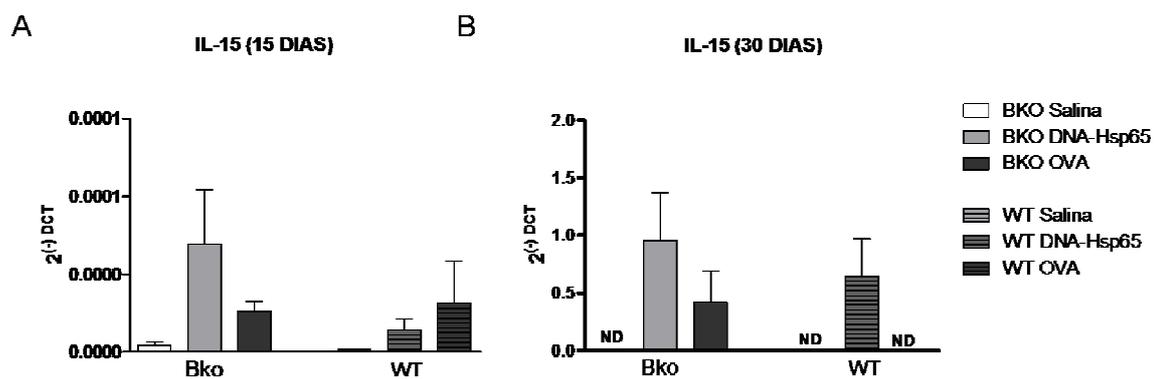


Figura 20: Análise da expressão do gene IL-15 por PCR em tempo real no baço dos animais deficientes de células B ou não. (A) Expressão de IL-15 quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IL-15 trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações, os animais foram sacrificados e as células do baço foram reestimuladas por 24 horas. Após o reestímulo, as células foram coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

ND: expressão não detectável

4.7. Células B são importantes na produção de citocinas pro- inflamatórias

Após verificar que realmente a ausência das células B promovia uma diminuição das células T CD4⁺ de memória efetora aos 7, 15 e 30 dias após as imunizações, e principalmente, que os animais WT apresentavam diminuição de células de memória em resposta a antígenos diferentes, fomos investigar como estas células poderiam estar auxiliando na geração/ manutenção dessas células T nos modelos de vacinação com DNA-Hsp65 e OVA, pela avaliação da expressão de genes de algumas citocinas pelas células B, 15 ou 30 dias após as imunizações. Podemos observar aos 15 dias após as imunizações, que as células B expressam IL-12 (p40), e que esta expressão está aumentada em células B de animais imunizados com OVA (Figura 21 A). Aos 30 dias após as imunizações, há um aumento significativo da expressão desta citocina, e novamente, células B de animais imunizados com OVA continuam mostrando uma maior expressão de IL-12 (p40). (Figura 21 B).

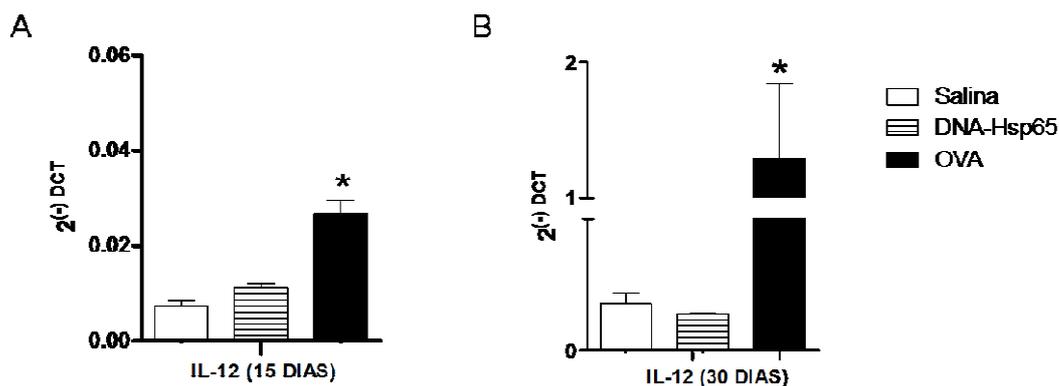


Figura 21: Análise da expressão do gene IL-12 (p40) por PCR em tempo real nas células B (CD43⁺) B-2 de animais WT imunizados. (A) Expressão de IL-12 (p40) nas células B-2, quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IL-12 (p40) nas células B-2, trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações as células B-2 foram purificadas do baço destes animais por micro esferas magnéticas com o anticorpo anti-CD43 e coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

* $p < 0,05$ em relação aos demais grupos de imunização

Também foi observado que as células B estavam expressando IFN- γ aos 15 e aos 30 dias após as imunizações (Figuras 22 A e B). Aos 15 dias, uma maior expressão é encontrada em células B-2 do grupo DNA- Hsp65 (Figura 22 A). Aos 30 dias, não houve diferença na expressão de IFN- γ entre DNA-Hsp65 e OVA (Figura 22 B). Mas, do mesmo modo que a citocina IL-12 (p40), houve um aumento significativo na expressão desta pelas células B-2 aos 30 dias após a imunização (Figura 22 A e B).

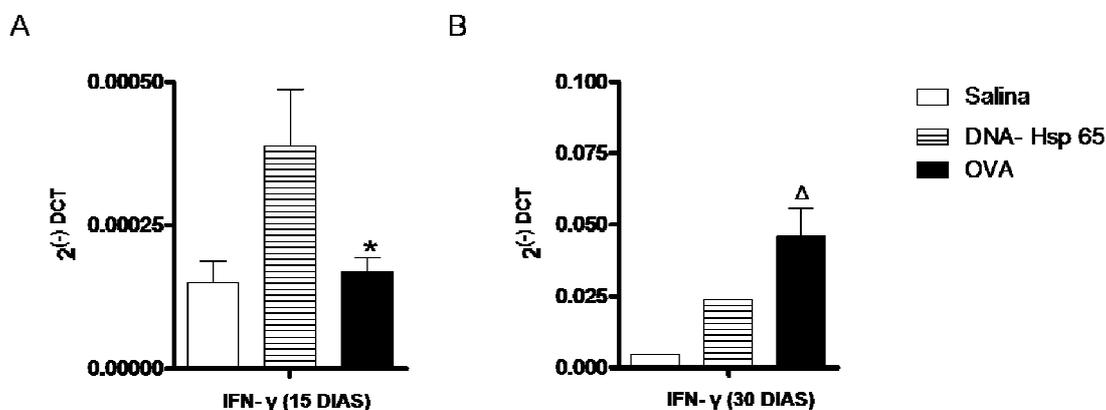


Figura 22: Análise da expressão do gene IFN- γ por PCR em tempo real nas células B (CD43-) B-2 de animais WT imunizados. (A) Expressão de IFN- γ nas células B-2, quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IFN- γ nas células B-2, trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações as células B-2 foram purificadas do baço destes animais por micro esferas magnéticas com o anticorpo anti-CD43 e coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

* $p < 0,05$ em relação aos demais grupos de imunização

$\Delta p < 0,05$ em relação ao grupo controle imunizado com salina

4.8. Células B do baço possuem uma subpopulação expressando IL-10 e FoxP3

Para verificar se estas células B estavam também induzindo um padrão supressor de resposta, principalmente aos 15 dias após as imunizações, avaliamos a expressão de IL-10 por estas células B também nos dois períodos de tempo analisados para as outras citocinas. Surpreendentemente, encontramos células B produtoras de IL-10, dentro da subpopulação de células B denominadas convencionais (B-2), as quais foram purificadas do baço dos animais por micro esferas magnéticas. Apesar de estas células B estarem expressando IL-10, não foi encontrada nenhuma diferença entre os grupos de imunizações, nem aos 15 nem aos 30 dias (Figura 23 A e B). Também aos 30 dias, houve um aumento significativo na expressão de IL-10 quando comparado aos 15 dias. Estes resultados mostram evidências de que poderia haver uma população de células B reguladoras na subpopulação de células B purificadas do baço dos animais. Diante deste fato, fomos investigar qual era o fenótipo dessas células que estavam produzindo IL-10. A figura 24 mostra a fenotipagem das células B produtoras de IL-10. Observamos uma subpopulação de cerca de 8 a 15% de células B com fenótipo: $CD43^-/CD19^+/CD5^+/IL-10^+$. Este resultado contrasta com a porcentagem de células $CD43^-/CD19^+/CD5^-/IL-10^+$ que foi cerca de 0,25 a 1% destas células que produziram IL-10.

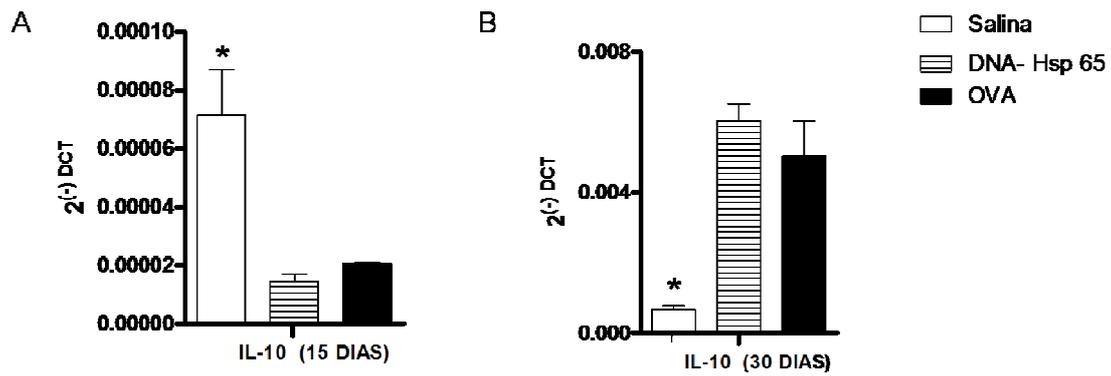


Figura 23: Análise da expressão do gene IL-10 por PCR em tempo real nas células B (CD43-) B-2 de animais WT imunizados. (A) Expressão de IL-10 nas células B-2 quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de IL-10 nas células B-2 trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações as células B foram purificadas do baço destes animais por micro esferas magnéticas com o anticorpo anti-CD43 e coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

* $p < 0,05$ em relação aos demais grupos de imunização

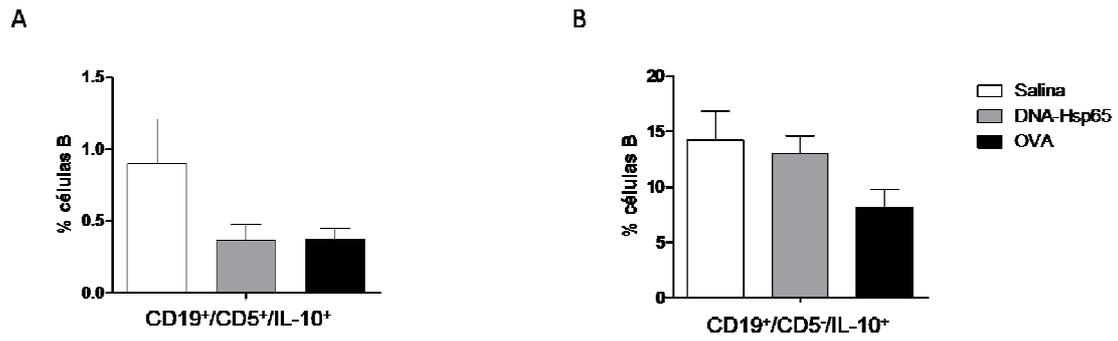


Figura 24: Análise do perfil fenotípico das células B do baço produtoras de IL-10. (A) Células B com fenótipo CD19⁺/CD5⁺/IL-10⁺ (B) Células B com fenótipo CD19⁺/CD5⁻/IL-10⁺. Os animais receberam 3 imunizações a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze dias após as imunizações as células B foram purificadas do baço destes animais por micro esferas magnéticas com o anticorpo anti-CD43 e as células B CD43⁻ foram reestimuladas por 24 horas. Em seguida, foram marcadas com os anticorpos monoclonais CD19 e CD5 de superfície e IL-10 intracelular.

Como somente esses dados não foram suficientes para uma caracterização detalhada da população destas células B, optamos por mais uma análise. Fomos investigar se estas células poderiam expressar algum fator de transcrição característico de células reguladoras. Surpreendentemente, detectamos a expressão do fator de transcrição FoxP3 em células B de grupos imunizados tanto com DNA-Hsp65 quanto ao grupo imunizado com OVA (Figura 25 A e B). Observamos também que aos 30 dias após as imunizações quando comparado aos 15 dias, houve um aumento significativo da expressão deste fator (Figura 25 B). Aos 15 e 30 dias, as células B do grupo OVA apresentaram maior expressão de FoxP3 em animais imunizados com DNA-Hsp65 (Figura 25 A e B).

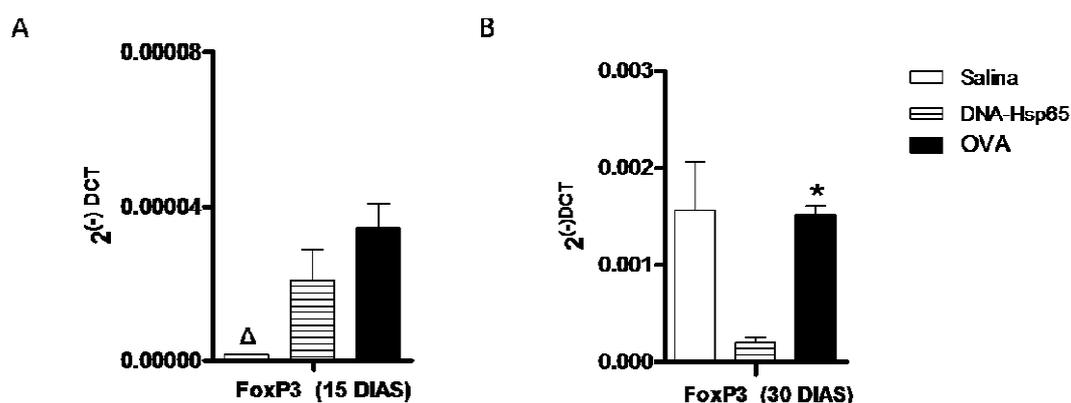


Figura 25: Análise da expressão do gene FoxP3 por PCR em tempo real nas células B (CD43-) B-2 de animais WT imunizados. (A) Expressão de FoxP3 nas células B-2 quinze dias após as imunizações; (B) Expressão de FoxP3 nas células B-2 trinta dias após as imunizações. Os animais foram imunizados com 3 doses a intervalos quinzenais como descrito em materiais e métodos. Quinze ou trinta dias após as imunizações as células B foram purificadas do baço destes animais por micro esferas magnéticas com o anticorpo anti-CD43 e coletadas para extração de RNA e avaliação da expressão gênica.

* $p < 0,05$ em relação aos animais imunizados com DNA-Hsp65

Δ $p < 0,05$ em relação aos demais grupos de imunizações

5. DISCUSSÃO

Os resultados deste trabalho mostram que as células B são importantes para geração e/ou manutenção de células T já nos primeiros 7 dias após a imunização. Estas observações corroboram com resultados de (Liu, Wu *et al.*, 1995; Constant, 1999; Linton, Harbertson *et al.*, 2000) que mostraram que linfócitos B podem capturar, processar e apresentar antígenos solúveis participando da indução de resposta imune de células T CD4⁺. Além disso, estes resultados sugerem que as células B possam estar modulando a resposta imune dependente de antígenos. Assim, na imunização com DNA plasmideal, a presença de células B pode induzir um padrão misto de resposta, podendo influenciar na proteção. Cabe ressaltar que os dados obtidos mostram dois aspectos importantes: 1) a detecção de células B IL-10⁺/ Foxp3⁺, ainda inédito na literatura, e 2) O fato de a ausência de células B mostrar uma tendência na diminuição na porcentagem de células T de memória.

Inicialmente, essas observações podem sugerir que mais de uma subpopulação de células B está envolvida nesse processo, haja vista a subpopulação produtora de IL-10 que não ficou completamente caracterizada. Esses dados abrem novas perspectivas para o estudo dos subtipos de células B e a memória de células T. Há vários relatos na literatura mostrando a importância das células B na geração ou manutenção de células T de memória (Meding e Langhorne, 1991; Von Der Weid e Langhorne, 1993; Asano e Ahmed, 1996; Von Der Weid, Honarvar *et al.*, 1996; Dominic Van Essen, 2000; Van Essen, Dullforce *et al.*, 2000; Whitmire, Asano *et al.*, 2009). Mas a contribuição exata de cada subtipo de células B neste processo ainda não foi esclarecida.

Em nossos experimentos, observamos também que os animais sem linfócitos B apresentavam uma tendência no aumento da porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ totais aos 15 e 30 dias após as imunizações. Este aumento encontrado pode ser

decorrente de uma proliferação homeostática destas células a fim de se manter a população normal de células no baço. A proliferação homeostática é um evento que acontece geralmente em situações de linfopenia, e já foi descrita há mais de 20 anos. A citocina IL-7, além de auxiliar na manutenção de linfócitos T de memória, também é responsável pela permanência de células *naive* na periferia (Sun- Kyeong Lee, 2005). Em uma situação de linfopenia, a IL-7 também promove um aumento da taxa mitótica de células maduras a fim de se manter a população normal de células nos órgãos linfóides (Fry e Mackall, 2005; (Schluns, Kieper *et al.*, 2000; Alpdogan, Schmaltz *et al.*, 2001; Mackall, Fry *et al.*, 2001; Tan, Dudl *et al.*, 2001). Quando avaliamos a presença de IL-7 no baço dos animais imunizados, não há diferença estatística na expressão entre os grupos de imunização (Figura 19).

Outra possibilidade, é que na ausência de células B, conseqüentemente o número total de células no baço pode ser menor. Assim, ocorre um aumento natural na porcentagem de T CD4⁺ e T CD8⁺ totais neste órgão. Diante disto, análises mais precisas do número total de células no baço de cada animal Bko serão realizadas a fim de se testar a hipótese de proliferação homeostática.

Com relação às células T de memória, foi observado nas figuras 4 a 9, que na ausência de células B houve uma diminuição na porcentagem de células T CD4⁺ de memória efetora aos 7, 15 e 30 dias após a última imunização, sugerindo uma importância das células B desde o momento da ativação de células T CD4⁺ até o estabelecimento da memória. Estes dados contrastam com alguns relatos da literatura, (Ronchese e Hausmann, 1993; Epstein, Di Rosa *et al.*, 1995; Topham, Tripp *et al.*, 1996; Van Essen, Dullforce *et al.*, 2000), que mostram que as células B não participam dos momentos iniciais da resposta imune de células T CD4⁺.

Aos 7 dias após as imunizações, observamos uma maior porcentagem de células T CD4⁺ e T CD8⁺ em animais Bko imunizados com DNA-Hsp65 quando comparada com o grupo imunizado com OVA, sugerindo que na ausência de células B, a imunização com DNA plasmideal seja mais eficiente em ativar células T quando comparada a uma vacina protéica. Este fato pode ser devido ao mecanismo de apresentação cruzada que ocorre comumente na imunização com DNA plasmideal por via intramuscular. O mecanismo de apresentação cruzada ocorre com muita frequência em imunizações com DNA por via intramuscular. Neste tipo de imunização, o DNA plasmideal transfeta diretamente, além de APCs profissionais, células musculares que produzem a proteína de interesse endogenamente podendo apresentar peptídeos derivados desta proteína para células T CD8⁺ no contexto de MHC I, ou exportá-la para fora da célula. Assim, uma APC pode capturar esta proteína que foi exportada, e apresentar seus peptídeos via MHC II para linfócitos T CD4⁺. Este mecanismo também pode ocorrer quando uma APC fagocita células apoptóticas que estavam expressando a proteína de interesse e apresenta peptídeos derivados desta, via MHC II, ativando também linfócitos T CD4⁺ (Gurunathan, Klinman, *et al*, 2000).

Aos 15 dias, uma maior porcentagem de células T CD8⁺ foi encontrada no grupo WT imunizado com OVA, mostrando que a imunização com proteína também foi capaz de ativar células T CD8⁺. Aos 30 dias, observamos uma maior porcentagem de células T CD4⁺ em animais Bko imunizados com OVA tanto para memória efetora (CD44^{high}/CD62L^{low}) e em WT na memória central (CD44^{high}/CD62L^{high}), e uma maior porcentagem de T CD8⁺ em animais Bko imunizados com DNA-Hsp65, a pesar de neste período não ter havido diferença significativa entre esses grupos de imunização. As vacinas de DNA ativam além de T CD4⁺ comumente ativadas em vacinas protéicas, T CD8⁺ via MHCI, pois como foi anteriormente, o DNA plasmideal pode transfectar

diretamente APCs profissionais ou células musculares que são capazes de ativar uma alta porcentagem de células T CD8⁺ (Gurunathan, Klinman *et al.*, 2000).

Ao avaliar a cinética de geração das células de memória em animais deficientes de células B ou normais, observamos que aos 7 dias após as imunizações, já houve a presença de TEM (CD44^{high}/ CD62L^{low}), tanto para linfócitos T CD4⁺ quanto T CD8⁺, o que permaneceu aos 15 e 30 dias após as imunizações (figuras 6 a 9). Mas o aparecimento de células TCM somente foi observado aos 30 dias. Isto sugere que o aparecimento destas células ocorre mais tardiamente do que as células de TEM, e que o período do surgimento destas células, independe da presença das células B, pois os animais Bko assim como os WT, também apresentaram o fenótipo de TCM somente aos 30 dias após a última imunização. Pode-se assim inferir que a ausência de TCM aos 7 e 15 dias após as imunizações, possa ter sido decorrente do tempo analisado. Nestes períodos de tempo, estamos avaliando a resposta primária, sendo comum observar um maior número de células efetoras nessa fase (fase inicial) da resposta imune (Lefrançois, 2003). Este fato pôde ser verificado pela alta porcentagem de células com fenótipo CD44^{high} (dados não mostrados) que caracteriza o fenótipo de células efetoras (X. Zhang, 1998). Desse modo, podemos sugerir que aos 7 e 15 dias após imunizações, ainda não houve tempo suficiente para a formação de TCM.

De forma interessante, aos 7 dias após a última imunização, somente o grupo imunizado com DNA-Hsp65 não apresentou diferença na porcentagem de células T CD4⁺ TEM entre os animais Bko e WT, como foi observado para o grupo imunizado com OVA e os outros grupos do controle negativo- salina e vetor (Figura 4). Epstein, Di Rosa *et al.*, 1995, demonstraram que a ativação de células T em animais deficientes de células B foi normal em resposta ao KLH. Enquanto que Williams, Oxenius *et al.*, 1998 mostraram que a capacidade de células B em promover a ativação de células T

CD4⁺ depende do antígeno utilizado, mostrando assim que as células B podem não estar exercendo importância para a ativação de T CD4⁺ em resposta ao DNA plasmideal com o inserto da Hsp65. Entretanto, já foi demonstrado pelo nosso grupo, que as células B são capazes de capturar o DNA plasmideal *in vivo* (Coelho-Castelo, Santos Junior *et al.*, 2003) e apresentar peptídeos derivados da HSP65 para T CD4⁺ (Almeida, comunicação pessoal). Uma análise com um maior n experimental seria importante para concluir esta observação. Observamos também, uma menor porcentagem tanto de células T CD4⁺ quanto T CD8⁺ em Bko respondedoras à OVA, quando comparada à porcentagem de células T CD4⁺ e TCD8⁺ respondedoras à Hps65. Embora em ambos os tipos de imunização a participação de células dendríticas, macrófagos e célula B podem desempenhar papel importante na apresentação de antígenos, acreditamos que a participação das células B não se restrinja a esse fenômeno, podendo influenciar direta ou indiretamente no desenvolvimento da memória de linfócitos T. Nos animais WT não houve esta diferença para T CD4⁺. E para T CD8⁺, houve uma maior porcentagem de células TEM nos animais imunizados com OVA. Isto reforça que as células B parecem ter importância crucial nas fases iniciais da resposta imune na imunização com proteína, mas parece não exercer essa tanta importância para ativação destas células, na imunização com DNA- Hsp65. A diferença na porcentagem de células T CD8⁺ encontrada entre os grupos de imunização nos animais Bko, pode ser devido ao fato de que no momento da ativação, na ausência de células B, o DNA induza uma maior ativação de T CD8⁺ pela transfecção direta de células somáticas que são capazes de ativarem células T CD8⁺ efetivamente.

Aos 15 dias após as imunizações, os dados das figuras 6 e 7, indicam a importância dos linfócitos B na manutenção de células CD4⁺ TEM, mas parecem mais uma vez não exercerem importância na manutenção de células T CD8⁺ neste intervalo

de tempo. Como ainda não houve detecção de TCM, podemos inferir que aos 15 dias após as imunizações, as células ainda não entraram na fase de memória. Segundo vários autores, aos 15 dias após o início da resposta imune, esta entra em sua fase de contração. E como foi demonstrados por Whitmire, Asano *et al.*, 2009, as células B se mostram importantes aos 15 dias após a infecção com LCMV, ou seja, na fase de contração da resposta imune. Sabe-se que as células B promovem co-estimulação para células T CD4⁺ por meio da interação entre CD40 que se liga ao CD40L no linfócito T promovendo uma potencialização na ativação desta célula (Constant, 1999). Com o auxílio da co-estimulação, há uma maior proliferação destas células na fase de ativação da resposta imune. Além da co-estimulação dada pelo CD40, a co-estimulação promovida pelo CD28 promove uma maior sobrevivência dessas células T na fase efetora por promover um aumento da expressão de Bcl-x nas células ativadas (Boise, 1995). Assim, há um aumento na quantidade de células que entram na fase de contração, e conseqüentemente permite uma maior disponibilidade de células remanescentes desta fase para se tornarem de memória (Cyster, 1995). Infelizmente, não foi feita a análise da expressão destas moléculas em nossos experimentos. Esta cooperação direta entre TCD4⁺ e células B não acontece com as células TCD8⁺, o que poderia explicar uma porcentagem homogênea de células TCD8⁺ em animais Bko e WT.

Aos trinta dias após a última imunização, houve a detecção de células CD44^{high}/CD62L^{low} (TEM) já observada aos 7 e 15 dias, e também houve o aparecimento de células CD44^{high}/CD62L^{high} (TCM), tanto para CD4⁺ quanto CD8⁺. Este resultado corrobora com os dados de (Shen, 2004) que propuseram a hipótese de que as células T se diferenciam primeiro em CD44^{high}/CD62L^{low} e depois em CD44^{high}/CD62L^{high}. Isto foi mostrado em seus experimentos, pela transferência de

células T CD8⁺/CD62L^{low} que, no animal receptor, adquiriram ao passar do tempo o fenótipo CD62L^{high}. Esta hipótese da diferenciação linear também é vista em outros estudos como (Kaech, Tan *et al.*, 2003). E, de acordo com seus trabalhos, mesmo que os precursores das células de memória estivessem presentes no início da resposta primária, estas células não possuem características de memória como, proliferação basal e rápida resposta ao reencontro com o antígeno. Isto mostrou que estes precursores possuem uma diferenciação gradual após a fase de contração. Assim, podemos sugerir que em nossos modelos de vacinação, a cinética de geração das células de memória, parece estar coerente com a hipótese linear de diferenciação, já que observamos o aparecimento de células CD44^{high}/CD62L^{low} nas fases iniciais da resposta imune, e o aparecimento de células CD44^{high}/CD62L^{high} em uma fase mais tardia da resposta, supostamente após a fase de contração, como foi proposto aos 15 dias após as imunizações.

Ainda aos 30 dias após as imunizações, a porcentagem de células CD4⁺ TEM continua menor em animais Bko. Como já foi proposto, esta diferença pode ser decorrente da deficiência de co-estimulação promovida pelas células B na fase de ativação da resposta imune. Assim, a população disponível para se tornar memória após a fase de contração foi menor. Células do fenótipo CD44^{high}/CD62L^{high} são mais evidentes em linfócitos T CD8⁺ (Figura 9). Para células TCM somente houve diferença significativa entre a porcentagem de células T CD4⁺ entre Bko e WT, nos animais imunizados com OVA. E mesmo não havendo diferença significativa entre a porcentagem de células CD4⁺ TCM nos outros grupos de imunização, também observamos um pequeno aumento da porcentagem de CD4⁺ TCM nos animais WT quando comparada com animais Bko.

Como foi visto, sabe-se que as células T CD4⁺ sofrem co-estimulação pelas células B por meio da interação entre CD40 que se liga ao CD40L no linfócito T

promovendo uma potencialização na ativação desta célula (Constant, 2000). Entretanto, Bourgeois, Rocha *et al.*, 2002, sugeriram um novo mecanismo de cooperação de T CD4⁺ com T CD8⁺ por meio também de interações CD40-CD40L, análogo à interação T CD4⁺- Célula B para antígenos não- inflamatórios. Isto foi comprovado pela detecção de CD40L em T CD8⁺ após 4 dias de sua ativação na presença de células T CD4⁺. E esta detecção não ocorreu em célula T de memória, mostrando assim, seu requerimento somente no momento da ativação. Diante destas evidências, pode-se sugerir que a deficiência de células T CD4⁺ em animais Bko poderia estar influenciando na geração de célula T CD8⁺ de memória. No entanto, nossos resultados mostraram que a ausência de células B, não interferiu na geração nem na manutenção de células T CD8⁺ de memória. Vários trabalhos já demonstraram que a resposta primária de T CD8⁺ na ausência de T CD4⁺ é normal em várias infecções (Shen, 2004). Esta observação corrobora com os dados da figura 4, mostrando que a ativação de T CD8⁺ não ficou prejudicada na ausência de células B quando houve uma deficiência na indução de T CD4⁺. Já outros autores mostram que a resposta secundária de T CD8⁺ em um segundo encontro com o antígeno é diminuída na ausência de T CD4⁺ (Von Herrath, Yokoyama *et al.*, 1996; Riberdy, Christensen *et al.*, 2000). Bourgeois, Rocha *et al.*, 2002, mostraram que células T CD8⁺ ativadas, na ausência de T CD4⁺, perderam a capacidade de expansão em um reencontro com o antígeno. Mais uma vez, nossos resultados mostraram que a resposta de T CD8⁺ de memória também não ficou prejudicada diante da deficiência de células T CD4⁺ induzida pela ausência de células B. As células T CD8⁺ foram capazes de responder ao reestímulo *in vitro* dado pelas respectivas proteínas, pois a porcentagem de células T CD8⁺ de memória induzidas na ausência de células B, foi similar à porcentagem encontrada nos animais WT (Figuras 5, 7 e 9).

Cabe ressaltar, que os animais do controle negativo (imunizados com salina) obtiveram uma alta porcentagem de células de memória aos 15 e 30 dias após as imunizações. Esta alta porcentagem pode ser decorrente do fato de que os animais utilizados nos experimentos relacionados neste trabalho não são *germ free*. Deste modo, há algumas evidências que mostram que estes animais desenvolvem uma resposta imune aos antígenos microbianos da flora intestinal. (H.- Q. Jiang, 2004), mostraram algumas evidências de que a produção de IgA nas mucosas pelas células B-1 depende de sua interação com T CD4⁺. Isto foi demonstrado, quando foi feita a transferência de células B-1 + T CD4⁺ para animais com imunodeficiência combinada grave (SCID) não *germ free*. Estes animais recuperaram a quantidade normal de IgA nas mucosas, o que não ocorreu quando foram transferidas somente células B-1, ou mesmo quando esta transferência foi feita em animais *germ free*. E, 8 semanas após a transferência destas células, houve a detecção de células T CD4⁺ no baço destas animais. (Valérie Julia, 2000) demonstraram que órgãos linfóides secundários de animais Balb/c *naive* contém células T com fenótipo de memória e específicas a antígenos microbianos da flora intestinal. E estes linfócitos tiveram reação cruzada com antígenos de *Leishmania major*. Estes mesmos autores mostram também que as células T que foram primadas na mucosa intestinal conseguem recircular pelo baço e linfonodos e são rapidamente estimulados a produzirem IL-4 e IL-10 aos antígenos de *L. major*. Outro aspecto que deve ser considerado é que também há algumas evidências de que a imunização com salina pode levar a um efeito placebo ativando células do sistema imune. O tipo de imunização intramuscular pode causar uma pequena irritação no local, o que leva à liberação de corticotropina (CRH) que induz a secreção de IL-1, podendo ativar o sistema imune (R. Paus, 2006). Sabe-se também que há receptores de CRH em

mastócitos da pele, que são responsáveis por muitas reações cutâneas ao estresse, o que pode aumentar a ainda mais a resposta imune no local da injeção (Maurer, 2003).

Em conjunto, os dados de fenotipagem das células do baço em diferentes tempos após as imunizações, são importantes, pois mostraram a cinética de geração das células de memória que parece ter início ainda na fase efetora da resposta imune. Mostram também que 15 dias após as imunizações, parece ser um momento crucial no início da formação das células T CD4⁺ de memória. Provavelmente, neste intervalo de tempo, segundo dados da literatura, as células estão no início da fase de contração da resposta imune. Assim, a influência das células B se mostra mais significativa para a geração de células de memória em sua fase inicial (fase efetora), por promoverem uma co-estimulação direta com T CD4⁺. E esta contribuição se reflete em todos os períodos de tempo analisados, pois foi importante para a formação de células disponíveis para se tornar de memória. Já para T CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low} e ^{high} nem as células B nem as células T CD4⁺ parecem exercer uma contribuição muito acentuada na formação destas, pois a indução e manutenção das células T CD8⁺ com estes fenótipos de memória não ficou prejudicada em nenhum período de tempo analisado na ausência de células B, nem na presença de uma porcentagem de células T CD4⁺ diminuída pela ausência de células B.

Levando-se em consideração que as células T CD8⁺ de memória são muito importantes na vacinação com DNA, e que a indução destas células é um diferencial neste tipo de imunização, fomos avaliar se a ausência de células B afetava a porcentagem de células T CD8⁺ de memória que expressavam CD127. Segundo dados da literatura, as células que conseguem manter a expressão de CD127 durante a fase de contração, são destinadas a se tornarem células T CD8⁺ de memória. O número de células com alta expressão de CD127 durante a fase de contração é constante, mas o

número de células com baixa expressão de CD127 diminui drasticamente nesta fase. Diante disto, as células que são CD127^{low} se tornam células TEM, e as que expressam CD127^{high} se tornam células TCM (Kaech, Tan *et al.*, 2003). Assim, a avaliação do fenótipo CD8⁺/CD44^{high}/CD62L^{low}/CD127⁺, promove uma caracterização mais detalhada e auxilia no entendimento da cinética de geração das células T CD8⁺ de memória. A menor porcentagem de células CD8⁺ TEM que expressavam CD127 encontrada em animais Bko tanto aos 15 quanto aos 30 dias após as imunizações foi surpreendente, já que a ausência de células B não afetou a porcentagem de células CD8⁺ TEM CD127. A cinética de expressão desta molécula é bastante interessante. O CD127 tem sua expressão diminuída em duas situações conhecidas: na presença do antígeno (Fase de ativação), ou em concentrações crescentes de IL-7 (Swainson, Verhoeven *et al.*, 2006). Além de manter as células de memória, a IL-7 também é responsável por promover a proliferação de linfócitos T maduros na periferia e em ambientes linfopênicos (Fry e Mackall, 2005). As análises de expressão do gene da IL-7 por PCR em tempo real (Figuras 19 A e B), como já citado acima, mostraram que apesar de não ter sido estatisticamente significativa, há uma maior expressão desta citocina no baço de animais Bko do que em animais WT. Deste modo, sua expressão pode estar promovendo a proliferação homeostática que foi proposta nos animais deficientes de células B. Esta maior expressão de IL-7 nos animais Bko pode estar promovendo a diminuição da expressão desta molécula nas células T CD8⁺ destes animais aos 15 e aos 30 dias após as imunizações. A não diferença estatística encontrada entre a expressão de IL-7 no baço de animais Bko e WT, foi proveniente de um grande desvio padrão encontrado. O n experimental foi pequeno e houve uma variação muito grande entre os animais dos grupos. Nestes experimentos não foi avaliada a intensidade de fluorescência de CD127, portanto a população de T CD8⁺ não foi subdividida em CD127^{low} e

CD127^{high}. As análises foram feitas aos 15 e 30 dias após as imunizações, pois segundo o mesmo trabalho Swainson, Verhoeyen *et al.*, 2006, a expressão de CD127 começa a se detectada nos dias 10 a 12 após a estimulação das células T.

Após uma caracterização bastante detalhada do fenótipo das células T induzidas tanto na presença quanto na ausência de células B, partimos para a realização de transferência adotiva de células B para animais Bko. Esta transferência foi feita a fim de se verificar se a diminuição das células CD4⁺ TEM no baço dos animais Bko era mesmo devido à ausência de células B. Os resultados mostraram que a transferência de células B-2 (CD43⁻) para animais deficientes, promoveu a recuperação do fenótipo das células CD4⁺ TEM aos 15 dias e de CD4⁺ TEM e TCM aos 30 dias após as imunizações, sugerindo que as células B estão participando da indução e manutenção dessas células, e que não estão participando na indução de células T CD8⁺ TEM. Embora as células B auxiliem na indução de células T CD8⁺ que expressam CD127. A maior porcentagem de células T CD4⁺ encontrada nos animais que receberam a transferência de células, pode ser explicada pelo fato de que em natureza, estes animais são deficientes de células B, ou seja, nos animais Bko estaria ocorrendo o mecanismo de proliferação homeostática como foi proposto anteriormente. Curiosamente, aos 30 dias após a transferência das células B, houve uma menor porcentagem de células T CD8⁺ de memória efetora nos animais que receberam as células B quando comparada à porcentagem de células nos animais Bko que não receberam a transferência. Mas foi encontrada uma maior porcentagem de células T CD8⁺ de memória central nos animais Bkot comparados com os animais Bko (Figura 15, A e B). Assim, de acordo com estes resultados, podemos sugerir que as células B poderiam estar influenciando no aparecimento de células T CD8⁺ de memória central.

Além da ação das células B e da IL-7, a IL-15 também é um fator relacionado com a manutenção das células de memória. E de acordo com os resultados obtidos da análise de PCR em tempo real, não houve diferença significativa em sua expressão entre os grupos de imunização, mas esses dados podem sugerir a importância da IL-15 no desenvolvimento da memória central, já que houve uma maior expressão desta citocina aos 30 dias após as imunizações (Figura 20 A e B). Assim, embora a detecção das células de memória central apresente a mesma cinética de aparecimento, aos 30 dias, para animais deficientes ou não de células B, não podemos excluir a participação de outros componentes orquestrando o desenvolvimento dessas células. Isso fica mais visível quando analisamos a produção de outras citocinas como IL-12 e IFN- γ no baço dos animais. Aos 30 dias há uma menor expressão dessas citocinas nos animais Bko, sugerindo que na ausência células B, outras células poderiam estar expressando estas citocinas que são importantes na manutenção de células de memória (Figuras 16 e 17). E além das citocinas pro-inflamatórias, vimos que as células B parecem ser fontes importantes de produção de IL-10, pois animais WT tiveram uma maior expressão desta citocina quando comparada aos animais Bko tanto aos 15 quanto aos 30 dias (Figura 18).

Para verificarmos a real importância das células B na produção de citocinas, avaliamos o perfil de citocinas expressas por estas células aos 15 e 30 dias após as imunizações. Observamos que as células B são importantes na produção de IL-12 (p40) e IFN- γ principalmente aos 30 dias após as imunizações. Os resultados também mostraram que, as células B aos 15 e 30 dias expressaram IL-10. Embora as células B de animais imunizados com OVA expressaram mais IL-10 do que as células B de animais imunizados com DNA, esta diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 23), mostrando que a indução da expressão desta citocina independe do tipo de

imunização. As células B dos animais imunizados com OVA também apresentaram nível maior de RNAm para IL-12 (p40) quando comparado aos linfócitos B dos animais imunizados com DNA plasmideal. Por outro lado, a produção de IFN- γ foi menor, apenas, nos linfócitos B dos animais imunizados com DNA. Trinta dias depois essa variação não se mostrava estatisticamente significativa.

Chamou-nos a atenção a produção de IL-10 nos linfócitos B aliado ao fato de a ausência dessas células levava diminuição das células de memória, assim optamos pela caracterização do fenótipo das células B. Como os mesmos são purificados por seleção negativa, usando anticorpo anti-CD43 ligado à micro esferas magnéticas, a principal população recuperada é da subpopulação B-2 (CD19⁺). A subpopulação B-1, onde se encontra as células B-1a que são classicamente células B com fenótipo regulador, tendem a ficar aderida à coluna (Berlese, comunicação pessoal). Surpreendentemente, a maior população produtora de IL-10 era CD5⁺ CD43⁻ (Figura 24). Isso demonstra que há evidências da presença de células com fenótipo regulador dentro da subpopulação de células B-2. Segundo Allman e Pillai, 2008, a população de células T2-MZB é derivada de células B-2 e secreta altos níveis de IL-10. Os resultados obtidos mostram fortes evidências da presença destas células no baço dos animais. Além disso, podemos sugerir que estas células possam estar participando da manutenção das células de memória. Apesar de a IL-10 ser considerada uma citocina reguladora, é descrito que esta citocina é requerida para a formação de células T CD8⁺ de memória após infecção com *Listeria monocytogenes*, pois segundo (Foulds, Rotte *et al.*, 2006), na presença de IL-10 a erradicação da infecção ocorre mais tardiamente. Assim, o antígeno permanece por mais tempo podendo ativar uma maior quantidade de células T CD8⁺ e assim promover um aumento da população dessas células que estarão disponíveis para se tornar de memória.

Para se obter mais evidências do papel regulador dessas células, verificamos a expressão de Foxp3 nas células B por PCR em tempo real. A figura 25 mostra que houve a detecção de Foxp3 nestas células e o nível de expressão foi dependente do estímulo, principalmente aos 30 dias após as imunizações. Essa é a primeira descrição de Foxp3 em células B. Alguns trabalhos sugerem a possibilidade, mas nenhum mostrou tal fenômeno experimentalmente. A presença de Foxp3 é bem caracterizada na população de linfócitos T com fenótipo regulador, tendo muitas vezes, a participação de IL-10 como marcador fenotípico deste subtipo celular. A presença de uma subpopulação de linfócitos B com fenótipo regulador e que expressa Foxp3 é bastante intrigante e interessante. Novos ensaios serão necessários para definir a função e o exato fenótipo dessas células. Em nossos experimentos podemos sugerir que ela pode estar correlacionada com a cinética de aparecimento da memória central, pois tanto a expressão de IL-10 quanto de Foxp3 foram maiores aos 30 dias após as imunizações, mesmo período em que foi detectada a presença de células TCM. Estes achados trazem implicações importantes para a geração de memória de vida longa em modelos de vacina.

6. CONCLUSÕES

Os dados apresentados neste trabalho permitem concluir que:

- Células B são importantes na geração/ manutenção de células T CD4⁺ de memória efetora e de células CD8⁺ TEM CD127⁺ em modelos de vacinação com DNA plasmideal e antígeno protéico;

- Mais de um subtipo de células B parece ser importante neste processo, pois houve a detecção de células B com fenótipo regulador (expressão de IL-10) no baço dos animais WT;

- Houve a detecção de células B expressando Foxp3, dado ainda inédito na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akbari, O., N. Panjwani, *et al.* DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. J Exp Med, v.189, n.1, Jan 4, p.169-78. 1999.

Allman, D. e S. Pillai. Peripheral B cell subsets. Curr Opin Immunol, v.20, n.2, Apr, p.149-57. 2008.

Almeida, L. P. Manuscrito em preparação.

Alpdogan, O., C. Schmaltz, *et al.* Administration of interleukin-7 after allogeneic bone marrow transplantation improves immune reconstitution without aggravating graft-versus-host disease. Blood, v.98, n.7, Oct 1, p.2256-65. 2001.

Asano, M. S. e R. Ahmed. CD8 T cell memory in B cell-deficient mice. J Exp Med, v.183, n.5, May 1, p.2165-74. 1996.

Askew, D., R. S. Chu, *et al.* CpG DNA induces maturation of dendritic cells with distinct effects on nascent and recycling MHC-II antigen-processing mechanisms. J Immunol, v.165, n.12, Dec 15, p.6889-95. 2000.

Bellone, M. Apoptosis, cross-presentation, and the fate of the antigen specific immune response. Apoptosis, v.5, n.4, Oct, p.307-14. 2000.

Berlese, A. Manuscrito em preparação.

Boise, L. H., A. J. Minn, P. J. Noel Et Al. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-x Immunity, v.3, p.87. 1995.

Bolland, S. A newly discovered Fc receptor that explains IgG-isotype disparities in effector responses. Immunity, v.23, n.1, Jul, p.2-4. 2005.

Bonato, V. L., V. M. Lima, *et al.* Identification and characterization of protective T cells in hsp65 DNA-vaccinated and Mycobacterium tuberculosis-infected mice. Infect Immun, v.66, n.1, Jan, p.169-75. 1998.

Bosio, C. M., D. Gardner, *et al.* Infection of B cell-deficient mice with CDC 1551, a clinical isolate of *Mycobacterium tuberculosis*: delay in dissemination and development of lung pathology. J Immunol, v.164, n.12, Jun 15, p.6417-25. 2000.

Bouaziz, J. D., K. Yanaba, *et al.* Regulatory B cells as inhibitors of immune responses and inflammation. Immunol Rev, v.224, Aug, p.201-14. 2008.

Bourgeois, C., B. Rocha, *et al.* A role for CD40 expression on CD8+ T cells in the generation of CD8+ T cell memory. Science, v.297, n.5589, Sep 20, p.2060-3. 2002.

Cardillo, F., E. Postol, *et al.* B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Immunology, v.122, n.4, Dec, p.584-95. 2007.

Coelho-Castelo, A. A., R. R. Santos Junior, *et al.* B-lymphocytes in bone marrow or lymph nodes can take up plasmid DNA after intramuscular delivery. Hum Gene Ther, v.14, n.13, Sep 1, p.1279-85. 2003.

Constant, S. L. B lymphocytes as antigen-presenting cells for CD4+ T cell priming in vivo. J Immunol, v.162, n.10, May 15, p.5695-703. 1999.

Cyster, J. A. C. C. G. Antigen-induced exclusion from follicles and anergy are separate and complementary processes that influence peripheral B cell fate. Immunity, v.3, p.691. 1995.

Dean, D. A., B. S. Dean, *et al.* Sequence requirements for plasmid nuclear import. Exp Cell Res, v.253, n.2, Dec 15, p.713-22. 1999.

Dominic Van Essen, P. D. A. D. G. Role of B cells in maintaining helper T-cell memory. Phil. Trans. R. Soc. Lond., v.355, p.351-355. 2000.

Epstein, M. M., F. Di Rosa, *et al.* Successful T cell priming in B cell-deficient mice. J Exp Med, v.182, n.4, Oct 1, p.915-22. 1995.

Esser, M. T., R. D. Marchese, *et al.* Memory T cells and vaccines. Vaccine, v.21, n.5-6, Jan 17, p.419-30. 2003.

Evans, J. G., K. A. Chavez-Rueda, *et al.* Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis. J Immunol, v.178, n.12, Jun 15, p.7868-78. 2007.

Fillatreau, S., C. H. Sweeney, *et al.* B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. Nat Immunol, v.3, n.10, Oct, p.944-50. 2002.

Fink, A. L. Chaperone-mediated protein folding. Physiol Rev, v.79, n.2, Apr, p.425-49. 1999.

Fiorentino, D. F., A. Zlotnik, *et al.* IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. J Immunol, v.147, n.11, Dec 1, p.3815-22. 1991.

Foulds, K. E., M. J. Rotte, *et al.* IL-10 is required for optimal CD8 T cell memory following *Listeria monocytogenes* infection. J Immunol, v.177, n.4, Aug 15, p.2565-74. 2006.

Fry, T. J. e C. L. Mackall. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. J Immunol, v.174, n.11, Jun 1, p.6571-6. 2005.

Gregoriadis, G., R. Saffie, *et al.* Liposome-mediated DNA vaccination. FEBS Lett, v.402, n.2-3, Feb 3, p.107-10. 1997.

Gurunathan, S., D. M. Klinman, *et al.* DNA vaccines: immunology, application, and optimization*. Annu Rev Immunol, v.18, p.927-74. 2000.

H.- Q. Jiang, M. C. T., A. W. Zuercher, N. V. Boiko, N. A. Bos, J. J. Cebra. Interactions of commensal gut microbes with subsets of B- and T- cells in the murine host. Vaccine, v.22, p.805-811. 2004.

Harris, D. P., L. Haynes, *et al.* Reciprocal regulation of polarized cytokine production by effector B and T cells. Nat Immunol, v.1, n.6, Dec, p.475-82. 2000.

Hellermann, G. R. e S. S. Mohapatra. Genetic therapy: on the brink of a new future. Genet Vaccines Ther, v.1, n.1, Sep 4, p.1. 2003.

Johnson, C. M., A. M. Cooper, *et al.* Mycobacterium tuberculosis aerogenic rechallenge infections in B cell-deficient mice. Tuber Lung Dis, v.78, n.5-6, p.257-61. 1997.

Kaech, S. M., J. T. Tan, *et al.* Selective expression of the interleukin 7 receptor identifies effector CD8 T cells that give rise to long-lived memory cells. Nat Immunol, v.4, n.12, Dec, p.1191-8. 2003.

Kantor, A. B., A. M. Stall, *et al.* Differential development of progenitor activity for three B-cell lineages. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.8, Apr 15, p.3320-4. 1992.

Katz, S. I., D. Parker, *et al.* B-cell suppression of delayed hypersensitivity reactions. Nature, v.251, n.5475, Oct 11, p.550-1. 1974.

Knoechel, B., J. Lohr, *et al.* The link between lymphocyte deficiency and autoimmunity: roles of endogenous T and B lymphocytes in tolerance. J Immunol, v.175, n.1, Jul 1, p.21-6. 2005.

Krieg, A. M. CpG motifs in bacterial DNA and their immune effects. Annu Rev Immunol, v.20, p.709-60. 2002.

Langermans, J. A., T. M. Doherty, *et al.* Protection of macaques against Mycobacterium tuberculosis infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. Vaccine, v.23, n.21, Apr 15, p.2740-50. 2005.

Latz, D., M. Alfrink, *et al.* Breast cancer in a male patient after treatment of acute lymphoblastic leukemia including total body irradiation and bone marrow transplantation. Onkologie, v.27, n.5, Oct, p.477-9. 2004.

Leadbetter, E. A., M. Brigl, *et al.* NK T cells provide lipid antigen-specific cognate help for B cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.105, n.24, Jun 17, p.8339-44. 2008.

Lefrançois, K. S. S. A. L. Cytokine control of memory T-cell development and survival. Nature Reviews Immunology, v.3, p.279. 2003.

Lima, K. M., V. L. Bonato, *et al.* Comparison of different delivery systems of vaccination for the induction of protection against tuberculosis in mice. Vaccine, v.19, n.25-26, May 14, p.3518-25. 2001.

Linton, P. J., J. Harbertson, *et al.* A critical role for B cells in the development of memory CD4 cells. J Immunol, v.165, n.10, Nov 15, p.5558-65. 2000.

Liu, Y., Y. Wu, *et al.* Gene-targeted B-deficient mice reveal a critical role for B cells in the CD4 T cell response. Int Immunol, v.7, n.8, Aug, p.1353-62. 1995.

Lowrie, D. B., R. E. Tascon, *et al.* Therapy of tuberculosis in mice by DNA vaccination. Nature, v.400, n.6741, Jul 15, p.269-71. 1999.

Macgregor, R. R., J. D. Boyer, *et al.* First human trial of a DNA-based vaccine for treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection: safety and host response. J Infect Dis, v.178, n.1, Jul, p.92-100. 1998.

Mackall, C. L., T. J. Fry, *et al.* IL-7 increases both thymic-dependent and thymic-independent T-cell regeneration after bone marrow transplantation. Blood, v.97, n.5, Mar 1, p.1491-7. 2001.

Maurer, M. What is the physiological function of mast cells? . Exp. Dermatol., v.12, p.886-910. 2003.

Mauri, C. e M. R. Ehrenstein. The 'short' history of regulatory B cells. Trends Immunol, v.29, n.1, Jan, p.34-40. 2008.

Meding, S. J. e J. Langhorne. CD4+ T cells and B cells are necessary for the transfer of protective immunity to Plasmodium chabaudi chabaudi. Eur J Immunol, v.21, n.6, Jun, p.1433-8. 1991.

Mizoguchi, A. e A. K. Bhan. A case for regulatory B cells. J Immunol, v.176, n.2, Jan 15, p.705-10. 2006.

Mizoguchi, A., E. Mizoguchi, *et al.* Suppressive role of B cells in chronic colitis of T cell receptor alpha mutant mice. J Exp Med, v.186, n.10, Nov 17, p.1749-56. 1997.

_____. Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation. Immunity, v.16, n.2, Feb, p.219-30. 2002.

Morimoto, R. I. e M. G. Santoro. Stress-inducible responses and heat shock proteins: new pharmacologic targets for cytoprotection. Nat Biotechnol, v.16, n.9, Sep, p.833-8. 1998.

Moulin, V., F. Andris, *et al.* B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation. J Exp Med, v.192, n.4, Aug 21, p.475-82. 2000.

Nanjappa, S. G., J. H. Walent, *et al.* Effects of IL-7 on memory CD8 T cell homeostasis are influenced by the timing of therapy in mice. J Clin Invest, v.118, n.3, Mar, p.1027-39. 2008.

Naylor, D. J. e F. U. Hartl. Contribution of molecular chaperones to protein folding in the cytoplasm of prokaryotic and eukaryotic cells. Biochem Soc Symp, n.68, p.45-68. 2001.

Parekh, V. V., D. V. Prasad, *et al.* B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1. J Immunol, v.170, n.12, Jun 15, p.5897-911. 2003.

R. Paus, T. C. T., P. C. Arck. Neuroimmunendocrine circuitry of the brain-skin connection. Trends Immunol., v.27, p.32-39. 2006.

Riberdy, J. M., J. P. Christensen, *et al.* Diminished primary and secondary influenza virus-specific CD8(+) T-cell responses in CD4-depleted Ig(-/-) mice. J Virol, v.74, n.20, Oct, p.9762-5. 2000.

Ronchese, F. e B. Hausmann. B lymphocytes in vivo fail to prime naive T cells but can stimulate antigen-experienced T lymphocytes. J Exp Med, v.177, n.3, Mar 1, p.679-90. 1993.

Sallusto, F., D. Lenig, *et al.* Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. Nature, v.401, n.6754, Oct 14, p.708-12. 1999.

Sato, N., H. J. Patel, *et al.* The IL-15/IL-15Ralpha on cell surfaces enables sustained IL-15 activity and contributes to the long survival of CD8 memory T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.104, n.2, Jan 9, p.588-93. 2007.

Savill, J., V. Fadok, *et al.* Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. Immunol Today, v.14, n.3, Mar, p.131-6. 1993.

Schluns K. S. Stoklasek, T. E. A. The role of interleukin-15 receptor α : Trans-presentation, receptor component or both? The Int. J. Bioc & Biol., v.37, p.1567-1571. 2005.

Schluns, K. S., W. C. Kieper, *et al.* Interleukin-7 mediates the homeostasis of naive and memory CD8 T cells in vivo. Nat Immunol, v.1, n.5, Nov, p.426-32. 2000.

Shen, H., J. K. Whitmire, *et al.* A specific role for B cells in the generation of CD8 T cell memory by recombinant *Listeria monocytogenes*. J Immunol, v.170, n.3, Feb 1, p.1443-51. 2003.

Shen, J. K. N. A. H. CD8+ T cell memory: only the good ones last. Current opinion in Immunology, v.16, p.451- 455. 2004.

Silva, C. L. Vacinas gênicas. Biocologia - Ciência e Desenvolvimento, v. 3 n.34. 1997.

Spencer, N. F., M. E. Poynter, *et al.* Constitutive activation of NF-kappa B in an animal model of aging. Int Immunol, v.9, n.10, Oct, p.1581-8. 1997.

Srivastava, P. Roles of heat-shock proteins in innate and adaptive immunity. Nat Rev Immunol, v.2, n.3, Mar, p.185-94. 2002.

Sun- Kyeong Lee, C. D. S. Role of interleukin-7 in bone and T cell homeostasis. Immunol. Rev, v.208, p.169-180. 2005.

Svanholm, C., L. Bandholtz, *et al.* Protective DNA immunization against *Chlamydia pneumoniae*. Scand J Immunol, v.51, n.4, Apr, p.345-53. 2000.

Swainson, L., E. Verhoeven, *et al.* IL-7R alpha gene expression is inversely correlated with cell cycle progression in IL-7-stimulated T lymphocytes. J Immunol, v.176, n.11, Jun 1, p.6702-8. 2006.

Tan, J. T., E. Dudl, *et al.* IL-7 is critical for homeostatic proliferation and survival of naive T cells. Proc Natl Acad Sci U S A, v.98, n.15, Jul 17, p.8732-7. 2001.

Tang, D. C., M. DeVit, *et al.* Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature, v.356, n.6365, Mar 12, p.152-4. 1992.

Tian, X., X. Sun, *et al.* Upregulation of tyrosine hydroxylase and downregulation of choline acetyltransferase in lead-exposed PC12 cells: the role of PKC activation. Toxicol Appl Pharmacol, v.167, n.3, Sep 15, p.246-52. 2000.

Topham, D. J., R. A. Tripp, *et al.* Quantitative analysis of the influenza virus-specific CD4+ T cell memory in the absence of B cells and Ig. J Immunol, v.157, n.7, Oct 1, p.2947-52. 1996.

Torres, C. A., A. Iwasaki, *et al.* Differential dependence on target site tissue for gene gun and intramuscular DNA immunizations. J Immunol, v.158, n.10, May 15, p.4529-32. 1997.

Trombone, A. P., C. L. Silva, *et al.* Endocytosis of DNA-Hsp65 alters the pH of the late endosome/lysosome and interferes with antigen presentation. PLoS ONE, v.2, n.9, p.e923. 2007.

Ulmer, J. B., J. J. Donnelly, *et al.* Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral protein. Science, v.259, n.5102, Mar 19, p.1745-9. 1993.

Valérie Julia, S. S. M. S., Laurent Malherbe, Jean- Philippe Breittmayer, Fernand Girard-Pipau, Alain Beck and Nicolas Glainchenhaus. Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in Balb/c mice with *Leishmania major*. The journal of immunology, v.165, p.5637-5645. 2000.

Van Essen, D., P. Dullforce, *et al.* Cellular interactions involved in Th cell memory. J Immunol, v.165, n.7, Oct 1, p.3640-6. 2000.

Von Der Weid, T., N. Honarvar, *et al.* Gene-targeted mice lacking B cells are unable to eliminate a blood stage malaria infection. J Immunol, v.156, n.7, Apr 1, p.2510-6. 1996.

Von Der Weid, T. e J. Langhorne. Altered response of CD4+ T cell subsets to Plasmodium chabaudi chabaudi in B cell-deficient mice. Int Immunol, v.5, n.10, Oct, p.1343-8. 1993.

Von Herrath, M. G., M. Yokoyama, *et al.* CD4-deficient mice have reduced levels of memory cytotoxic T lymphocytes after immunization and show diminished resistance to subsequent virus challenge. J Virol, v.70, n.2, Feb, p.1072-9. 1996.

Vordermeier, H. M., N. Venkataprasad, *et al.* Increase of tuberculous infection in the organs of B cell-deficient mice. Clin Exp Immunol, v.106, n.2, Nov, p.312-6. 1996.

Wells, D. J. Improved gene transfer by direct plasmid injection associated with regeneration in mouse skeletal muscle. FEBS Lett, v.332, n.1-2, Oct 11, p.179-82. 1993.

Weng, N. P., K. Liu, *et al.* IL-15 is a growth factor and an activator of CD8 memory T cells. Ann N Y Acad Sci, v.975, Dec, p.46-56. 2002.

Whitmire, J. K., M. S. Asano, *et al.* Requirement of B cells for generating CD4+ T cell memory. J Immunol, v.182, n.4, Feb 15, p.1868-76. 2009.

Williams, G. S., A. Oxenius, *et al.* CD4+ T cell responses in mice lacking MHC class II molecules specifically on B cells. Eur J Immunol, v.28, n.11, Nov, p.3763-72. 1998.

X. Zhang, S., Sun Et Al. Potent and selective stimulation of memory-phenotype CD8+ T cells in vivo by IL-15. Immunity, v.8, p.591-599. 1998.

Yoshida, S., S. I. Kashiwamura, *et al.* Direct immunization of malaria DNA vaccine into the liver by gene gun protects against lethal challenge of Plasmodium berghei sporozoite. Biochem Biophys Res Commun, v.271, n.1, Apr 29, p.107-15. 2000.

Yu, P., Y. Wang, *et al.* B cells control the migration of a subset of dendritic cells into B cell follicles via CXC chemokine ligand 13 in a lymphotoxin-dependent fashion. J Immunol, v.168, n.10, May 15, p.5117-23. 2002.

Zanin-Zhorov, A., G. Tal, *et al.* Heat shock protein 60 activates cytokine-associated negative regulator suppressor of cytokine signaling 3 in T cells: effects on signaling, chemotaxis, and inflammation. J Immunol, v.175, n.1, Jul 1, p.276-85. 2005.

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](#)