

Fábio Barrozo do Canto

**SUSCETIBILIDADE DE CÉLULAS T NEONATAIS E TIMÓCITOS
DE ADULTO À AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA PERIFÉRICA A
ESTÍMULO ALOGÊNICO – PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T
REGULADORAS CD4⁺CD25⁺**



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

Orientadora: Maria Bellio



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PROF PAULO DE GÓES
RIO DE JANEIRO
AGOSTO DE 2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

FICHA CATALOGRÁFICA

Canto, Fábio Barrozo do
Suscetibilidade de células T neonatais e timócitos de adulto à aquisição de tolerância periférica a estímulo alogênico – participação de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺/ Fábio Barrozo do Canto – Rio de Janeiro, 2009
VIII, 123
Dissertação (Mestrado em Ciências - Microbiologia)
Universidade Federal do Rio de Janeiro/ Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, 2009

Orientadora: Maria Bellio

Referências bibliográficas:f 105

1. Alergicidade 2. Células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ 3. Células recém-emigradas do timo 4. Tolerância neonatal 5. Tolerância periférica 6. Transplantação I. Canto, Fábio B. II. UFRJ, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, Mestrado em Ciências Biológicas. III. Suscetibilidade de células T neonatais e timócitos de adulto à aquisição de tolerância periférica a estímulo alogênico – participação de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺

Fábio Barrozo do Canto

**SUSCETIBILIDADE DE CÉLULAS T NEONATAIS E TIMÓCITOS
DE ADULTO À AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA PERIFÉRICA A
ESTÍMULO ALOGÊNICO – PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T
REGULADORAS CD4⁺CD25⁺**

Rio de Janeiro, 12 de agosto de 2009.

(Dra. Maria Bellio, IMPPG-UFRJ)

(Dra. Adriana Bonomo, IMPPG-UFRJ/INCA-RJ)

(Dra. Ana Maria Caetano de Faria, ICB-UFMG)

(Dr. Vivian Mary Barral Dodd Rumjanek, FIOCRUZ-RJ)

(Dr. Alberto Nóbrega, IMPPG-UFRJ)

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunorregulação, Departamento de Imunobiologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, sob a orientação da Prof^a. Maria Bellio (Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes – Universidade Federal do Rio de Janeiro) e co-orientação da Prof^a. Rita Fucs (Instituto de Biologia - Universidade Federal Fluminense).

AGRADECIMENTOS

À família:

Às pessoas mais importantes da minha vida – mãe, pai e irmã – quero agradecer por toda compreensão, tolerância e incentivo. Apesar do meu comportamento freqüentemente distante e monossilábico nos últimos tempos, às vezes até agressivo, saibam que AMO VOCÊS! Obrigado por existirem e terem possibilitado que esse momento se concretizasse em minha vida.

Aos professores:

Rita Fucs, querida orientadora e amiga. Agradeço não só pela confiança que sempre depositou em mim, mas, principalmente, por ter se tornado uma constante fonte de inspiração. Sempre com belas idéias e interessada em questões centrais da Imunologia, você conseguiu que eu realmente me encantasse com o mundo do sistema imunológico. Você é uma pessoa admirável e me sinto feliz por poder aprender com nossa convivência diária! Obrigado por toda atenção, incentivo, dedicação e carinho ao orientar meus passos nessa caminhada!

Maria Bellio, por ter concordado ser minha orientadora no Mestrado. Sua gentileza, receptividade e experiência contribuíram muito para minha formação. Obrigado pela confiança e por todos os elogios!

Claudia Marcia Borges Barreto, uma das pessoas que mais tem me estimulado, desde a graduação. Mesmo à distância, está sempre atenta e preocupada comigo. Obrigado por respeitar minhas opiniões e acreditar no meu potencial!

Maurício Verícimo, por todo auxílio e atenção durante minhas atividades de pesquisa no Laboratório de Imunorregulação-UFF.

Adriana Bonomo, profissional exemplar que sempre me tratou com respeito e gentileza. Nossa convivência nos seminários tem sido prazerosa e contribuído muito para o amadurecimento do meu pensamento científico. Obrigado pela confiança e pelo apoio que você sempre me dedica!

Alberto Nóbrega, por estimular discussões e colaborar diretamente para realização deste trabalho.

Agradeço a todos os professores que gentilmente aceitaram participar da banca avaliadora do meu trabalho. Muito obrigado!

Aos amigos:

Jeane Nogueira, amiga de longa data... Não parece, mas lá se vão 6 anos desde que iniciamos nossa carreira na BioUFF. Quem diria que aqueles calouros inexperientes e sonhadores virariam amigos inseparáveis e seriam, futuramente, companheiros nessa aventura para desbravar o mundo imunológico?! Passamos por muitas coisas juntos, que contribuíram para consolidar ainda mais nossa amizade. Je, sua companhia é maravilhosa e indispensável! Sua inteligência, bom humor e comentários perspicazes tornam o meu dia mais feliz. Saiba que você é uma grande amiga e todo o incentivo e confiança que depositou em mim foram essenciais para me fazer prosseguir apesar de algumas dificuldades. Obrigado por compreender minha personalidade e respeitar minhas opiniões! AMO VOCÊ!

Caroline Nunes, minha amigona querida! Você chegou de mansinho e, num piscar de olhos, se tornou indispensável em minha vida. O olhar tranqüilo e otimista que tem sobre a realidade me inspira e me ajuda a acalmar meu nervosismo “constitutivo” (pelo menos eu tento, juro!). Sei que às vezes é difícil lidar com minhas rabugices e convicções, mas saiba que tenho aprendido muito com nosso convívio. Admiro sua iniciativa e inteligência e o cuidado que tem com nossas atividades no laboratório. Tenho certeza de que você será uma grande profissional e que nós compartilharemos muitos êxitos juntos! Obrigado por todo apoio e carinho!

A confiança que você tem em mim é muito maior do que minha autoconfiança! AMO VOCÊ!

Izabel Melgaço, simplesmente por ser minha Super-Gêmea! Isso explicaria tudo, mas faço questão de enumerar os motivos pelos quais devo lhe agradecer. Minha maior defensora, é amiga de todas as horas, principalmente das difíceis. Aprendo muito com seu senso ético, sinceridade inabalável e acidez admirável. Estar com você me faz recarregar as energias e ter forças para continuar. Obrigado pela torcida constante! AMO VOCÊ!

Camila Cabral e Renato Socodato, meus neurocientistas prediletos! Obrigado pelos incessantes elogios, pela força que vocês me deram nas dificuldades e por me acompanharem nessa trajetória, mesmo à distância. O carinho de vocês me conforta e me impulsiona a prosseguir. AMO VOCÊS!

*If politics is the art of the possible, research is surely the art of the soluble.
Both are immensely practical-minded affairs.*

*The human mind treats a new idea the way the body treats a strange
protein; it rejects it.*

- Sir Peter B. Medawar -

*I like to think that when Medawar and his colleagues showed that
immunological tolerance could be produced experimentally the new
immunology was born.*

- Sir Frank Macfarlane Burnet -

RESUMO

Fábio Barrozo do Canto

SUSCETIBILIDADE DE CÉLULAS T NEONATAIS E TIMÓCITOS DE ADULTO À AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA PERIFÉRICA A ESTÍMULO ALOGÊNICO – PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺CD25⁺

Orientadora: Maria Bellio

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Alguns autores têm sugerido que células recém-emigradas do timo (RTEs) são mais suscetíveis à aquisição de tolerância a antígenos alogênicos do que células T com maior tempo de colonização periférica. O presente estudo teve como objetivo investigar se populações linfóides naturalmente enriquecidas em RTEs, de diferentes origens e idades, podem se tornar tolerantes a antígenos alogênicos quando interagem com células semi-alogênicas no compartimento periférico. Camundongos atímicos BALB/cnu/nu previamente reconstituídos com células esplênicas de doadores adultos F1(BALB/c-Thy-1.2⁺ x B6.Ba-Thy-1.1⁺) - hospedeiro F1→BALB/cnu/nu - ou camundongos F1(BALB/c x C57BL/6)nu/nu foram utilizados como hospedeiros de timócitos (TN) e esplenócitos (EN) de neonatos ou timócitos de adultos (TA) obtidas de doadores BALB/c (Thy-1.2⁺). Um mês após a transferência das populações RTEs, a indução de tolerância foi avaliada pela persistência da população Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ nos hospedeiros F1→BALB/cnu/nu e pela ausência de sinais de doença enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHD) nos hospedeiros F1nu/nu. Esta abordagem nos permitiu estudar o estabelecimento de alo-tolerância na ausência do timo e de protocolos imunossupressores. As células neonatais (TN e EN) e TA adquirem tolerância específica aos aloantígenos de B6 quando interagem com células T semi-alogênicas de F1 residentes no compartimento periférico de hospedeiros F1→BALB/cnu/nu. A persistência dos esplenócitos de F1 nem sempre é acompanhada por quimerismo misto com as células de BALB/c transferidas, apesar de TN e TA proliferarem durante a primeira semana após a inoculação em hospedeiros F1→BALB/cnu/nu. Populações linfóides neonatais de BALB/c que expandiram na ausência de células semi-alogênicas não se tornam tolerantes aos aloantígenos de B6 e rejeitam as células de F1 posteriormente transferidas, evidenciando que o intervalo

entre a colonização periférica do hospedeiro BALB/cnu/nu pelas células de F1 e a transferência dos linfócitos respondedores de BALB/c influencia fortemente a aquisição de tolerância. TN, EN e TA são capazes de expandir e reconstituir o compartimento periférico de hospedeiros F1nu/nu, mas apenas as células neonatais adquirem tolerância aos aloantígenos de B6, conforme verificado pelo baixo índice de morte por GvHD. Para avaliar a influência de células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ (Treg) na tolerância neonatal obtida por nossos protocolos, hospedeiros F1nu/nu e F1→BALB/cnu/nu receberam, respectivamente, TN e EN depletados de células CD25⁺. A ausência de células CD25⁺ na população de EN não impediu sua tolerização no hospedeiro F1→BALB/cnu/nu, sugerindo que células Treg semi-alogênicas residentes no compartimento periférico não-linfopênico desses animais são suficientes para garantir a tolerância aos aloantígenos de B6. Em contraste, TN CD25⁻ transferidos para hospedeiros F1nu/nu não adquirem tolerância aos aloantígenos de B6, revelando que células Treg presentes na população respondedora são essenciais para inibir a alorreatividade ao haplotipo alogênico quando o compartimento periférico não é colonizado por células T semi-alogênicas. Nossos resultados indicam que populações RTEs de idade neonatal e adulta têm requerimentos diferentes para a aquisição de tolerância periférica a aloantígenos e a presença de células Treg CD4⁺CD25⁺ tanto na população indutora como na população respondedora parece contribuir para o estabelecimento da tolerância.

Palavras-chave: alorreatividade; células T reguladoras CD4⁺CD25⁺; células recém-emigradas do timo; tolerância neonatal; tolerância periférica; transplantação

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

ABSTRACT

Fábio Barrozo do Canto

SUSCETIBILIDADE DE CÉLULAS T NEONATAIS E TIMÓCITOS DE ADULTO À AQUISIÇÃO DE TOLERÂNCIA PERIFÉRICA A ESTÍMULO ALOGÊNICO – PARTICIPAÇÃO DE CÉLULAS T REGULADORAS CD4⁺CD25⁺

Orientadora: Maria Bellio

Resumo da Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

It has been suggested that recent thymic emigrants (RTEs) are more susceptible to acquire tolerance to allogeneic antigens than resident T cells, already colonizing the periphery for a longer time. The goal of the current study was to investigate whether lymphoid populations naturally enriched for RTEs, of different origins and ages, are able to become tolerant to fully allogeneic antigens when they interact with semi-allogeneic cells in the peripheral compartment. Newborn thymocytes (NT) and splenocytes (NS) or adult thymocytes (AT) isolated from BALB/c (Thy-1.2⁺) donors were transferred to athymic BALB/cnu/nu mice previously reconstituted with spleen cells from adult F1(BALB/c x B6.Ba) donors - F1→BALB/cnu/nu hosts - or to F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu mice. One month later, the induction of allotolerance was assessed by the persistence of double-positive Thy-1.1⁺/-1.2⁺ population in the F1→BALB/cnu/nu hosts and the absence of graft-versus-host disease (GvHD) signs in the F1 nu/nu hosts. This strategy allowed us to study the establishment of allotolerance in the absence of thymus and immunosuppressive regimen. Neonatal thymocytes and splenocytes (NT and NS) and AT acquire specific tolerance to B6 alloantigens when they interact with semi-allogeneic T cells that reside in the peripheral compartment of F1→BALB/cnu/nu hosts. Persistence of F1 splenocytes does not always result in chimerism with BALB/c transferred cells, although NT and AT undergo initial proliferation during the first week after inoculation in F1→BALB/cnu/nu hosts. BALB/c lymphoid populations that expanded in the absence of semi-allogeneic cells did not become tolerant to B6 alloantigens and rejected F1 cells transferred one month later, indicating that the time interval between F1 peripheral colonization of BALB/c nu/nu mice and the transfer of BALB/c responder lymphocytes greatly influences the acquisition of tolerance. NT, NS and AT are able to expand in and reconstitute the peripheral compartment of F1nu/nu hosts,

but only the neonatal populations acquire tolerance, as confirmed by low GvHD-induced death rates.. In order to address the influence of CD4⁺CD25⁺regulatory T cells (Treg) on the neonatal tolerance achieved through our protocols, F1nu/nu and F1→BALB/cnu/nu hosts received, respectively, CD25-depleted NT and NS. The absence of CD25⁺ cells in the BALB/c NS responder population did not impede tolerance induction in the F1→BALB/c nu/nu mice, suggesting that the semi-allogeneic CD4⁺CD25⁺ Treg cells resident in the non-lymphopenic peripheral compartment of F1→BALB/c nu/nu hosts are sufficient to guarantee CD25⁻ BALB/c NS tolerance to B6 alloantigens. On the other hand, CD25⁻ BALB/c NT transferred to F1nu/nu mice did not become tolerant to B6 alloantigens, showing that CD25⁺ T cells contained in the responder population are essential to inhibit alloreactivity to B6 MHC haplotype when the peripheral compartment is not colonized by semi-allogeneic T cells. Our results suggest that neonatal and adult RTE populations might have specific requirements in order to acquire peripheral tolerance to alloantigens and that CD4⁺CD25⁺ Treg cells present both in the inducer and responder populations seem to contribute to tolerance establishment.

Palavras-chave: alloreactivity; CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells; recent-thymic emigrants; neonatal tolerance; peripheral tolerance; transplantation

Rio de Janeiro
Agosto de 2009

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CÉLULAS T REGULADORAS NATURAIS CD4⁺CD25⁺	3
1.1.1 Caracterização fenotípica	4
1.1.2 Programa de diferenciação controlado pela proteína Foxp3	5
1.1.3 Desenvolvimento das Células Treg CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	7
1.1.4 Mecanismos de Supressão	14
1.1.5 Controle da Geração e Função Supressora das Treg	18
1.1.6 Plasticidade Fenotípica das Células Treg	21
1.2 CÉLULAS T REGULADORAS NA TOLERÂNCIA À TRANSPLANTAÇÃO.....	23
1.3 TOLERÂNCIA X IMUNIDADE NA IDADE NEONATAL	26
1.3.1 Estado linfopênico natural do indivíduo neonato	33
1.3.2 Predomínio em Células Recém-emigradas do Timo.....	35
1.3.3 Repertório de Linfócitos T	38
1.3.4 Composição de Células Apresentadoras de Antígeno	39
1.3.5 Padrão de migração e recirculação linfocitária	41
1.4 JUSTIFICATIVA DO TRABALHO	42
2. OBJETIVOS	44
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	45
3.1 ANIMAIS.....	45
3.2 PREPARO DE SUSPENSÕES CELULARES DE ÓRGÃOS LINFÓIDES	45
3.3 DEPLEÇÃO DE CÉLULAS CD25⁺ POR SEPARAÇÃO MAGNÉTICA (MACS)	46
3.4 TRANSFERÊNCIAS DE POPULAÇÕES LINFÓIDES	47
3.5 ENXERTOS DE PELE.....	47
3.6 CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS POPULAÇÕES CELULARES POR IMUNOFLOUORESCÊNCIA	48
3.7 AVALIAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR <i>IN VIVO</i> POR DILUIÇÃO DE CFSE	49
3.8 ANÁLISE DA TAXA DE MORTALIDADE POR DOENÇA ENXERTO-VERSUS-HOSPEDEIRO (GVHD)	50
3.9 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS.....	51
4. RESULTADOS	54
5. DISCUSSÃO	69
6. BIBLIOGRAFIA.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

Aire – autoimmune regulator
AMPC – adenosina monofosfato cíclico
APC – célula apresentadora de antígeno
CFSE - carboxi-fluorescein succinimidyl ester
CTLA-4 - cytotoxic T-lymphocyte antigen 4
DC – célula dendrítica
EA/AS – esplenócitos de adulto
EN/NS – esplenócitos de neonato
FITC – isotiocianato de fluoresceína
Foxp3 - forkhead-box P3
FR4 – receptor de folato 4
GITR - glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor
GvHD – doença enxerto-*versus*-hospedeiro
IDO – indolamina-2,3-deoxigenase
ICAM-1 – molécula de adesão intercellular 1
IFN- γ - interferon gama
IL- interleucina
IL-7R – receptor de interleucina 7
IPEX - immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
LAG-3 - lymphocyte-activation gene 3
LFA-1 – antígeno associado à função linfocitária 1
LIP – proliferação induzida por linfopenia
LPS – lipopolissacarídeo
MHC – complexo principal de histocompatibilidade
mTECs – células epiteliais da medula tímica
nTreg – célula T reguladora natural
NFAT - nuclear factor of activated T cells
NF- κ B – nuclear factor kappa B
RA – ácido retinóico
Rag – recombination activating gene
ROR γ t - orphan nuclear receptor ROR gama t
RTEs – células recém-emigradas do timo
S1P₁ – receptor de esfingosina-1-fosfato 1

TA/AT – timócitos de adulto
TCR – receptor de célula T
TdT - terminal-deoxynucleotidyl-transferase
TGF- β - transforming growth factor-beta
TLR – receptor do tipo Toll
TN/NT – timócitos de neonato
Treg – célula T reguladora CD4⁺CD25⁺

1. INTRODUÇÃO

O sistema imunológico adaptativo é reconhecido por sua capacidade de gerar um repertório de linfócitos constituídos por uma ampla variedade de clones que expressam receptores únicos. Tal diversidade possibilita o estabelecimento de respostas específicas para virtualmente qualquer antígeno exógeno e, por isso, tem sido considerada um importante benefício adaptativo. Entretanto, os mecanismos de geração da diversidade que operam durante a ontogenia dos linfócitos também permitem a produção de clones auto-reativos, com alta afinidade por antígenos próprios. Se, por um lado, a existência de um número adequado e diverso de linfócitos T com especificidade por antígenos exógenos é essencial para o desenvolvimento de respostas imunológicas protetoras contra infecções, a presença de clones auto-reativos na periferia é indesejável, uma vez que reações auto-imunes podem ser iniciadas (Romagnani, 2006). Mesmo as respostas imunológicas protetoras podem ser prejudiciais ao organismo caso não estejam sob um rígido controle que evite uma ativação exacerbada. O sistema imunológico deve dispor, portanto, de mecanismos reguladores que evitem a auto-imunidade e que mantenham as respostas imunológicas em um equilíbrio preciso, garantindo imunidade contra os agentes infecciosos, mas sem o desencadeamento de auto-agressão. (Sakaguchi, 2004).

O controle de células T auto-reativas inicia-se durante a ontogenia dos linfócitos dentro do timo e persiste após a emigração dessas células para a periferia. Diferentes mecanismos atuam intra- e pós-timicamente para impedir a ativação excessiva de clones auto-reativos, representando assim o que se denomina tolerância central e periférica, respectivamente. A

seleção intra-tímica de linfócitos, por exemplo, é responsável por eliminar, dentro do timo, clones que possuam receptores de célula T (TCRs) com afinidade exacerbada pelo complexo MHC:peptídeo próprio (Starr *et al.*, 2003). Entretanto, alguns clones auto-reativos escapam da seleção negativa e migram para a periferia. Nesse caso, os mecanismos periféricos de tolerância se tornam cruciais para evitar a ativação dessas células e, conseqüentemente, o desencadeamento de auto-imunidade.

Os mecanismos periféricos de tolerância ao próprio podem ser classificados em duas categorias principais: intrínsecos ou recessivos e extrínsecos ou dominantes (Tarbell *et al.*, 2006). Os mecanismos intrínsecos/recessivos de tolerância referem-se ao controle exclusivo de um clone (ou conjunto de clones) com propriedades auto-reativas; o clone auto-reativo morre por apoptose ou perde sua função na periferia, sendo impedido, portanto, de efetuar sua resposta. São mecanismos periféricos intrínsecos/recessivos de tolerância os fenômenos de (i) anergia clonal, (ii) deleção pós-tímica e (iii) não responsividade por *downregulation* do TCR. Já os mecanismos extrínsecos/dominantes de tolerância periférica correspondem ao controle do clone auto-reativo por uma outra população celular, onde o potencial auto-imune do linfócito auto-reativo é suprimido de forma dominante por outra célula, denominada célula reguladora. Como será descrito posteriormente, os mecanismos periféricos de regulação da funcionalidade de linfócitos T estão também envolvidos na tolerância à transplantação (Wood & Sakaguchi, 2003).

Um conjunto heterogêneo de células reguladoras foi descrito, incluindo uma variedade de fenótipos de superfície (Walsh *et al.*, 2004). Tais células são capazes de promover o controle não só da auto-imunidade,

mas também da hiper-ativação imunológica ocasionada por respostas contra antígenos exógenos (provenientes de agentes infecciosos, alérgenos, transplantes), através da supressão das respostas de células T. Atualmente, dentro do compartimento de linfócitos T, a atividade reguladora é principalmente atribuída às seguintes subpopulações: Tr1, Th3, NKT, CD8⁺CD25⁺ e CD4⁺CD25⁺ (Bluestone & Abbas, 2003; Becker *et al.*, 2006; Beissert *et al.*, 2006; La Cava *et al.*, 2006). Alguns autores, no entanto, discordam da visão de que existam subpopulações específicas destinadas à regulação das respostas imunológicas, e sugerem que toda célula com alta afinidade por peptídeos próprios pode desempenhar tal papel, desde que possa exercer uma inibição competitiva da expansão de clones auto-reativos (Stockinger, Barthlott *et al.*, 2004).

Devido à importante participação das células T reguladoras CD4⁺CD25⁺ no controle da auto-imunidade e da tolerância periférica à transplantação, o próximo capítulo será dedicado à sua descrição.

1.1 Células T Reguladoras Naturais CD4⁺CD25⁺

As células T reguladoras (Treg) CD4⁺CD25⁺ naturais constituem uma subpopulação distinta de linfócitos T maduros com atividade supressora (Sakaguchi *et al.*, 2008). Esta subpopulação é gerada predominantemente no timo e corresponde a 5-10% do total de linfócitos CD4⁺ nos órgãos linfóides periféricos (Sakaguchi, 2004). As células Treg foram inicialmente reconhecidas por inibirem a ativação de clones auto-reativos que escapam da seleção negativa no timo, contribuindo para a prevenção da auto-imunidade e manutenção da tolerância periférica aos auto-antígenos

(Sakaguchi *et al.*, 1995; Asano *et al.*, 1996; Sakaguchi *et al.*, 2006). Além disso, as células Treg naturais são essenciais para o controle das respostas inata e adaptativa a antígenos não-próprios, evitando o desencadeamento de processos inflamatórios exacerbados que são potencialmente lesivos ao indivíduo. A ativação imunológica específica contra antígenos exógenos constituintes de microrganismos, tumores, alérgenos e transplantes é limitada por células Treg (Shevach, 2002; Wood & Sakaguchi, 2003; Shi & Qin, 2005; Curiel, 2008; Belkaid & Tarbell, 2009). A depleção dessa subpopulação resulta em diversas manifestações patológicas auto-imunes e/ou inflamatórias (Kim *et al.*, 2006).

1.1.1 Caracterização fenotípica

As células T reguladoras naturais CD4⁺ de camundongos expressam constitutivamente a cadeia alfa do receptor de IL-2 (CD25) e o fator de transcrição Foxp3 (Becker *et al.*, 2006). Estas moléculas têm sido amplamente utilizadas como marcadores da linhagem Treg em vários estudos. Outros marcadores utilizados em estudos experimentais para identificar células Treg naturais são GITR, CTLA-4, OX40, CD62L e CD103. Em camundongos, o fator de transcrição Foxp3 é predominantemente expresso por células Treg e não está presente em células T virgens ou efetoras, sendo considerado o marcador mais confiável dessa subpopulação.

Em humanos, a caracterização fenotípica das células Treg ainda não foi completamente elucidada. Apesar da maior parte dos estudos identificarem as células Treg humanas como CD4⁺CD25⁺, uma parcela dessas células não tem função supressora, mas sim, efetora, uma vez que a

proteína CD25 tem sua síntese aumentada após estimulação antígeno-específica. Além disso, a proteína Foxp3 não é exclusivamente expressa por células Treg humanas, sendo identificada em uma considerável parcela das células T não-reguladoras ativadas (Campbell & Ziegler, 2007). Recentemente, outras moléculas vem sendo apontadas como candidatas a marcadores de Treg. As células Treg humanas parecem expressar baixos níveis do receptor de IL-7 (CD127 ou IL-7R) e altos níveis do receptor de folato-4 (FR4) (Roncarolo & Gregori, 2008).

1.1.2 Programa de diferenciação controlado pela proteína Foxp3

O fator de transcrição Foxp3 (*forkhead-box P3*), codificado pelo gene *FOXP3* localizado no cromossomo X, é indispensável para a diferenciação e desenvolvimento da função supressora das células Treg, sendo considerado seu regulador-mestre (Fontenot *et al.*, 2003; Fontenot *et al.*, 2005; Campbell & Ziegler, 2007). Estudos com animais e humanos deficientes na produção e/ou função deste fator de transcrição, tais como camundongos *scurfy* e pacientes com a doença IPEX (*immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked*), revelaram a importância do Foxp3 para o estabelecimento da atividade supressora e para a homeostasia do compartimento de células T (van der Vliet & Nieuwenhuis, 2007; Appleby & Ramsdell, 2008).

Nessas condições, indivíduos do sexo masculino são invariavelmente acometidos por uma síndrome auto-imune espontânea e letal, caracterizada por intensa linfoproliferação e acompanhada por infiltração mononuclear e lesão de diversos tecidos (Ochs *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2009). A

deficiência em Foxp3 impede o desenvolvimento normal de células Treg naturais, o que desencadeia a síndrome autoimune linfoproliferativa severa. As fêmeas heterozigotas que possuem apenas um alelo mutante permanecem saudáveis, revelando que as células Treg que expressam o alelo *FOXP3* normal são capazes de regular a ativação das células T. A transferência de Tregs CD4⁺CD25⁺ para camundongos *scurfy* bloqueia o desenvolvimento da auto-imunidade e garante a sobrevivência dos hospedeiros.

A proteína Foxp3 é responsável por controlar um programa transcricional intrínseco que resulta na diferenciação de precursores multipotentes à linhagem reguladora (Zheng & Rudensky, 2007). Essa molécula atua como um fator de especificação de linhagem, promovendo a transcrição de genes que codificam proteínas necessárias à função supressora, bem como inibe a expressão de proteínas associadas ao fenótipo efetor (Gavin *et al.*, 2007; Marson *et al.*, 2007). Precursores linfóides geneticamente deficientes em Foxp3 são incapazes de completar sua diferenciação em células nTreg dentro do timo (Liston *et al.*, 2007) e a atenuação da expressão de Foxp3 resulta em perda da função supressora (Wan & Flavell, 2007). Foxp3 interage com NFAT e NF-κB, modulando-os negativamente e reprimindo a expressão gênica de citocinas e o desenvolvimento da função efetora de células T auxiliares (Betelli *et al.*, 2005).

A expressão contínua de Foxp3 é essencial para a manutenção do fenótipo e da função supressora de células Treg diferenciadas. A ablação condicional da proteína Foxp3 em células Treg maduras periféricas resulta em perda da atividade supressora e características fenotípicas; essas

células passam a secretar IL-2 e citocinas pró-inflamatórias, tornando-se potencialmente patogênicas (Williams & Rudensky, 2007).

1.1.3 Desenvolvimento das Células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺

Os processos envolvidos na geração intra-tímica e periférica de células Treg são ainda pouco compreendidos (Maggi *et al.*, 2005). O entendimento dos mecanismos que fundamentam a geração periférica, principalmente, será de vital importância para a manipulação terapêutica de células Treg como na indução de tolerância a transplantes.

a. Desenvolvimento de Células Treg naturais

O timo foi descrito como o principal sítio de desenvolvimento das células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ naturais (nTreg) (Itoh *et al.*, 1999). Análises das seqüências de TCRs expressos por células Treg confirmaram a existência de uma ampla sobreposição entre os repertórios tímico e periférico desta subpopulação (Hsieh *et al.*, 2006; Pacholczyk *et al.*, 2006). Os mecanismos de geração intra-tímica de nTreg são ainda pouco compreendidos e questões-chave, tais como a natureza da APC responsável por sua seleção, o estágio de maturação do linfócito em que a diferenciação para Treg ocorre e a importância das interações antígeno-específicas nesse processo, permanecem sob intensa investigação.

Com o uso de camundongos duplo-transgênicos, que expressam no timo simultaneamente um TCR de especificidade determinada e seu antígeno cognato (neo-antígeno próprio), foi demonstrado que as células

nTreg são selecionadas intra-timicamente por interações de alta afinidade com peptídeos próprios apresentados por células epiteliais do estroma tímico (Jordan *et al.*, 2001; Apostolou *et al.*, 2002). Um outro trabalho demonstrou que as células Treg CD4⁺CD25⁺ são selecionadas como uma porção do repertório natural de linfócitos CD4⁺, que é mantido em tamanho semelhante em camundongos que expressam uma diversidade reduzida de peptídeos apresentados pelo MHC. De maneira importante, esse estudo mostra que o repertório de células Treg CD4⁺CD25⁺ é diverso e composto por TCRs que reconhecem antígenos próprios associados a moléculas singênicas de MHC de classe II. Os autores postularam a hipótese de que embora as células Treg CD4⁺CD25⁺ sejam primeiramente detectadas na medula tímica, seu comprometimento funcional ocorreria no córtex tímico, durante o estágio duplo-positivo (Pacholczyk *et al.*, 2002).

De acordo com essa visão, foi descrito mais recentemente que a expressão ubíqua de um neo-antígeno próprio por células epiteliais tímicas é capaz de promover a seleção e/ou expansão de células Treg CD25⁺Foxp3⁺ antígeno-específicas a partir de timócitos CD4⁺CD8⁺ (Cabarrocas *et al.*, 2006). Além disso, existem evidências de que o comprometimento com a linhagem reguladora pode ocorrer num período ainda mais precoce da maturação dos linfócitos T, durante o estágio duplo-negativo, quando o TCR ainda não foi expresso (Pennington *et al.*, 2006).

A visão mais aceita dos mecanismos de seleção intra-tímica sugere que células T CD4⁺CD25⁻ com significativa afinidade pelo próprio, mas ainda insuficiente para desencadear a seleção negativa, podem se desenvolver em células nTreg dentro do timo, com aquisição da expressão de CD25 e Foxp3 e de função supressora (Graca *et al.*, 2005). As interações dos timócitos em

desenvolvimento com células dendríticas (Tarbell *et al.*, 2006), assim como a sinalização pelas moléculas CD28 (Tai *et al.*, 2005; Liu, Amarnath *et al.*, 2006) e TGF- β (Liu *et al.*, 2008) são consideradas essenciais para a diferenciação intra-tímica de nTreg.

Segundo alguns autores, o desenvolvimento de células nTreg parece ser caracterizado por duas etapas: uma dependente e outra independente do engajamento do TCR (Lio & Hsieh, 2008). De acordo com este modelo, a sinalização via TCR, decorrente do reconhecimento de auto-antígenos apresentados por APCs tímicas, resulta no aumento da expressão de CD25 nos timócitos CD4⁺ em desenvolvimento. As células T CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ recém-diferenciadas constituem uma subpopulação enriquecida em precursores de células nTreg, que necessitam apenas de estimulação via IL-2 ou IL-15 para adquirirem a expressão de Foxp3⁺ e consolidarem seu comprometimento com o fenótipo supressor.

Um recente estudo demonstrou que diferentes APCs tímicas são capazes de mediar a diferenciação de células nTreg antígeno-específicas e que o desenvolvimento desta subpopulação está sob o controle intrínseco do estágio de maturação do linfócito T. Timócitos CD4⁺CD8⁻ imaturos (CD62L^{low}CD69^{high}) exibem uma maior predisposição a se diferenciarem em células Treg Foxp3⁺ quando comparados com timócitos CD62L^{high}CD69^{low} maduros (Wirnsberger *et al.*, 2009). De maneira importante, esse trabalho sugere que a diferenciação intra-tímica de nTreg pode ser iniciada mesmo se o precursor não encontrar com o antígeno cognato durante a fase de seleção positiva.

O repertório de TCRs expressos pelas células nTreg é diverso e predominantemente direcionado contra auto-antígenos (Pacholczyk *et al.*,

2002; Hsieh *et al.*, 2004). A especificidade antigênica da população Treg parece ser fortemente influenciada pela coleção de antígenos próprios que são apresentados no timo para os timócitos CD4⁺ em diferenciação (Lerman *et al.*, 2004; Larkin III *et al.*, 2008).

A seleção positiva no córtex tímico promove a sobrevivência de precursores de Treg auto-reativos e, portanto, desempenha um importante papel na definição do repertório de células nTreg diferenciadas no timo (Ribot *et al.*, 2006; Ribot *et al.*, 2007). Além disso, a medula tímica também contribui para a composição de especificidades das nTreg que emigram do timo.

A proteína Aire (*autoimmune regulator*) é um fator de transcrição responsável por regular a expressão de peptídeos restritos a tecidos próprios periféricos no timo, em particular por células epiteliais medulares (Mathis & Benoist, 2009). Este fenômeno é essencial para garantir a auto-tolerância, não só por mediar a eliminação de clones auto-reativos por seleção negativa, mas também por influenciar o desenvolvimento de nTregs antígeno-específicas com afinidade por antígenos próprios (Kyewski & Derbinski, 2004; Nomura & Sakaguchi, 2007). Recentemente, demonstrou-se que células epiteliais da medula tímica (mTECs) Aire⁺ são capazes de selecionar células nTreg Foxp3⁺ específicas para auto-antígenos. A apresentação de antígenos próprios por essa subpopulação de APCs tímicas parece influenciar consideravelmente a seleção de células nTreg, pois a deficiência na expressão de MHC de classe II exclusivamente nas mTECs reduz a eficiência na diferenciação de nTreg policlonais (Aschenbrenner *et al.*, 2007).

A função da especificidade do TCR no desenvolvimento intra-tímico de células Treg foi recentemente investigada (Bautista *et al.*, 2009). Utilizando uma linhagem transgênica de camundongos em que todos os timócitos expressam o mesmo TCR derivado de uma célula Treg natural (cuja expressão não foi detectada em células T convencionais), os autores demonstraram que o desenvolvimento de células Treg só ocorreu de maneira eficiente quando os precursores antígeno-específicos estavam presentes em baixa frequência no timo normal. Nas condições em que uma alta frequência de clones TCR-transgênicos estava presente no timo, a diferenciação de células Treg naturais foi indetectável. Além disso, timócitos expressando TCRs derivados de células T não reguladoras foram incapazes de induzir a geração de células Treg mesmo em baixas frequências, evidenciando que o desenvolvimento intra-tímico de Treg é um processo instruído pelo TCR e limitado por competição intra-clonal.

b. Desenvolvimento de Células Treg adaptativas

A comparação dos TCRs expressos por células Treg tímicas e periféricas revelou que, apesar de muito similares, esses repertórios não são idênticos: especificidades presentes no compartimento periférico não são detectadas no timo e vice-versa (Pacholczyk & Kern, 2008). Além disso, existem semelhanças entre os repertórios expressos por células T reguladoras e não-reguladoras, evidenciando que mecanismos periféricos podem influenciar a manutenção de células nTreg emigradas do timo e a indução do fenótipo regulador a partir de células T não-reguladoras (Wong *et al.*, 2007).

Além da já descrita participação do timo na formação do repertório de Tregs que emigram para a periferia, diversos estudos relataram a geração timo-independente de Tregs a partir de células T $CD4^+CD25^-$ *in vivo*, um fenômeno conhecido como conversão periférica (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009). As células Treg diferenciadas no compartimento periférico a partir da população não-reguladora são conhecidas como Treg adaptativas ou induzidas. A maioria dos estudos demonstra que proliferação de células T $CD4^+CD25^-$ em animais linfopênicos possibilita sua diferenciação ao fenótipo Treg $CD25^+Foxp3^+$, com aquisição de capacidade imunossupressora (Curotto de Lafaille *et al.*, 2004; Zelenay *et al.*, 2005). A diferenciação de células Treg antígeno-específicas por conversão periférica em ambiente linfopênico também foi demonstrada (Apostolou & Von Boehmer, 2004; Lathrop *et al.*, 2008).

A conversão periférica vem sendo apontada como um fenômeno biológico importante para a homeostase e a composição do repertório periférico de linfócitos T. Esse processo poderia favorecer a geração de células Treg específicas para antígenos não apresentados no timo, constituintes da microbiota ou auto-antígenos que surgem em diferentes fases do desenvolvimento. Além disso, é possível que a conversão periférica permita a diferenciação de células Treg antígeno-específicas durante o curso de uma resposta imunológica, contribuindo para restringir eventuais manifestações imunopatológicas (Curotto de Lafaille & Lafaille, 2009).

Os mecanismos envolvidos na conversão periférica ainda não estão bem definidos. Foi descrito que esse fenômeno depende da co-estimulação via molécula B7 (Liang *et al.*, 2005) e que a atuação conjunta das citocinas TGF- β e IL-2 é capaz de induzir a expressão de Foxp3 e conseqüente

aquisição de capacidade supressora no compartimento de células T CD4⁺CD25⁻, ressaltando a importância dessas moléculas para a geração pós-tímica de células Treg (Chen *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2007). A taxa de conversão CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ → CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ em condições linfopênicas parece ser limitada pela presença de células T potencialmente competidoras (Almeida *et al.*, 2006), evidenciando a atuação de um controle homeostático neste compartimento.

Recentemente, a participação do ácido retinóico (RA), um metabólito da vitamina A obtida da dieta, foi descrita na diferenciação pós-tímica de células Treg. Essa molécula atua como um regulador-chave das respostas imunológicas dependentes de TGF-β, sendo capaz de, reciprocamente, inibir a diferenciação de células Th17 pró-inflamatórias e promover a geração periférica de células Treg Foxp3⁺ anti-inflamatórias no tecido intestinal (Mucida *et al.*, 2007). Células dendríticas dos linfonodos mesentéricos e da lâmina própria são essenciais para a indução de células Treg Foxp3⁺ antígeno-específicas por TGF-β e RA, ressaltando o papel do intestino com um sítio extra-tímico relevante para a diferenciação periférica de células Treg (Coombes *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007).

Alguns estudos traçam um paralelo entre os processos de ativação celular intra- e pós-tímicos e propõem que, na periferia, a geração de células Treg (inclusive alo-reativas) a partir de precursores virgens pode ser uma consequência de estimulação (alo-)antigênica subótima sustentada (Graca *et al.*, 2005). Em alguns casos, isto pode ser facilitado pela ação de moléculas que inibem a ativação de linfócitos T, como sinalização por CTLA-4 e TGF-β, ou mesmo por anticorpos bloqueadores que atuam ao nível da sinapse imunológica (Waldmann *et al.*, 2006). A interação com APCs na

periferia, especialmente células dendríticas (DCs), parece mediar essa conversão (Morelli & Thomson, 2007); células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ interagindo numa mesma APC com células T CD4⁺CD25⁻Foxp3⁻ educariam estas células, favorecendo sua conversão ao fenótipo regulador. Os mecanismos desta conversão ainda são obscuros e algumas citocinas, como TGF- β e IL-10 foram sugeridas como participantes dessas interações (Tarbell *et al.*, 2006). Além disso, foi proposto que as células Treg podem induzir a inativação de DCs, inibindo sua capacidade de expressar moléculas co-estimuladoras (Moser, 2003). Desta forma, células T virgens CD4⁺CD25⁻, interagindo com DCs tolerogênicas no compartimento periférico, poderiam se diferenciar em células CD25⁺ reguladoras em vez de efetoras. Estudos recentes demonstraram que o desenvolvimento e homeostasia periférica do repertório de células Treg naturais é dependente de IL-2 (de La Rosa *et al.*, 2004) e interações CD28/B7 (Salomon *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2008; Zeng *et al.*, 2009).

1.1.4 Mecanismos de Supressão

A definição dos mecanismos imunossupressores utilizados por células Treg será de grande importância para compreender o processo de tolerância periférica, auxiliando no desenvolvimento de estratégias terapêuticas voltadas para o tratamento de doenças auto-imunes e limitação de manifestações inflamatórias e imunológicas indesejadas, como alergias e rejeição de transplantes. Atualmente acredita-se que os principais mecanismos empregados pelas células Treg para o controle das respostas imunológicas sejam divididos nas seguintes categorias: (i) secreção de

citocinas inibitórias; (ii) inibição por contato célula-célula; (iii) citólise; (iv) desestabilização metabólica e (v) modulação da maturação e/ou função das células dendríticas (Miyara & Sakaguchi, 2007; Vignali *et al.*, 2008).

As quatro primeiras categorias incluem formas diretas de regular a resposta imunológica, através de influência inibitória dominante sobre clones de células T efetoras (auto/alorreativos). Já a última categoria representa uma forma indireta de regulação imunológica, em que a célula Treg modula a atividade de APCs e, estas sim, interferem no resultado de sua interação posterior com linfócitos T, desencadeando supressão/anergia em vez de ativação efetora.

Dados *in vitro* sugerem que as citocinas IL-10 e TGF- β são dispensáveis para a supressão mediada por Treg, reforçando a idéia de um mecanismo de supressão dependente de contato celular. Entretanto, estudos *in vivo* demonstraram que esses fatores solúveis são essenciais para regular respostas auto-imunes, alérgicas, anti-infecciosas e, ainda, alo-tolerância (Asseman *et al.*, 1999; Fahlén *et al.*, 2005; Joetham *et al.*, 2007; Molitor-Dart *et al.*, 2007; Rubtsov *et al.*, 2008). O TGF- β em sua forma de membrana também é importante para a célula Treg exercer sua função supressora, mediando a inibição da ativação de células T efetoras através do contato-célula-célula (Nakamura *et al.*, 2001; Green *et al.*, 2003). Recentemente, foi descrito que a citocina IL-35 é preferencialmente sintetizada por células Treg e necessária para sua máxima atividade supressora. Células Treg geneticamente deficientes nesta proteína exibem significativa redução na sua atividade reguladora *in vitro*, e são incapazes de controlar a proliferação homeostática de células T efetoras e suprimir a doença inflamatória intestinal *in vivo* (Collison *et al.*, 2007).

A supressão por citólise é mediada predominantemente por granzima B. Células Treg murinas deficientes em granzima B têm reduzida atividade supressora *in vitro* e *in vivo*, e células T efetoras que superexpressam um inibidor específico de granzima B são resistentes à citólise mediada por Treg (Gondek *et al.*, 2005). Entretanto, a participação da perforina na indução de apoptose de células-alvo mediada por células Treg ainda não está clara: alguns estudos sugerem um mecanismo perforina-dependente (Cao *et al.*, 2007), enquanto outros suportam uma via perforina-independente (Gondek *et al.*, 2005; Gondek *et al.*, 2008). Além da granzima, a molécula galectina-1, expressa em altos níveis em células Treg humanas e murinas, também é capaz de induzir a apoptose de células T. A deficiência no gene que codifica essa proteína resulta em redução do efeito supressor das Treg *in vitro* e *in vivo* (Garin *et al.*, 2005).

Ultimamente tem sido proposto que as Treg são capazes de inibir respostas imunológicas ao desestabilizar o metabolismo de células T efetoras. Tradicionalmente, sabe-se que as células Treg podem seqüestrar IL-2 do meio, dificultando a sobrevivência e proliferação de células T efetoras (de La Rosa *et al.*, 2004; Almeida *et al.*, 2005). Recentemente, foi demonstrado que a privação de IL-2 mediada por células Treg induz a apoptose de linfócitos T (Pandiyan *et al.*, 2007). Além disso, células Treg seletivamente expressam as moléculas CD39 e CD73, duas ectoenzimas essenciais para a formação de adenosina (Deaglio *et al.*, 2007). A ligação da adenosina produzida por células Treg ao receptor A_{2A} é capaz de inibir a ativação de células T efetoras, além de favorecer a indução periférica de células Treg, suprimindo a produção de IL-6 e promovendo a expressão de TGF- β (Borsellino, *et al.*, 2007; Zarek *et al.*, 2008). Um outro mecanismo

pelo qual a célula Treg inibe a função de linfócitos T ativados é através da transferência direta de AMPc para células T efetoras por meio de junções comunicantes (Bopp *et al.*, 2007).

As células Treg são ainda capazes de modular a maturação e a função de DCs, a subpopulação de APCs mais importante para a ativação de células T efetoras. Células Treg inibem a ativação de DCs, num processo dependente da molécula co-estimuladora CTLA-4, constitutivamente expressa por Treg (Read *et al.*, 2000). Estudos recentes demonstram que a produção da proteína CTLA-4 por células Foxp3⁺ é crucial para a inibição eficiente de doença autoimune dependente de célula T (Wing *et al.*, 2009). Foi também demonstrado que células Treg podem condicionar DCs, num processo dependente da interação CTLA-4/B7, a expressarem a enzima indolamina-2,3-deoxigenase (IDO), uma potente molécula imunorreguladora responsável por catabolizar o triptofano (Fallarino *et al.*, 2003; Mellor & Munn, 2004).

A capacidade das DCs ativarem células T efetoras pode ser diretamente modulada por células Treg. DCs que interagem com células Treg são sinalizadas a diminuir a expressão das moléculas co-estimuladoras CD80 e CD86, além de MHC de classe II (Cederbom *et al.*, 2000; Misra *et al.*, 2004). A molécula LAG-3 (lymphocyte-activation gene 3), um homólogo da proteína CD4, é expressa por células Treg e é necessária para sua máxima atividade supressora. A ligação de LAG-3 a moléculas de MHC de classe II expressas por DCs imaturas suprime a consolidação de sua maturação e, conseqüentemente, sua capacidade imunossupressora (Huang *et al.*, 2004; Liang *et al.*, 2008). Existem evidências de que as células Treg

também modulam a funcionalidade de macrófagos e monócitos (Tiemessen *et al.*, 2007).

Apesar de diversos mecanismos serem atualmente propostos para explicar a função supressora das Treg, pouco ainda se sabe sobre a relevância biológica de cada um deles. Os detalhes moleculares envolvidos nos fenômenos de supressão estão sob intensa investigação e uma questão central permanece: qual a contribuição relativa de cada um desses mecanismos (e de outros que venham a ser descobertos) para a regulação imunológica *in vivo* e como esses diferentes “fatores de supressão” cooperam para inibir a ativação de linfócitos T?

1.1.5 Controle da Geração e Função Supressora das Treg

Um equilíbrio numérico e funcional entre as subpopulações de linfócitos é essencial para manter a homeostase no compartimento periférico (Almeida *et al.*, 2005), permitindo o desenvolvimento de respostas adaptativas anti-infecciosas e anti-tumorais protetoras, ao mesmo tempo em que a auto-tolerância é preservada. Nesse sentido, elucidar os mecanismos que influenciam a geração e função das células Treg será fundamental para a compreensão de como as atividades efetora e reguladora são dinamicamente controladas nos órgãos linfóides periféricos.

Um recente estudo revelou que o receptor de esfingosina-1-fosfato S1P₁ influencia o desenvolvimento intra-tímico, a homeostase periférica e a função de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ (Liu *et al.*, 2009). Comparando camundongos deficientes nesse receptor com linhagens transgênicas que o superexpressam exclusivamente em células CD4⁺, os autores

demonstraram que S1P₁ é um regulador intrínseco do desenvolvimento de células Treg naturais, inibindo a diferenciação de precursores tímicos CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻ para o fenótipo Foxp3⁺. Além disso, a sinalização através desse receptor modula negativamente a atividade supressora de células Treg, embora não exerça nenhum efeito direto sobre as células T não-reguladoras. O controle da função reguladora por essa via parece ser importante para restringir a o efeito supressor de células T reguladoras numa fase inicial da resposta, permitindo a ativação eficiente dos linfócitos T e o desenvolvimento de respostas protetoras.

Uma outra família de receptores vem sendo implicada no controle da atividade supressora das células T reguladoras. As células T reguladoras expressam uma variedade de receptores do tipo Toll (*toll-like receptors*, TLRs) e sua função imunossupressora parece ser modulada direta e indiretamente pela sinalização via TLR (Liu & Zhao, 2007).

Alguns estudos demonstraram que o engajamento de TLR2 promove um controle intrínseco da proliferação e função de células Treg *in vitro* e *in vivo*. Camundongos deficientes em TLR2 possuem números inferiores de células T CD4⁺CD25⁺ quando comparados a animais selvagens (Netea *et al.*, 2004). Células T CD4⁺CD25⁺ isoladas de camundongos selvagens e estimuladas *in vitro* via TCR sofrem intensa proliferação na presença de agonistas de TLR2, com perda transiente da função supressora e redução da expressão de Foxp3 (Sutmuller *et al.*, 2006; Liu, Komai-Koma *et al.*, 2006). A modulação da função supressora de células Treg foi demonstrada *in vivo* pela administração sistêmica de ligantes de TLR2, o que acarreta perda do fenótipo regulador e desenvolvimento de resposta anti-fúngica mais eficiente (Sutmuller *et al.*, 2006).

Em contraste, a exposição de células Treg CD4⁺CD25⁺ a lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano, um ligante de TLR4, promove a sobrevivência e proliferação dessa subpopulação, num processo independente de APC. Além disso, ativação de células Treg com LPS aumenta significativamente sua capacidade supressora, permitindo o controle eficiente de respostas de células CD4⁺ *in vitro* e *in vivo* (Caramalho *et al.*, 2003).

Estudos em humanos sugerem que TLR5 e TLR8 exercem papéis opostos no controle direto da função supressora de células Treg. A estimulação *in vitro* de células Treg CD4⁺CD25⁺ humanas com flagelina, um agonista de TLR5, não leva à proliferação das Treg, mas potencializa sua atividade supressora ao induzir um significativo aumento na expressão de Foxp3 (Crellin *et al.*, 2005). Em contrapartida, células Treg estimuladas *in vitro* por agonistas sintéticos ou naturais de TLR8 sofrem reversão de sua função reguladora, tornando-se incapazes de inibir a proliferação de células T virgens. Após transferência para hospedeiros Rag^{-/-}, células Treg ativadas via TLR8 foram incapazes de inibir a resposta citotóxica mediada por células T CD8⁺, favorecendo a imunidade anti-tumoral (Peng *et al.*, 2005).

A ativação de TLRs em APCs contribui para o controle indireto da atividade imunossupressora das células Treg CD4⁺CD25⁺. De maneira geral, a sinalização via TLR em APCs profissionais induz o aumento na expressão de moléculas co-estimuladoras e MHC, além da secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-6, o que potencializa a diferenciação do linfócito T para o fenótipo efetor e contribui para que células T efetoras já diferenciadas superem a influência inibidora das Treg (Reis e Souza, 2004). A ativação direta de DCs via TLR4 e TLR9 por LPS e CpG, respectivamente,

bloqueia o efeito supressor das Treg CD4⁺CD25⁺. Esse fenômeno requer a secreção da citocina IL-6, cuja produção por DCs ativadas é induzida após reconhecimento inato de produtos microbianos. Na presença de níveis aumentados de IL-6, células T não-reguladoras tornam-se refratárias à supressão dominante mediada por células Treg CD4⁺CD25⁺, permitindo a ativação da imunidade adaptativa anti-infecciosa (Pasare & Medzhitov, 2003).

1.1.6 Plasticidade Fenotípica das Células Treg

A diferenciação de células Treg adaptativas e de células Th17 são processos relacionados. O desenvolvimento de ambas as subpopulações de linfócitos T em resposta à estimulação antigênica requer a sinalização pela citocina TGF- β . Na presença de IL-6, o desenvolvimento de células Treg Foxp3⁺ é inibido e, em vez disso, TGF- β e IL-6 atuam em conjunto promovendo a diferenciação de células Th17 a partir de células T virgens (Korn *et al.*, 2009). Uma vez que células nTreg são capazes de produzir TGF- β , foi sugerido que elas influenciam o comprometimento periférico de precursores virgens ao fenótipo anti- (células Treg adaptativas) ou pró-inflamatório (células Th17) (Weaver *et al.*, 2006). A produção concomitante das citocinas TGF- β , IL-6 e IL-23 por DCs que fagocitaram células apoptóticas infectadas por microrganismos parece ser o estímulo fisiológico que promove a indução de células Th17. Ao contrário, a fagocitose de células não-infectadas induz a produção de TGF- β pela DC, com conseqüente diferenciação de células T virgens ao fenótipo Treg (Torchinsky *et al.*, 2009).

A exposição de células T CD4⁺ a TGF-β induz a expressão de RORγT (fator de transcrição que coordena o programa de diferenciação da linhagem Th17) e de Foxp3. Células T Foxp3⁺RORγT⁺ foram identificadas em camundongos e humanos e provavelmente representam um estágio transitente que posteriormente consolidará sua diferenciação para o fenótipo Treg ou Th17 (Zhou *et al.* 2008). Consistente com esses dados, células T Foxp3⁺ secretoras de IL-17 foram identificadas *in vitro* e *in vivo* (Voo *et al.*, 2009). Além disso, foi demonstrado que células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ podem se converter em células secretoras de IL-17 quando expostas a um microambiente de citocinas pró-inflamatórias (Osorio, *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2008). Um estudo recente demonstrou que a população CD4⁺CD25⁻Foxp3⁺ contém células Treg não comprometidas, que exibem uma expressão instável de Foxp3 e retêm o potencial de se diferenciarem em células T efetoras. Ao contrário, células T CD4⁺CD25^{high}Foxp3⁺ representam uma população comprometida à linhagem reguladora e que não exibe plasticidade de diferenciação (Komatsu *et al.*, 2009).

Portanto, o programa de diferenciação de células Treg parece ser instável e sensível a modificações por estímulos ambientais. A relevância biológica da plasticidade da linhagem Treg e da sua capacidade de se converter em células efetoras ainda não foi diretamente testada, mas acredita-se que esse fenômeno seja importante para o equilíbrio de respostas imunológicas protetoras nas barreiras mucosas (Zhou *et al.*, 2009).

1.2 Células T reguladoras na Tolerância à Transplantação

Os mecanismos envolvidos na tolerância à transplantação são objeto de estudo dos imunologistas há décadas. O progresso da pesquisa científica nessa área vem fornecendo evidências de que os mecanismos que participam da tolerância a órgãos e tecidos não-próprios são semelhantes àqueles utilizados pelo sistema imunológico para garantir a tolerância aos constituintes próprios. Neste âmbito, entender os mecanismos de tolerância periférica, tais como anergia, deleção e regulação, será de fundamental importância para o conhecimento das regras implicadas na tolerância/rejeição à transplantação.

As células T reguladoras (Treg) conquistam cada vez mais destaque nesta área, uma vez que sua participação como componente fundamental da indução e manutenção de tolerância periférica ao próprio (com conseqüente proteção contra autoimunidade) já foi extensivamente demonstrada em estudos experimentais e clínicos (Sakaguchi *et al.*, 2008). Um número crescente de publicações tem evidenciado que as células Treg desempenham um importante papel na supressão de respostas imunológicas dirigidas contra aloantígenos expressos por tecidos e órgãos transplantados, apesar dos mecanismos utilizados para este fim serem ainda obscuros e alvo de intensa investigação (Wood & Sakaguchi, 2003; Sakaguchi, 2005; Roncarolo & Battaglia, 2007).

Em animais adultos, a tolerância a aloantígenos geralmente é alcançada por meio de tratamentos com anticorpos bloqueadores (que inibem a ativação dos linfócitos T) e drogas imunossupressoras. Estudos pioneiros de Waldmann e cols. demonstraram o alcance da terapia em curto

prazo com anticorpos anti-CD4 e anti-CD8 e, posteriormente, com anticorpos dirigidos contra moléculas co-estimuladoras (CD28, CD40L), moléculas de adesão (LFA-1, ICAM-1) e complexo TCR (CD3), na indução de tolerância periférica dominante a aloenxertos (Waldmann & Cobbold, 1998). Esses anticorpos, administrados simultaneamente com o estímulo alogênico, foram eficientes na indução pós-tímica de células T reguladoras, capazes de inibir especificamente a ativação dos linfócitos T alorreativos (Graca *et al.*, 2004). Portanto, a tolerância a transplantes induzida por administração de anticorpos bloqueadores baseia-se predominantemente no desenvolvimento periférico de células Treg com especificidade para o aloantígeno. Alguns estudos já descreveram que sinalização subótima favorece a diferenciação de células T anérgicas e reguladoras na periferia, reforçando a idéia de que células Treg, inclusive alo-específicas, podem ser geradas num contexto imunológico de estimulação antigênica insuficiente proporcionada por estas estratégias de indução de tolerância (Waldmann *et al.*, 2006).

Os experimentos de indução de tolerância pela administração de anticorpos bloqueadores trouxeram à tona não só a importância das células Treg neste contexto, mas também o seu papel na manutenção de tolerância operacional (não responsividade antígeno-específica que é sustentada na ausência de terapia imunossupressora) e nos processos de supressão associativa e tolerância infecciosa. A tolerância assim induzida é tão vigorosa que persiste mesmo após a transferência adotiva de linfócitos virgens de doadores não tolerantes. Essa resistência é uma característica proeminente de células Treg e um resultado da atividade reguladora dominante intrínseca dessa população. Além da tolerância adquirida não ser

perturbada pela adição de novas células T virgens potencialmente alorreativas, as células Treg dos animais tolerantes são capazes de tornar estas novas células tolerantes ao aloantígeno e também convertê-las ao perfil regulador, num processo denominado tolerância infecciosa (Qin *et al.*, 1993). Neste modelo foi ainda demonstrado que é possível estender o estado de tolerância a antígenos não-relacionados quando esses são apresentados em forma associada com os antígenos tolerados, num processo conhecido como supressão associativa (*linked suppression*) (Davies *et al.*, 1996). Essas células Treg são aloantígeno-específicas, uma vez que não impedem a rejeição de aloantígenos não relacionados, desde que tais antígenos não sejam expressos de forma associativa com os antígenos tolerados (Graca *et al.*, 2004). Portanto, tolerância infecciosa e supressão associativa (mecanismo pelo qual a tolerância é expandida para antígenos não relacionados quando estes são apresentados em associação com os antígenos tolerados, no mesmo transplante) são manifestações da atividade reguladora *in vivo*.

A dificuldade na indução de alo-tolerância na idade adulta contrasta com a especial facilidade para a promoção da tolerância a tecidos e órgãos alogênicos em fases mais precoces do desenvolvimento animal, como os períodos embrionário e neonatal. As experiências pioneiras, que revelaram que o período neonatal é especialmente propenso à indução de tolerância, datam da década de 1950 (Billingham *et al.*, 1953). Apesar de seus resultados continuarem válidos, e de outros trabalhos terem confirmado que a fase embrionária/neonatal é especialmente propícia para a indução de tolerância a aloantígenos, os mecanismos que participam da indução e manutenção dessa tolerância ainda não são claramente compreendidos.

1.3 Tolerância x Imunidade na Idade Neonatal

A fase inicial da ontogenia do sistema imunológico parece particularmente importante para o estabelecimento da tolerância natural aos constituintes próprios. Este processo inicia-se durante a vida embrionária e perinatal e é guiado pelos antígenos expressos pelo organismo durante esses estágios do desenvolvimento animal. Uma vez gerada nesse período, a auto-tolerância deve ser ampliada/direcionada a todos os tecidos do corpo e mantida ao longo de toda a vida do animal, evitando assim o desencadeamento de doenças auto-imunes.

O sistema imunológico de indivíduos neonatos é tradicionalmente considerado imaturo. Em camundongos, a idade neonatal é definida experimentalmente como o intervalo entre o 1º e o 10º dia pós-natal (P1-P10); em humanos, a idade neonatal se prolonga do nascimento até o 28º dia de vida (Adkins, Leclerc & Marshall-Clarke, 2004). Indivíduos nessa idade, em geral, exibem respostas imunológicas ineficientes frente a estímulos antigênicos, com menor ativação e diferenciação de células citotóxicas e produção de anticorpos (Garcia *et al.*, 2000).

Experiências pioneiras, lideradas pelo zoologista Peter Medawar ao longo da década de 1950, demonstraram que os períodos embrionário e neonatal são fases do desenvolvimento animal especialmente favoráveis ao estabelecimento da tolerância a aloantígenos (Billingham *et al.*, 1953).

Em seus estudos, Medawar e cols. (Billingham & Brent, 1959) utilizaram camundongos eutímicos neonatos (≤ 24 h de vida) como hospedeiros de suspensões celulares de origem hematopoiética (células esplênicas ou células de medula óssea), injetadas por via endovenosa,

obtidas de doadores semi-alogênicos adultos a fim de induzir tolerância aos tecidos do doador. Os animais assim inoculados tornavam-se quimeras mistas e, quando desafiados 6 a 8 semanas depois (isto é, já na fase adulta) com enxertos de pele da mesma origem genética que a do doador, eram capazes de tolerar o tecido transplantado por longos períodos. Esse protocolo foi responsável por induzir tolerância específica a enxertos de pele da outra linhagem parental, sem comprometer a habilidade do animal em rejeitar enxertos de doadores não relacionados, uma vez que enxertos de pele de doadores não-relacionados eram rejeitados com a cinética esperada, evidenciando a aquisição de tolerância específica. Animais adultos que não haviam sido inoculados com a população hematopoiética semi-alogênica durante o período neonatal rejeitavam o enxerto de pele alogênica. Consistente com esses dados, a transferência de células hematopoiéticas semi-alogênicas para hospedeiros adultos não era capaz de induzir tolerância aos aloantígenos – os animais eram imunizados em vez de tolerizados.

A partir dessas experiências a idade neonatal passou a ser considerada uma fase do desenvolvimento na qual o estabelecimento da tolerância a aloantígenos é facilitado. A exposição de um animal a células expressando aloantígenos nessa estreita janela de tempo após o nascimento possibilita o desenvolvimento de tolerância específica e duradoura (em vez de imunidade) aos tecidos do doador geneticamente diferente. Na idade adulta, o hospedeiro tolerante é imunocompetente e capaz de rejeitar tecidos alogênicos não geneticamente relacionados com o estímulo que induziu sua tolerização.

Os estudos de Medawar, no entanto, não esclareceram os mecanismos responsáveis pela indução e manutenção da alo-tolerância estabelecida durante o período neonatal. De acordo com sua hipótese, o sistema imunológico interpretaria como próprios todos os antígenos presentes durante a fase de desenvolvimento que corresponde aos períodos embrionário e neonatal, independente da sua origem real (autóloga ou alogênica). A exposição do sistema imunológico em desenvolvimento (dos indivíduos de idade embrionária/neonatal) a antígenos não-próprios permitiria sua assimilação aos componentes próprios na vida adulta. Isto explicaria, portanto, a geração de tolerância a tecidos derivados de indivíduos geneticamente idênticos aos doadores das células hematopoiéticas semi-alogênicas utilizadas na indução da tolerância na idade neonatal.

No final da década de 1980, estudos realizados com aves foram importantes para esclarecer algumas das questões relacionadas à indução de tolerância a tecidos histo-incompatíveis nas fases iniciais do desenvolvimento (Coutinho, 2005). Através de experimentos em que rudimentos tímicos alogênicos não colonizados por progenitores hematopoiéticos foram enxertados em aves embrionárias, Le Douarin e colaboradores demonstraram que o timo tem potencial tolerogênico não-delecional no embrião e, como consequência, os hospedeiros se tornam tolerantes a enxertos de tecidos do mesmo doador na idade adulta (Ohki *et al.*, 1988; Le Douarin *et al.*, 1996). Posteriormente, o grupo investigou a participação do epitélio tímico na indução de tolerância a aloantígenos em mamíferos, utilizando camundongos atímicos como modelo de estudo (Modigliani, Thomas-Vaslin *et al.*, 1995; Modigliani, Pereira *et al.*, 1995;

Modigliani, Coutinho *et al.*, 1996). Com esses estudos, este grupo elucidou o papel do epitélio tímico no processo de tolerância periférica ao próprio, sendo um dos primeiros a sugerir a existência de células T originadas intratimicamente (através de seleção pelas células epiteliais tímicas) destinadas a suprimirem respostas de outros clones de células T (autorreativos ou alorreativos, no caso de experimentos com aloantígenos) (Modigliani, Bandeira *et al.*, 1996).

Sakaguchi e colaboradores realizaram experimentos de timectomia neonatal em camundongos de 3 dias de idade e revelaram que estes animais são acometidos por síndromes autoimunes graves na idade adulta, fornecendo evidências de que alguma população celular exportada do timo naquela fase poderia ser responsável por controlar as respostas de clones autorreativos (Asano *et al.*, 1996). Se esses animais fossem inoculados com células esplênicas totais de animais singênicos normais, ou com populações enriquecidas em células CD25⁺ (Suri-Payer *et al.*, 1998), a autoimunidade era revertida.

Em estudos mais recentes foi descrito que a tolerância neonatal induzida através do protocolo clássico estabelecido por Medawar envolve a participação de células Treg CD4⁺CD25⁺ (Field *et al.*, 1997; Gao *et al.*, 1999). Os autores verificaram que esta subpopulação estava presente em frequência aumentada no animal tolerante, sendo essencial para inibir a atividade de células T CD8⁺ alorreativas e transferir a tolerância para animais virgens (Field *et al.*, 2001). Com estes trabalhos, entretanto, não foi possível averiguar se a geração das células Treg capazes de inibir a alorreatividade ocorria intra-timicamente, por entrada das células semi-alogênicas do doador no timo do neonato e interferência no processo de

seleção de linfócitos T, ou se as células Treg poderiam ser geradas também no compartimento periférico.

Entretanto, a noção de que a idade neonatal é intrinsecamente tolerogênica tem sido desafiada por uma série de estudos. Diversos trabalhos demonstraram que linfócitos de indivíduos neonatos são capazes de montar respostas imunológicas adaptativas maduras desde que condições apropriadas de estimulação sejam propiciadas.

Ao reexaminar os experimentos clássicos de indução de tolerância neonatal de Medawar, Ridge e cols. demonstraram que esta não é uma propriedade intrínseca do sistema imunológico do recém-nascido (Ridge *et al.*, 1996). A transferência de suspensões celulares enriquecidas em células dendríticas (em vez da população de células hematopoiéticas/esplênicas totais) para camundongos neonatos induz imunidade, em vez de tolerância. Segundo os autores, a tolerância neonatal experimental seria consequência da baixa frequência de APCs profissionais (como DCs) presentes no inóculo usado para indução da tolerância (células esplênicas ou de medula óssea). Com isso, os linfócitos T virgens (presentes em pequena quantidade no hospedeiro neonato) interagiriam predominantemente com células incapazes de propiciar uma co-estimulação eficiente, tornando-se assim tolerantes.

Os efeitos distintos resultantes da exposição de indivíduos neonatos (tolerância) e adultos (imunidade) a células alogênicas seriam, então, decorrentes das disparidades de doses administradas nos dois períodos. De forma consistente com essa visão, fêmeas murinas adultas injetadas com altas doses ($100-1000 \times 10^6$) de células esplênicas de doadores singênicos machos tornaram-se tolerantes ao antígeno menor de histocompatibilidade

H-Y. Portanto, a exposição de indivíduos neonatos e adultos a altas doses de antígeno resulta em tolerância específica; a tolerância no período neonatal seria facilitada pela baixa quantidade de células T do hospedeiro inerente a esta fase.

Mais recentemente, foi demonstrado que camundongos neonatos inoculados com baixas doses (10 vezes menores que as doses utilizadas nos experimentos de Medawar) de células esplênicas alogênicas ou semi-alogênicas de doadores adultos são competentes para adquirir imunidade alo-específica, caracterizada pelo desenvolvimento de resposta citotóxica madura que leva à eliminação das células transferidas (Adkins, Jones *et al.*, 2004).

Camundongos adultos infectados durante a vida neonatal com baixas doses de vírus da leucemia murina são capazes de desenvolver respostas citotóxicas protetoras, associadas à diferenciação de células Th1 secretoras de IFN- γ . Em contrapartida, camundongos neonatos expostos a altas doses do mesmo vírus desenvolvem preferencialmente uma resposta do tipo Th2 e mostram-se incapazes de montar uma resposta citotóxica anti-viral eficiente quando adultos (Sarzotti *et al.*, 1996). Esses resultados revelam que a dose do antígeno à qual o sistema imunológico do recém-nascido é exposto determina o desenvolvimento de respostas Th1 x Th2, sendo crucial para a geração de imunidade protetora nessa idade.

Em suporte a essa idéia, Forsthuber e cols. demonstraram que camundongos neonatos imunizados com proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund desenvolvem respostas do tipo Th2, enquanto que a imunização com a mesma proteína utilizando adjuvante completo de Freund resulta na geração de resposta Th1 semelhante à de

um animal adulto (Forsthuber *et al.*, 1996). Portanto, indivíduos neonatos são imunocompetentes e podem gerar respostas de células CD4 do tipo Th1 e Th2, dependendo do modo de imunização.

O sistema imunológico do neonato é capaz de gerar respostas imunológicas eficientes, embora a natureza e a quantidade dos estímulos necessários sejam diferentes dos requeridos para indivíduos adultos. Se o indivíduo neonato é competente para desenvolver imunidade protetora, associada à diferenciação de células de memória, como a tolerância a aloantígenos é mais facilmente estabelecida nesse período?

Tendo em vista a importância das células Treg para a indução de alo-tolerância, é possível que a geração periférica de células Treg seja facilitada por algumas características do neonato, tais como: (i) a imaturidade das células linfóides do hospedeiro, que não seriam capazes de responder às células alogênicas; (ii) diferenças na constituição do microambiente tímico e/ou periférico em relação a animais adultos; (iii) as condições linfopênicas, que induziriam intensa proliferação das primeiras células recém-emigradas do timo, em contato com as células (semi-)alogênicas transferidas para os hospedeiros neonatos; ou (iv) ao fato da população respondedora presente no compartimento pós-tímico do hospedeiro ser constituída predominantemente por células RTE, que possuem uma maior propensão à aquisição de tolerância. Algumas dessas características, possivelmente implicadas em propiciar a maior facilidade de indução de tolerância na idade neonatal serão abordadas em maior detalhe a seguir.

1.3.1 Estado linfopênico natural do indivíduo neonato

A idade neonatal é conhecida como um estágio de linfopenia natural. Os números de linfócitos em camundongos neonatos só atingem aqueles observados em adultos por volta de P7 nos linfonodos e P15 no baço (Garcia *et al.*, 2000). As primeiras células recém-emigradas do timo (*recent thymic emigrants, RTEs*), então, encontram um ambiente propício à intensa expansão no compartimento periférico linfopênico do indivíduo neonato (Le Champion *et al.*, 2002; Min *et al.*, 2003). Esta proliferação acentuada dos primeiros linfócitos recém-emigrados do timo no indivíduo neonato é atribuída à disponibilidade de nichos no compartimento linfóide periférico.

As células T devem competir entre si, no compartimento periférico, por sinais e interações que promovam sua sobrevivência ou sua ativação e manutenção após contato com o antígeno (Min & Paul, 2005). Linfócitos T de especificidade antigênica idêntica ou relacionada competem pelas mesmas citocinas e por interações com os mesmos complexos MHC próprio:peptídeo próprio expressos na superfície de APCs (Troy & Shen, 2003; Moses *et al.*, 2003).

A proliferação sofrida por RTEs no compartimento periférico linfopênico neonatal é um exemplo da denominada proliferação induzida por linfopenia (*lymphopeny induced proliferation, LIP*) (Min *et al.*, 2003), mais recentemente chamada de proliferação endógena. Este processo é mediado por interações TCR-MHC:peptídeo próprio, moléculas co-estimuladoras e é regulado pelo tamanho da população periférica de linfócitos (Min *et al.*, 2005). As células que sofrem LIP proliferam rapidamente e, à medida que o compartimento periférico vai sendo preenchido, os recursos necessários à

sobrevivência linfocitária vão se tornando menos abundantes e a LIP é então inibida.

Uma importante consequência da LIP é a aquisição de fenótipo e função de célula ativada/efetora pelo linfócito T. As células T que sofreram LIP têm um aumento acentuado na expressão de CD44 e adquirem a capacidade de secretar grandes quantidades de IFN- γ (Min & Paul, 2005). Estudos recentes sugerem que a proliferação endógena na vida neonatal é importante para a geração de um repertório diverso de células tipo-memória (*memory-like*) que seriam essenciais para o desenvolvimento de respostas imunológicas contra patógenos durante essa fase da vida. Além disso, o repertório periférico de clones resultantes da proliferação endógena poderia ser responsável por modular a entrada e a persistência periférica de novos clones vindos do timo, dessa forma contribuindo para a composição/diversidade do compartimento periférico de células T (Arnold *et al.*, 2005).

Como o ambiente neonatal é naturalmente linfopênico, seria esperado que a maior parte das primeiras células recém-emigradas do timo sofresse LIP ao ingressar no compartimento periférico. Entretanto, apenas uma minoria das RTEs nos camundongos neonatos sofre LIP, adquirindo capacidade de secretar IFN- γ . O principal mecanismo envolvido na regulação dessa proliferação dos primeiros linfócitos que colonizam o compartimento linfóide periférico de camundongos neonatos parece ser decorrente da atividade das células Treg naturais (Almeida *et al.*, 2005). Este tipo de regulação periférica torna-se necessário porque uma proliferação desregulada dos clones recém-emigrados poderia ocasionar episódios de autoimunidade.

Além disso, é possível que os linfócitos auto/alorreativos que são exportados do timo antes da primeira onda de células reguladoras possam se diferenciar, durante a expansão no compartimento linfopênico neonatal, no fenótipo CD25⁺Foxp3⁺, com conseqüente aquisição de capacidade supressora. Alguns estudos já evidenciaram que células T virgens CD4⁺CD25⁻ sofrem conversão ao fenótipo regulador quando expandem em ambiente linfopênico (Curotto de Lafaille *et al.*, 2004). As células Treg incluídas nas primeiras ondas de emigração tímica podem expandir no ambiente neonatal por interações com complexos MHC:peptídeo próprio e, assim, inibirem a proliferação dos clones recém-emigrados (evitando autoimunidade) e educando novas células T CD25⁻ a expressarem o fenótipo regulador. Essas primeiras Tregs poderiam ser importantes para moldar o repertório de células T que estará presente no compartimento linfóide periférico do animal por toda vida, além de participar da geração de tolerância periférica.

1.3.2 Predomínio em Células Recém-emigradas do Timo

Ao longo da vida neonatal, os números de linfócitos T maduros aumentam gradualmente nos órgãos linfóides periféricos, devido à constante exportação tímica. Embora a taxa de exportação de linfócitos maduros pelo timo seja semelhante entre camundongos neonatos e adultos (Scollay *et al.*, 1980), no sétimo dia após o nascimento os números de células T no baço e linfonodos dos recém-nascidos ainda são baixos. Como conseqüência, durante a vida perinatal o compartimento periférico do

animal é predominantemente colonizado por células recém-emigradas do timo (RTEs) (Hale *et al.*, 2006; Opiela *et al.*, 2009).

Apesar do predomínio de células RTEs nos órgãos linfóides periféricos de animais recém-nascidos, pouco é conhecido sobre as características fenotípicas e funcionais das RTEs neonatais. A maior parte dos estudos analisa as RTEs de indivíduos adultos e, ainda assim, a biologia das RTEs adultas é mal compreendida.

Utilizando a técnica de injeção intra-tímica de FITC (isotiocianato de fluoresceína), foi demonstrado que as RTEs adultas (tanto CD4⁺ quanto CD8⁺) são fenotipicamente maduras e funcionalmente competentes cerca de 16 horas após sua saída do timo (Scollay, 1982; Scollay *et al.*, 1984). Este resultado contrasta com alguns estudos antigos, que propunham que as RTEs deixavam o timo em um estado imaturo e completavam seu desenvolvimento nos tecidos linfóides periféricos (Stutman, 1978).

De fato, as RTEs adultas passam por um estágio adicional de maturação após deixarem o timo (Boursalian *et al.*, 2004). Ao comparar o padrão de expressão de diversas moléculas de superfície entre timócitos, RTEs e células T virgens maduras, foi observado que as RTEs de camundongos adultos jovens sofrem modificações fenotípicas e funcionais após ingressarem no compartimento linfóide periférico, adquirindo gradualmente propriedades de células T virgens maduras. Células RTE CD4⁺ e CD8⁺ estimuladas *in vitro* por anti-CD3 e anti-CD28 possuem defeitos funcionais, tais como menor proliferação e diferenciação para fenótipo efetor. Nas condições de ativação *in vitro*, as RTEs CD4⁺ expressam menor densidade de CD25 e secretam menor concentração de IL-2 quando comparadas com células T CD4⁺ virgens maduras.

Mais recentemente, foi descrito que RTEs de camundongos adultos jovens e idosos diferem fenotípica e funcionalmente (Clise-Dwyer et al., 2007). As RTEs de animais jovens expressam um fenótipo semelhante ao de células T CD4⁺ virgens maduras (CD44^{low}CD62L^{high}) e ambas as populações são responsivas à estimulação antigênica, com aumentos na proliferação celular e secreção de IL-2. Em comparação, uma significativa fração das RTEs de animais idosos exibe o fenótipo CD44^{high}CD62L^{low}, característico de células ativadas ou de memória. As RTEs, assim como as células T CD4⁺ virgens oriundas de camundongos idosos, foram hiporresponsivas à estimulação antigênica *in vitro*. Esses defeitos na resposta à estimulação antigênica observados nas RTEs CD4⁺ de animais idosos foram antígeno-inespecíficos e recuperados com a adição da citocina IL-2 à cultura, demonstrando que fatores ambientais podem contribuir para o comportamento das RTEs. Essas dificuldades de ativação exibidas por células RTEs poderiam contribuir para sua maior propensão à aquisição de fenótipo regulador no ambiente pós-tímico.

Um estudo recente foi decisivo na caracterização das células RTE murinas neonatais, comparando-as fenotípica e funcionalmente com células RTE adultas (Opiela et al., 2009). As células CD4⁺ RTE isoladas dos linfonodos de camundongos neonatos expressam níveis maiores de CD24, CD3 e CD28 e menores de TCR $\alpha\beta$ e Qa2 quando comparadas às células RTE adultas. As células RTE neonatais são mais eficientes do que as RTE adultas na produção de citocinas Th1 e Th2 (IFN- γ e IL-4, respectivamente) após ativação *in vitro*. Entretanto, os níveis de citocinas Th1/Th2 produzidos por células RTE (de ambas as idades) nessas condições são significativamente mais baixos que aqueles sintetizados por linfócitos T CD4⁺ residentes, a

menos que APCs profissionais sejam adicionadas à cultura. Além disso, células RTE neonatais produzem mais IL-2 quando comparadas com RTEs adultas ou células T CD4⁺ com maior tempo de colonização periférica. Na ausência de estimulação via TCR, apenas as células RTE de neonatos são capazes de proliferar em resposta a IL-7, o que pode favorecer a expansão homeostática sofrida pelas RTEs no compartimento periférico naturalmente linfopênico do neonato.

Coletivamente, esses dados demonstram que as células RTE neonatais e adultas são fenotípica e funcionalmente distintas e que a magnitude das respostas efectoras desenvolvidas por RTEs de diferentes idades depende das condições de estimulação. De maneira importante, a responsividade à IL-7, uma citocina abundante na fase neonatal, e a produção de IL-2 por células RTEs neonatais podem contribuir para sua diferenciação periférica ao fenótipo Treg após proliferação no ambiente linfopênico do recém-nascido.

1.3.3 Repertório de Linfócitos T

O repertório neonatal de células T é diferente daquele de indivíduos adultos, devido à não deleção de alguns clones autorreativos e ao padrão de expressão da enzima TdT (*terminal-deoxynucleotidyl-transferase*), responsável pela adição de nucleotídeos N aos TCRs de linfócitos em desenvolvimento (Adkins *et al.*, 2007). Como a expressão dessa enzima só alcança níveis equivalentes aos de animais adultos em camundongos de idade P4, os linfócitos que deixam o timo nas primeiras ondas de emigração tendem a ser multirreativos (devido à ausência de inserção de nucleotídeos

N) (Garcia *et al.*, 2000). Esta multirreatividade poderia desencadear respostas autoimunológicas se não fosse contida por mecanismos periféricos de regulação.

Apesar da multirreatividade favorecer a ocorrência de autoimunidade, é possível que ela também influencie a aquisição de tolerância periférica aos auto/alóantígenos. Células Treg naturais multirreativas, que deixam o timo de camundongos nos primeiros dias após o nascimento, e que chegam ao compartimento periférico nas primeiras ondas de emigrantes tímicos, podem contribuir para o controle inibitório de clones auto/alorreativos, ou mesmo para sua conversão periférica ao fenótipo regulador, evitando assim o desencadeamento de auto-imunidade e, alternativamente, promovendo tolerância a aloantígenos.

1.3.4 Composição de Células Apresentadoras de Antígeno

Além do repertório peculiar de linfócitos T, outras características do ambiente neonatal podem influenciar na sua propensão à aquisição de auto/aló-tolerância. Uma das características particulares da idade neonatal é a sua composição de APCs profissionais (DCs, células B e macrófagos) (Adkins, Leclerc *et al.*, 2004). Diversos estudos demonstraram que as APCs de camundongos neonatos são funcionalmente imaturas e estão presentes em frequências alteradas em relação a animais adultos (Muthukkumar *et al.*, 2000).

O número absoluto de DCs é muito menor em camundongos neonatos do que em adultos. Ao nascimento, apenas 0,2% das células esplênicas murinas são DCs. A proporção de DCs no baço aumenta para

2,5% 5-6 semanas após o nascimento, o que é acompanhado por mudanças em fenótipo e função (Willems *et al.*, 2009). Uma vez que as DCs são a principal subpopulação de APCs responsável por modular a ativação de linfócitos T, conhecer suas propriedades no animal neonato pode ser essencial para compreender os mecanismos de geração de tolerância.

Alguns estudos revelaram que DCs neonatais expressam baixos níveis de moléculas co-estimuladoras, MHC de classe II e citocinas pró-inflamatórias como IL-12 (importante para a polarização Th1) e, assim, têm capacidade limitada de induzir a ativação e proliferação de células T antígeno-específicas (Tarbell *et al.*, 2006). Já foi descrito que a apresentação do antígeno em condições subótimas é tolerogênica em vez de imunogênica (Graca *et al.*, 2005). Neste contexto, é possível que as DCs no ambiente neonatal, na ausência de sinais inflamatórios, favoreçam a diferenciação dos linfócitos T para o perfil anérgico/supressor em vez de efetor, o que poderia contribuir para explicar a aquisição de tolerância nessa idade.

As interações entre células B e T dependem da micro-arquitetura dos tecidos linfóides periféricos. É necessário que três estruturas estejam devidamente formadas para que a cooperação B-T seja bem-sucedida: folículos linfóides, redes de células foliculares dendríticas e centros germinativos (Adkins, Leclerc *et al.*, 2004). Em camundongos neonatos, essas estruturas ainda não estão completa e funcionalmente desenvolvidas, de forma que a ativação de linfócitos T por células B é deficitária. Portanto, esta condição neonatal não favorece a aquisição do fenótipo efetor pelas células T durante esse estágio do desenvolvimento.

1.3.5 Padrão de migração e recirculação linfocitária

Uma outra característica importante do ambiente neonatal é sua permissividade à recirculação dos linfócitos entre órgãos linfóides e não-linfóides (Alferink *et al.*, 1998). Enquanto em animais adultos a migração de células T para os tecidos periféricos não-linfóides é observada apenas em condições inflamatórias e após ativação imunológica, em camundongos e ratos neonatos existe um amplo tráfego de linfócitos T virgens para tecidos extra-linfóides.

A interação dos primeiros linfócitos que colonizam a periferia com os antígenos de tecidos não-linfóides parece ser importante para o estabelecimento da tolerância ao próprio e, provavelmente, para a manutenção desta condição ao longo de toda a vida (Arnold *et al.*, 2005). O mecanismo envolvido nessa aquisição de tolerância ainda é pouco compreendido, mas foi sugerido que células Treg, em especial CD8⁺, podem participar desse processo, impedindo a reversão da tolerância por novas células T emigrantes do timo potencialmente autorreativas (Reibke *et al.*, 2006). Além disso, algumas evidências indicam que a apresentação antigênica por APCs não profissionais (como as encontradas em tecidos não-linfóides), em condições não inflamatórias, resulta no estabelecimento de tolerância em vez de imunidade (Limmer *et al.*, 2000).

Portanto, diversas características parecem possibilitar a indução de tolerância no período neonatal. Diversos fatores, como número e estado funcional de APCs, citocinas secretadas e interações celulares (como Treg-DCs, por exemplo), parecem influenciar no processo de tolerância neonatal. Mesmo muitos anos depois dos estudos pioneiros de Medawar, os

mecanismos envolvidos na indução de tolerância natural não são ainda completamente compreendidos.

1.4 Justificativa do trabalho

Nosso grupo tem se concentrado no estudo da tolerância à transplantação, enfocando especialmente protocolos que possibilitem analisar a geração ou expansão de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ capazes de inibir uma resposta alorreativa na ausência de tratamentos com drogas imunossupressoras. O protocolo de tolerância que estabelecemos recentemente (Fucs *et al.*, 2006), parece especialmente adequado para esse estudo, uma vez que não requer o uso de imunossupressores ou anticorpos bloqueadores, não exige populações altamente purificadas em CD25⁺ e funciona em ambiente não linfopênico, aproximando-se da situação fisiológica.

Nesse trabalho, foi demonstrado que células esplênicas de camundongos BALB/c adultos enriquecidas em células CD25⁺ adquirem tolerância periférica específica aos epítomos alogênicos quando transferidas para hospedeiros congênicos atímicos BALB/cnu/nu previamente reconstituídos com células de doadores F1(BALB/c X C57BL/6.Ba), conforme evidenciado pela persistência das células de F1 e pela aceitação de enxertos de pele de B6. É importante ressaltar que o reconhecimento associativo dos epítomos singênicos e alogênicos numa mesma APC foi essencial para o sucesso da indução de tolerância por esse protocolo.

No presente estudo, utilizamos o sistema descrito acima para verificar se populações naturalmente enriquecidas em células recém-

emigradas do timo, de diferentes origens e idades, podem adquirir tolerância periférica a aloantígenos sem o enriquecimento em células CD25⁺. Se conseguirmos definir as células envolvidas na interação tolerogênica e mimetizar as mesmas condições *in vitro*, poderemos contribuir para a busca de novas estratégias no controle da transplantação.

2. OBJETIVOS

GERAL

- Estudar a indução de tolerância a aloantígenos na ausência do timo e de protocolos imunossupressores, comparando populações de linfócitos T de diferentes idades e tempos de colonização periférica. Esse estudo poderá ajudar a compreender os mecanismos responsáveis pela tolerância neonatal e os mecanismos utilizados pelos linfócitos recém-emigrados do timo para a aquisição de tolerância natural a antígenos expressos apenas no compartimento periférico.

ESPECÍFICOS

- Verificar se populações linfóides naturalmente enriquecidas em células recém-emigradas do timo, de diferentes origens e idades, podem adquirir tolerância a antígenos alogênicos através da interação com células semi-alogênicas apenas no compartimento periférico;
- Investigar se subpopulações celulares presentes na população indutora de tolerância (APCs, células T) influenciam na geração de tolerância periférica aloantígeno-específica;
- Determinar a importância de células T reguladoras naturais CD4⁺CD25⁺ presentes na população respondedora para o desenvolvimento da tolerância periférica a aloantígenos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais

Camundongos eutímicos BALB/c (Thy-1.2⁺, H-2^d), C57BL/6.Ba (Thy-1.1⁺, H-2^b) (B6.Ba), F1(BALB/c x C57BL/6.Ba) (Thy1.2⁺/Thy1.1⁺, H-2^{d/b}), e CBA/J (H-2^k) são mantidos em biotério convencional (Núcleo de Animais de Laboratório - NAL, Universidade Federal Fluminense, RJ) e foram utilizados como doadores de suspensões celulares (exceto CBA/J) e de pele para testes de rejeição de enxerto [exceto F1(BALB/c x B6.Ba)]. Camundongos atímicos BALB/c nu/nu (H-2^d) e F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu (H-2^{d/b}) foram utilizados como hospedeiros de populações celulares transferidas e enxertos de pele. As colônias de camundongos nu/nu são criadas em biotério próprio, com pressão positiva e entrada de ar filtrado (Sterilflow-Filtracom), mantidas em gaiolas microisoladoras e recebem ração e água esterilizadas. O Comitê de Ética para Experimentação Animal da Universidade Federal Fluminense aprovou os protocolos experimentais utilizados neste estudo.

3.2 Preparo de suspensões celulares de órgãos linfóides

A obtenção dos órgãos linfóides de interesse e o processamento das respectivas suspensões celulares foram realizados com material estéril, em fluxo laminar. Células de baço, linfonodos e timo foram dissociadas em solução Hanks' (HBSS – Gibco, eBioscience), em placas de Petri, com o auxílio de peneiras plásticas. Células do lavado peritoneal são obtidas após injeção intra-peritoneal de 3 mL de PBS (phosphate-buffered saline); após

massagem abdominal, o lavado é recolhido e centrifugado. As suspensões celulares foram lavadas uma vez por centrifugação a 1200 rpm/6 min e os precipitados celulares ressuspensos em 1mL de solução de cloreto de amônio tamponado (tampão Ack de lise – NH₄Cl 8,29 g/L, KHCO₃ 1g/L, EDTA 37,2 mg/L) por 1 minuto para lise das hemácias. Após nova lavagem em Hanks', as células foram ressuspensas em PBS e o número de células viáveis foi contado em solução de Azul Tripán a 0,1%, em hematocitômetro. As concentrações celulares foram ajustadas de acordo com o protocolo realizado e estão indicadas nas legendas das figuras.

3.3 Depleção de células CD25⁺ por separação magnética (MACS)

Timócitos e esplenócitos de doadores BALB/c de idade neonatal (1 a 7 dias pós-natais, P1-P7) foram obtidos conforme descrito no item 3.2. A depleção de células CD25⁺ foi realizada com o auxílio do sistema MACS (Miltenyi Biotec) de separação magnética (coluna LD). Uma alíquota de cada suspensão foi reservada antes da depleção para análise por citometria de fluxo do percentual de células CD25⁺, como parâmetro para definir a pureza da população obtida após a passagem pela coluna magnética. As suspensões celulares foram ajustadas para a concentração de 10⁷ células/50µL PBS e incubadas com anticorpo anti-CD25 biotilado (clone PC61, eBioscience) durante 10 min a 4°C. Após duas lavagens em PBS (centrifugação a 1200 rpm/6 min), as suspensões foram ajustadas para a concentração de 10⁷ células/25µL PBS e incubadas com estreptavidina acoplada a bilhas magnéticas (Streptavidin-MicroBeads, Miltenyi Biotec) durante 10 min a 4°C. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes em

PBS e ressuspensas em PBS suplementado com 0,5% BSA e 2mM EDTA. As concentrações celulares foram, então, ajustadas para $2,5 \times 10^8$ células/mL e as células transferidas para a coluna magnética. O procedimento de depleção é conduzido de acordo com as instruções do fabricante. Ao término da depleção, a fração negativa recolhida foi lavada em PBS (por centrifugação a 1200 rpm/6 min) e a viabilidade celular determinada por meio da contagem em hematocitômetro, com o corante Azul Tripán. Cada suspensão celular foi ajustada para a concentração desejada e transferida para os hospedeiros dos respectivos grupos experimentais (ver item 3.4). O grau de pureza obtido, avaliado por citometria de fluxo, ultrapassou 95%.

3.4 Transferências de populações linfóides

As populações linfóides singênicas e semi-alogênicas, obtidas de baço e timo de doadores neonatos (P1-7) ou adultos (30-90 dias de idade), foram transferidas para camundongos atímicos BALB/c nu/nu ou F1 nu/nu de 20-30 dias de idade. Todas as suspensões celulares foram injetadas por via endovenosa, através do plexo retro-orbitário. O número de células injetadas em cada experimento está indicado na legenda das figuras.

3.5 Enxertos de pele

As peles das caudas de camundongos dos diferentes haplotipos (H-2^d, H-2^b, H-2^k) foram enxertadas no dorso de cada animal experimental e examinados três vezes por semana. O crescimento de pêlos e a integridade da pele no leito do enxerto foram considerados sinais de aceitação do

enxerto, enquanto a total ausência de pêlos e a presença de rupturas na pele enxertada foram utilizadas como evidências da rejeição do mesmo.

3.6 Caracterização fenotípica das populações celulares por imunofluorescência

O controle da expansão de cada população transferida foi realizado por imunofluorescência de amostras de sangue para os marcadores Thy1.1 [(mouse anti-rat CD90 (Thy-1.1), clone MRC OX-7, Serotec, FITC)] e Thy-1.2 [anti-mouse CD90.2 (Thy-1.2), clone 30-H12, eBioscience, PE] cerca de 1 mês após cada transferência. Em alguns experimentos, a presença de células CD4⁺, H-2Db⁺, H-2Kd⁺, CD25⁺ e Foxp3⁺ também foi avaliada em amostras de sangue e/ou de células esplênicas, de lavado peritoneal e de linfonodos, utilizando os anticorpos correspondentes do fabricante eBioscience (clones GK1.5, CTDb, SF1-1.1, PC61.5, e FJK-16s, respectivamente). As amostras de sangue foram obtidas através do plexo retro-orbital de camundongos anestesiados e coletadas em heparina. Após ressuspensão em PBS, as células sangüíneas foram submetidas à centrifugação (2000 rpm/ 20 min) em gradiente de Ficoll (Histopaque 1083, Sigma). A fração leucocitária foi então recolhida e lavada em PBS. Após centrifugação (2000 rpm/ 10 min), as células são utilizadas para a marcação. As amostras de células de órgãos linfóides foram obtidas como descrito no item 3.2. Antes de iniciar a marcação, as células foram incubadas com solução PBS-2%FCS-10% soro de camundongo de 5 a 10 minutos. Após esta etapa de bloqueio, os anticorpos diluídos em PBS-FACS (3% FCS) foram adicionados. Ao fim de 20-30 minutos de incubação, as

células foram lavadas uma vez em PBS-FACS (150 µL/poço), uma vez em PBS sem soro (150 µL/poço) e fixadas em solução PBS-1% Formaldeído.

A marcação com anticorpo anti-Foxp3 foi realizada com o kit da eBioscience (tampões de fixação e permeabilização), de acordo com as instruções do fabricante. As células previamente marcadas com os anticorpos para moléculas de superfície foram fixadas durante 30 minutos com o tampão FixPerm (100µL/poço) e, em seguida, lavadas com tampão PermBuffer (100µL/poço). Após esta lavagem, as células foram incubadas por 45 minutos a 4°C com o anticorpo anti-Foxp3PE diluído em tampão PermBuffer. Ao término da incubação com o anticorpo, as células foram lavadas duas vezes em tampão PermBuffer (centrifugação a 1200 rpm/6 min) e ressuspensas em 300 µL de PBS para leitura no citômetro. A leitura das marcações por imunofluorescência foi feita no citômetro de fluxo FACSCalibur – BD (Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, UFRJ), utilizando o programa Cell Quest. A análise dos dados foi realizada com auxílio dos programas WinMDI e CellQuest.

3.7 Avaliação da proliferação celular *in vivo* por diluição de CFSE

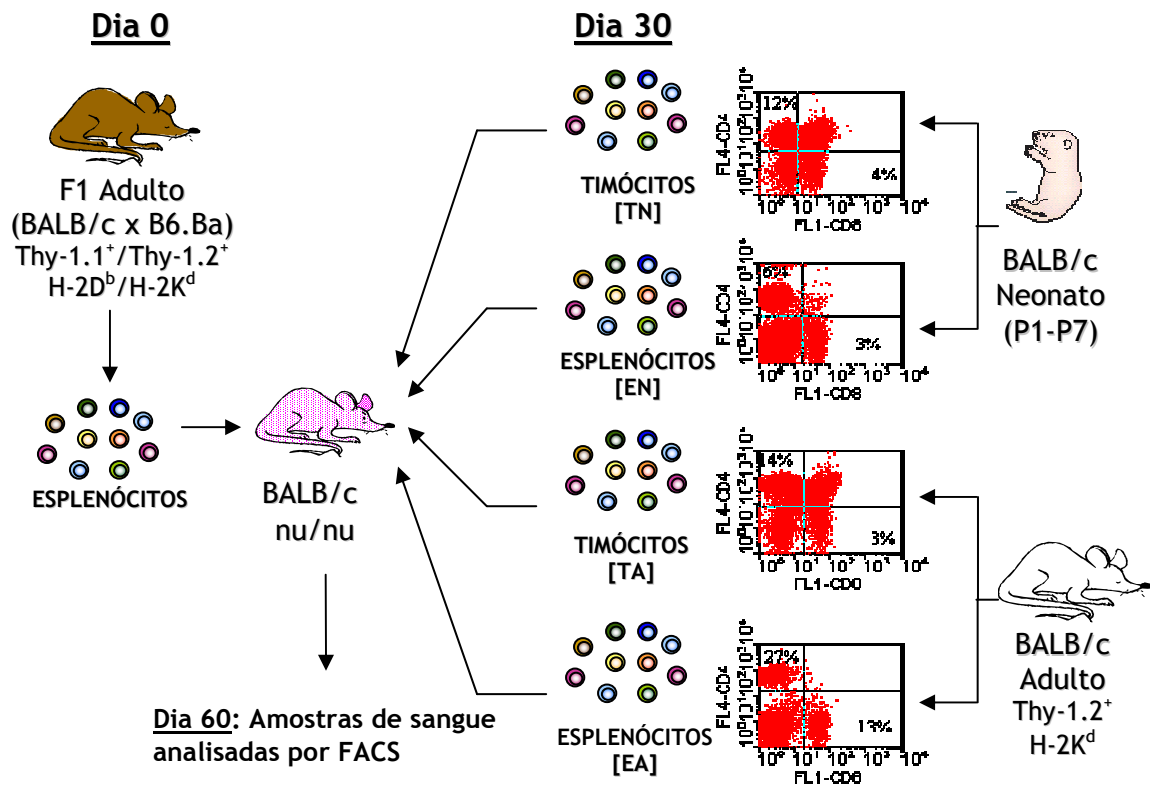
Suspensões de timócitos de animais neonatos (P5) e adultos (na concentração de 5×10^7 células/mL) foram marcadas com corante CFSE (*carboxy-fluorescein diacetate succinimidyl ester*), por incubação em solução de PBS contendo 5µM do reagente (CFDA SE dye, Invitrogen) por 10 min a 37°C. A marcação foi interrompida por adição de soro fetal bovino (FCS, Gibco) a 20% em PBS gelado, seguida de duas lavagens em PBS gelado suplementado com 10% FCS. Uma amostra das células recém-

marcadas foi reservada para análise do ponto 0 no citômetro de fluxo e as células foram transferidas para os hospedeiros conforme descrito no item 3.4. Os animais injetados foram sacrificados após 24, 96 ou 168 horas e as células de baço marcadas com anticorpo anti-Thy-1.2 PE para análise por citometria de fluxo quanto à marcação em FL1 e quanto à dupla-marcação FL1/FL2.

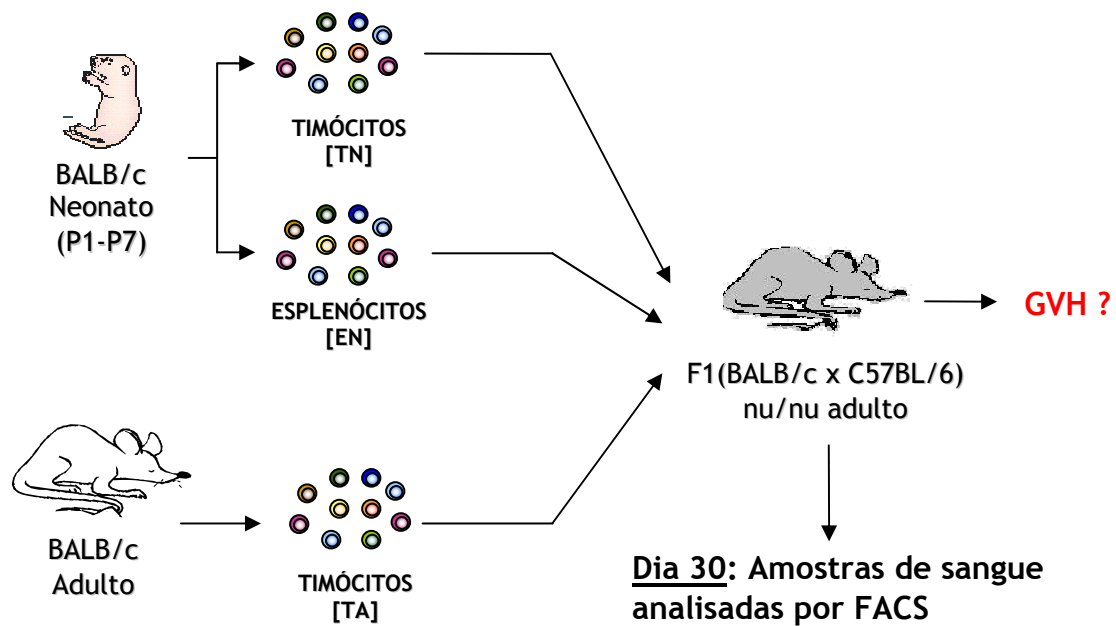
3.8 Análise da taxa de mortalidade por doença enxerto-versus-hospedeiro (GvHD)

Em experimentos envolvendo a transferência de populações linfóides de doadores BALB/c de diferentes idades para camundongos atímicos F1 nu/nu o aparecimento de sinais de caquexia (redução progressiva do peso corporal, postura encurvada, dermatite, dificuldade de locomoção e diarreia crônica), freqüentemente conduzindo à morte do hospedeiro em três a cinco semanas, foram considerados manifestações clínicas decorrentes do desenvolvimento de GvHD e, portanto, indicação de ausência de tolerância.

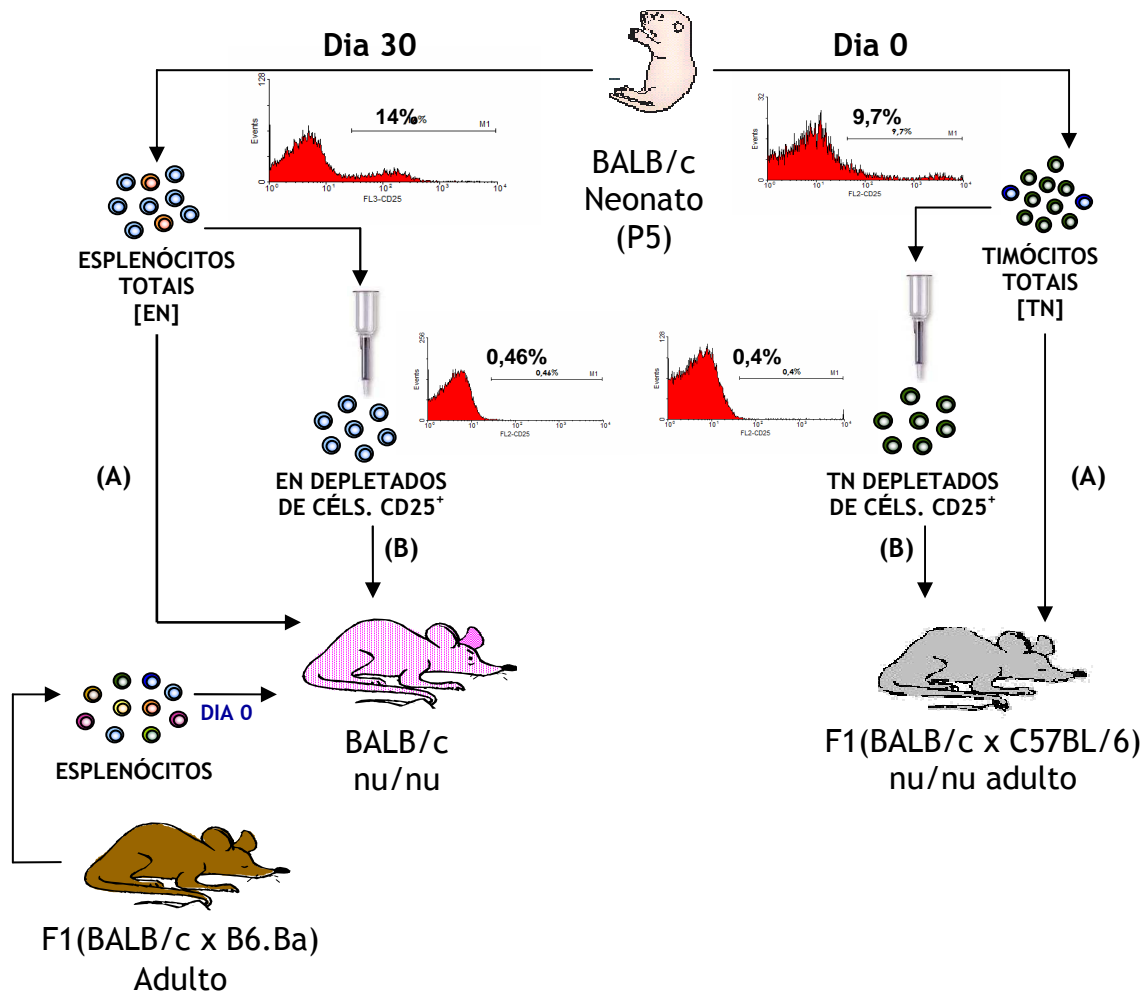
3.9 Protocolos Experimentais



Protocolo Experimental 1: Suspensões celulares obtidas de doadores eutímicos F1(BALB/c x B6.Ba) de idade adulta foram transferidas para hospedeiros atímicos BALB/c nu/nu adultos em inóculos contendo 30×10^6 de células por animal. Após 30 dias de colonização periférica, a expansão das células Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ foi confirmada e os camundongos devidamente reconstituídos (F1→BALB/cnu/nu) foram utilizados como hospedeiros de inóculos contendo $15-20 \times 10^6$ de células das seguintes populações linfóides obtidas de doadores BALB/c-Thy-1.2⁺ de diferentes idades: **[TN]** timócitos de neonatos; **[EN]** esplenócitos de neonatos; **[TA]** timócitos de adultos e **[EA]** esplenócitos de adultos. Os gráficos de imunofluorescência indicam a porcentagem de células simples-positivas CD4⁺ e CD8⁺ e de duplo-positivas CD4⁺CD8⁺ encontrada em cada população linfóide BALB/c transferida. Trinta dias após a transferência das células de BALB/c, o sangue dos animais experimentais foi analisado por imunofluorescência quanto à presença dos marcadores Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ ou H-2K^d/H-2D^b. Alguns animais foram submetidos à eutanásia para análise de populações linfóides em órgãos periféricos (baço, linfonodos) e lavado peritoneal.



Protocolo Experimental 2: Camundongos eutímicos BALB/c de idade neonatal (P1-P7) foram utilizados como doadores de timócitos ou esplenócitos; camundongos BALB/c de idade adulta foram utilizados como doadores de timócitos. As suspensões celulares obtidas desses animais foram transferidas, em concentrações de $20-30 \times 10^6$ células, para hospedeiros atímicos F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu, formando os seguintes grupos experimentais: **[TN]** timócitos P1-P7; **[EN]** esplenócitos P1-P7 e **[TA]** timócitos adultos. Um mês após a transferência, o sangue dos animais foi coletado e avaliado por citometria de fluxo para a persistência da população Thy-1.2⁺. O aparecimento de sinais clínicos de GvHD foi acompanhado em cada grupo.



Protocolo Experimental 3: Camundongos atímicos adultos BALB/c nu/nu previamente reconstituídos com esplenócitos de doadores F1(BALB/c x B6.Ba) adultos (F1→BALB/cnu/nu) e camundongos atímicos F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu receberam por via endovenosa, respectivamente, populações de EN e TN de doadores BALB/c (Thy-1.2⁺), depletadas ou não de células CD25⁺ (15 x 10⁶ células/animal). Um mês após a transferência, amostras de sangue dos hospedeiros foram analisadas por FACS para a presença das células de BALB/c e F1(Thy1.1⁺/Thy1.2⁺) e os animais foram avaliados quanto ao aparecimento de sinais clínicos de doença enxerto-*versus*-hospedeiro. O grau de pureza obtido no protocolo de depleção ultrapassou 95% tanto para TN quanto para EN.

4. RESULTADOS

Neste estudo comparamos a aquisição de tolerância a aloantígenos por populações linfóides de diferentes idades - timócitos (TN) e esplenócitos (EN) de neonato e timócitos de adulto (TA) -, na ausência do timo. Primeiramente, TN, EN ou TA, populações linfóides que naturalmente contêm alta frequência de células RTEs, foram obtidos de camundongos BALB/c (Thy-1.2⁺) e transferidos para hospedeiros atímicos BALB/c nu/nu previamente reconstituídos com esplenócitos de doadores semi-alogênicos F1(BALB/c x B6.Ba) adultos (Thy-1.1⁺/1.2⁺), denominados a partir de agora como hospedeiros F1→BALB/cnu/nu (ver seção *Materiais e Métodos*, Protocolo Experimental 1). Nesse protocolo, as células T semi-alogênicas de F1 proliferam e reconstituem funcionalmente o compartimento periférico do hospedeiro atímico, que se torna uma quimera e adquire imunocompetência para o desenvolvimento de respostas imunológicas específicas, incluindo a rejeição de enxertos de pele alogênica não-relacionada.

TN e EN, assim como TA, de doadores BALB/c tornaram-se tolerantes aos aloantígenos de B6 após interação com as células semi-alogênicas que colonizavam o compartimento periférico dos hospedeiros F1→BALB/cnu/nu (*figura 1*), como evidenciado pela persistência da população linfóide duplo-positiva Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺. A tolerância específica aos aloantígenos de B6 foi confirmada por enxerto de pele no grupo injetado com TN; todos os animais aceitaram a pele de B6 indefinidamente, enquanto a pele alogênica não-relacionada (CBA) foi rejeitada com cinética normal (*figura 2*).

Como esperado, não houve indução de tolerância quando esplenócitos de idade adulta (EA) foram transferidos para o hospedeiro

F1→BALB/cnu/nu, o que foi confirmado pela ausência de população duplo-positiva no gráfico de imunofluorescência (*figura 1*). Esplenócitos de idade adulta, cuja frequência de RTEs é muito baixa, disparam uma reação alogênica que resulta na rejeição da população esplênica de F1 previamente transferida, como já relatado na literatura e confirmado anteriormente utilizando este mesmo protocolo (Fucs *et al.*, 2006).

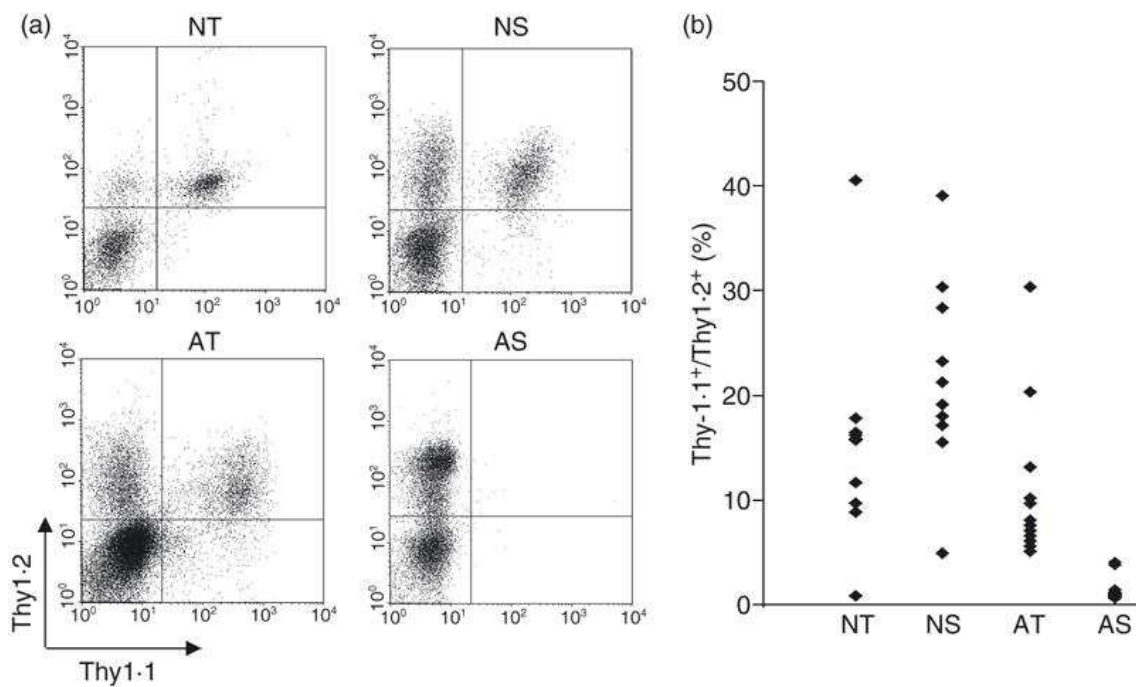


Figura 1: Timócitos/esplenócitos de idade neonatal e timócitos de idade adulta adquirem tolerância a aloantígenos quando interagem com células semi-alogênicas de F1(BALB/c x B6.Ba) previamente presentes no compartimento periférico de hospedeiros F1→BALB/c nu/nu. (a) Análise por citometria de fluxo para a persistência de células de F1 (Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺) no sangue de camundongos atímicos BALB/c nu/nu após receberem esplenócitos de doadores F1 adultos (30×10^6) no dia 0 e células das seguintes populações de doadores BALB/c ($20-30 \times 10^6$) no dia 30: NT, timócitos de neonato (n = 10); NS, esplenócitos de neonato (n = 10); AT, timócitos de adulto (n = 13); AS, esplenócitos de adulto (n = 15); os *dot-plots* são representativos dos dados obtidos nos diferentes grupos. (b) Compilação dos dados referidos em (a), mostrando a porcentagem de células Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺ para cada animal experimental.

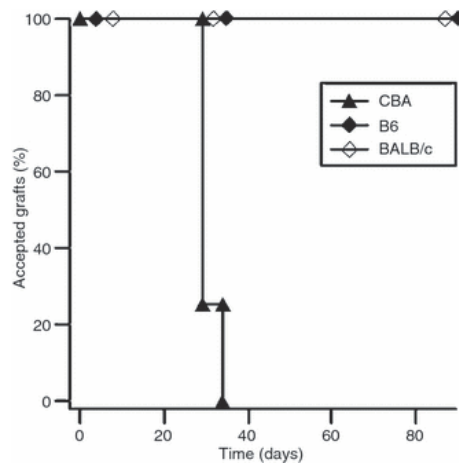


Figura 2: A tolerização de timócitos de idade neonatal (TN) a aloantígenos por interação periférica com esplenócitos de F1 também resulta em aceitação específica de enxertos de pele alogênica geneticamente relacionada. Camundongos BALB/c nu/nu previamente injetados (dia 0) com esplenócitos de F1 (30×10^6) e 1 mês depois (dia 30) com timócitos de BALB/c neonato (20×10^6) receberam, no dia 60, enxertos de pele de doadores BALB/c, B6 e CBA e foram analisados para cinética de rejeição de enxerto.

Na maioria dos casos de tolerância, em que as células de F1 não foram eliminadas após transferência da população TA, as células de BALB/c não persistiram no hospedeiro. A análise de diferentes compartimentos linfóides periféricos dos animais experimentais por citometria de fluxo (*figura 3*) demonstrou que em poucos casos as células de BALB/c expandem e persistem, resultando no estabelecimento de quimerismo misto e coexistência dos linfócitos de F1 e BALB/c nos indivíduos tolerantes (*figura 3a*). Na maior parte dos animais, entretanto, são preservadas apenas as células de F1 (*figura 3b*). Apesar das células de BALB/c não persistirem em longo prazo nos animais tolerantes, elas inicialmente proliferam quando transferidas para hospedeiros BALB/c nu/nu previamente reconstituídos com esplenócitos semi-alogênicos ou singênicos, como mostrado pela

diluição de CFSE (figura 4). Portanto, a tolerância aos aloantígenos de B6 induzida por nosso protocolo não pode ser atribuída à ausência ou deficiência intrínseca de proliferação das RTEs. Isto indica que a presença prévia de linfócitos T de F1 não impede a ativação inicial das células alorreativas de BALB/c, mas pode dificultar sua posterior expansão e implantação no compartimento periférico.

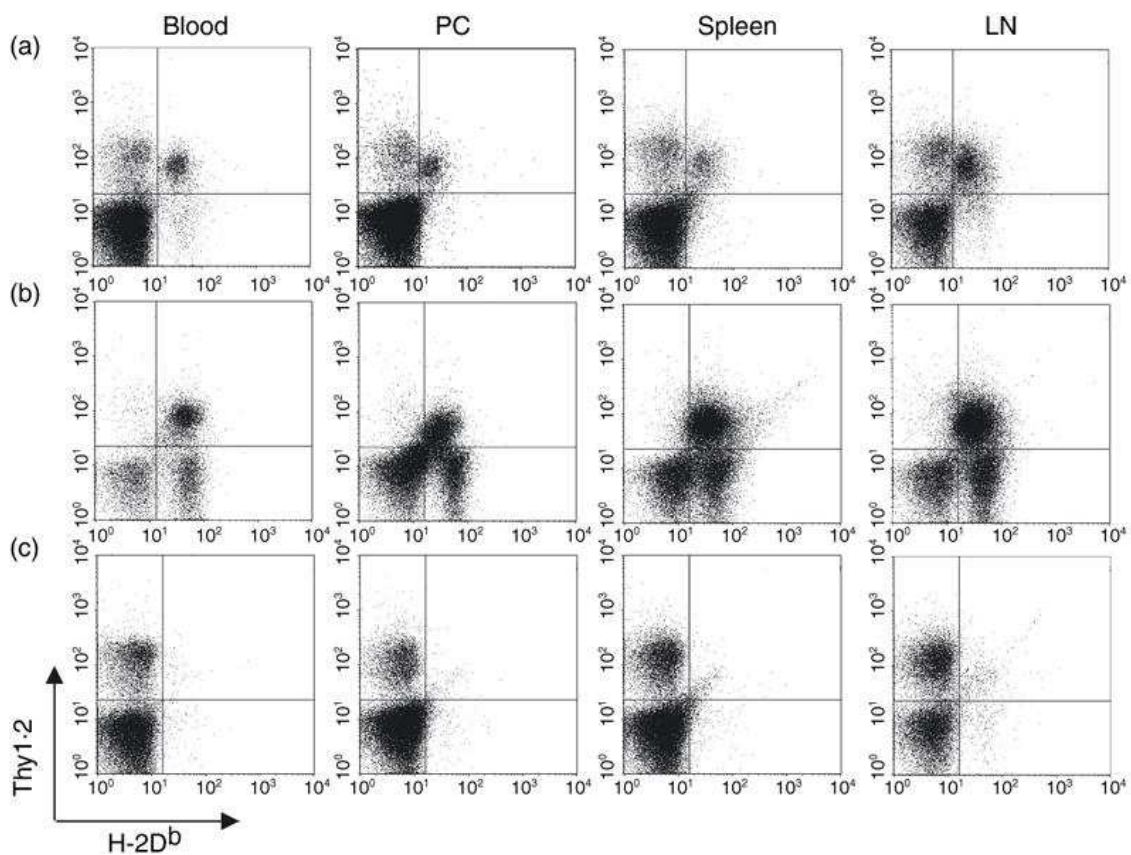


Figura 3: A persistência dos esplenócitos de F1 nem sempre é acompanhada por quimerismo misto com as células de BALB/c (TA) transferidas. Camundongos BALB/c nu/nu previamente reconstituídos com 30×10^6 de esplenócitos de F1(BALB/c x B6.Ba) adulto receberam timócitos de BALB/c adulto (20×10^6) no dia 30. A presença de células de F1 (Thy-1.2⁺/H-2D^{b+}) e de BALB/c (Thy-1.2⁺/H-2D^{b-}) foi determinada por FACS no dia 60 após a transferência, no sangue e em diferentes compartimentos linfóides periféricos [cavidade peritoneal (PC), baço e linfonodos (LN)]. Os resultados para os dois animais mostrados em (a) e (b) são representativos dos dois diferentes fenômenos identificados quando as células de F1 não foram eliminadas pelos linfócitos de BALB/c. (c) Resultado obtido no único

animal (1/15) em que as células de F1 foram rejeitadas pelas células de BALB/c.

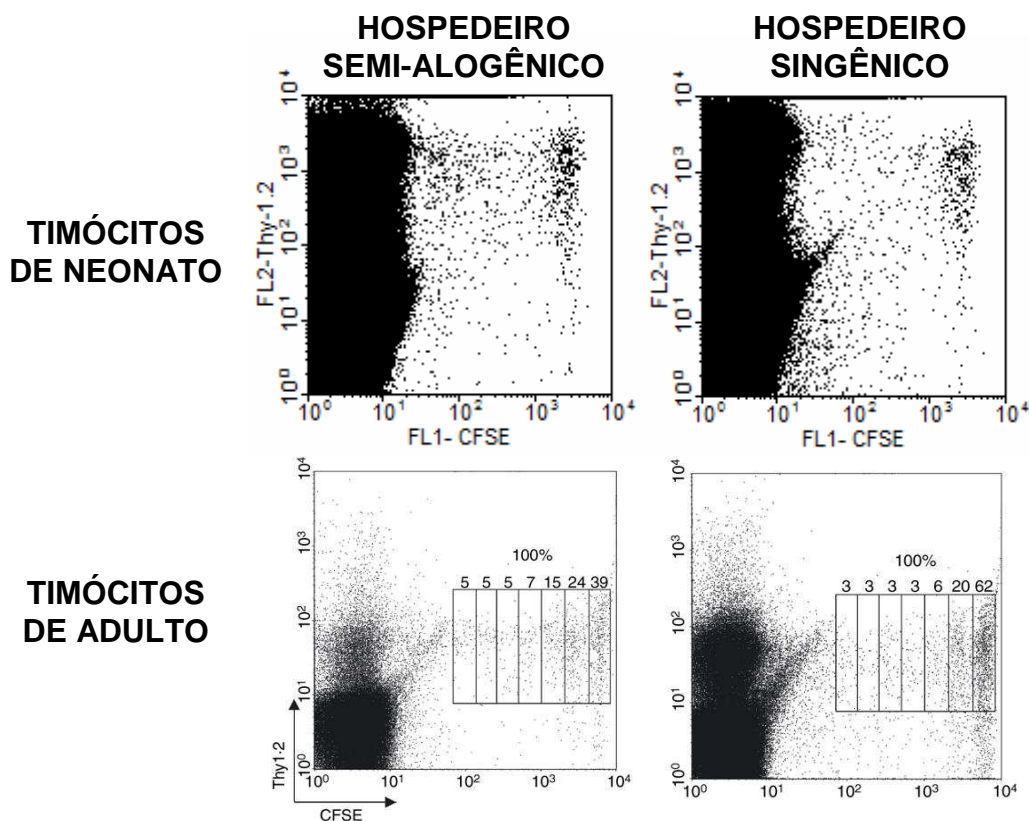


Figura 4: Timócitos de BALB/c neonato e adulto proliferam durante a primeira semana após a transferência para hospedeiros BALB/c nu/nu previamente colonizados por esplenócitos semi-alogênicos ou singênicos. Camundongos BALB/c nu/nu foram injetados no dia 0 com 30×10^6 de esplenócitos de doadores adultos F1 ou BALB/c; 30 dias depois esses animais receberam timócitos de doadores BALB/c neonatos (TN) ou adultos (TA) marcados com CFSE (20×10^6). A proliferação *in vivo* dos timócitos de BALB/c foi analisada pelo acompanhamento da diluição de CFSE em amostras de baço nos dias 4 (TN) e 7 (TA) após a transferência.

Timócitos ou esplenócitos de BALB/c de idade neonatal transferidos para camundongos BALB/c nu/nu na ausência de esplenócitos semi-alogênicos são capazes de expandir no ambiente periférico dos hospedeiros lifopênicos e rejeitar células esplênicas de doadores adultos F1(BALB/c x B6.Ba) posteriormente transferidas (*figura 5*). Esses resultados evidenciam

que as células de idade neonatal são capazes de reconstituir funcionalmente o compartimento T do hospedeiro atímico, mediando a eliminação de células semi-alogênicas subseqüentemente inoculadas. Em contraste com a tolerância descrita anteriormente, as células neonatais que colonizam o compartimento periférico na ausência da população semi-alogênica de F1 não adquirem tolerância aos antígenos de B6.

Para investigar a importância dessa janela de tempo para a aquisição de tolerância ou de atividade efetora, nós variamos os intervalos entre as transferências da população semi-alogênica e das diferentes populações linfóides respondedoras (TN, EN e TA). De maneira interessante, o índice de tolerância foi altamente reduzido quando as células respondedoras de BALB/c foram transferidas anteriormente a ou simultaneamente com as células de F1 (*figura 6*). A transferência simultânea das suspensões celulares de F1 e BALB/c demonstrou um resultado intermediário, com uma clara redução no número de animais tolerantes quando comparado com o protocolo de transferência prévia de esplenócitos de F1. De maneira interessante, a população de TN ainda exibe um alto índice de tolerância mesmo quando é transferida simultaneamente com os esplenócitos de F1.

Estes dados demonstram que o intervalo entre a colonização periférica do hospedeiro BALB/c nu/nu pelas células de F1 e a transferência dos linfócitos respondedores de doadores BALB/c influencia fortemente a aquisição de tolerância, sugerindo que a colonização prévia do ambiente periférico por células que expressem o antígeno alogênico é importante para que as células RTEs se tornem tolerantes ao haplotipo de B6.

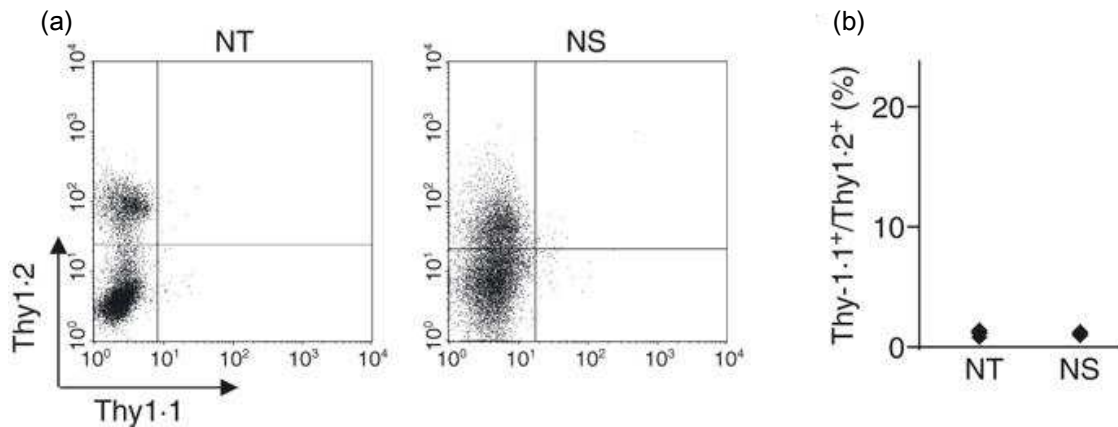


Figura 5: Populações linfóides neonatais de BALB/c que expandiram na ausência de células semi-alogênicas não se tornam tolerantes aos aloantígenos de B6 e rejeitam as células de F1 posteriormente transferidas. (a) Células esplênicas obtidas de doadores F1(BALB/c x B6.Ba) foram transferidas para hospedeiros BALB/c nu/nu no dia 30 após estes terem sido reconstituídos com suspensões de **[NT]** timócitos (n = 4) ou **[NS]** esplenócitos (n = 7) provenientes de doadores BALB/c de idade neonatal (P4-P7). Os gráficos são representativos de cada grupo e mostram as análises por citometria de fluxo para a persistência de células de F1 (Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺) no sangue dos animais no dia 60. (b) Compilação dos dados referidos em (a), mostrando a porcentagem de células Thy1.1⁺/Thy1.2⁺ para cada animal experimental.

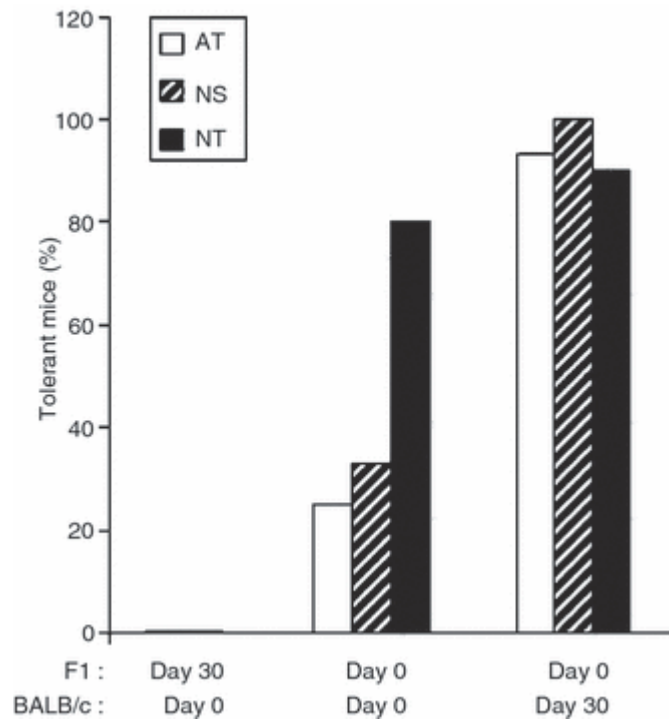


Figura 6: O intervalo entre a colonização periférica do hospedeiro BALB/c nu/nu pelas células de F1 e a transferência dos linfócitos respondedores de doadores BALB/c influencia fortemente a aquisição de tolerância. Camundongos BALB/c nu/nu foram transferidos com esplenócitos semi-alogênicos de doadores F1 (30×10^6) e células respondedoras BALB/c ($20-30 \times 10^6$) em diferentes intervalos. Um primeiro grupo recebeu esplenócitos de F1 no dia 0 e timócitos de neonato (TN, n = 10), esplenócitos de neonato (EN, n = 10) ou timócitos de adulto (TA, n = 13) no dia 30; o segundo recebeu as células de F1 30 dias depois das células de BALB/c (TN, n = 4; EN, n = 7) e o terceiro foi simultaneamente transferido com as duas populações (TN, n = 5; EN, n = 3; TA, n = 4). O percentual de animais tolerantes foi determinado 30 dias após a última transferência a partir de análises por citometria de fluxo de amostras de sangue para a persistência das células de F1 Thy-1.1⁺/Thy-1.2⁺.

Os experimentos descritos até o momento revelaram a importância da colonização prévia do compartimento periférico pelas células semi-alogênicas para que populações linfóides ricas em RTEs (timócitos/esplenócitos de idade neonatal e timócitos de idade adulta) adquiram tolerância específica a aloantígenos. Esses resultados sugerem duas hipóteses não mutuamente exclusivas para explicar a maior eficiência na tolerização da população respondedora após interação com células semi-alogênicas residentes no compartimento periférico do hospedeiro F1→BALB/cnu/nu. Primeiramente, alguma subpopulação de células T contida na população semi-alogênica (por exemplo, células Treg) exerceria influência decisiva no processo tolerogênico e sua expansão previamente à inoculação das células de BALB/c seria necessária para o estabelecimento da tolerância aos antígenos de B6. Alternativamente, após o intervalo de um mês, células apresentadoras de antígeno (APCs) profissionais semi-alogênicas já não estão mais presentes no hospedeiro F1→BALB/cnu/nu e, assim, os linfócitos alorreativos que ingressam nesse ambiente periférico não seriam ativados de forma eficiente, contribuindo para a preservação das células de F1.

Como estratégia para investigar a importância das populações celulares semi-alogênicas (linfócitos T e APCs profissionais) na indução de tolerância, camundongos atímicos F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu foram utilizados como hospedeiros de suspensões celulares de TN, EN ou TA provenientes de doadores eutímicos BALB/c (ver seção *Materiais e Métodos*, Protocolo Experimental 2). Este protocolo nos permitiu avaliar a aquisição de tolerância periférica por diferentes populações RTEs na ausência de linfócitos T de F1 e num ambiente em que as APCs semi-alogênicas

profissionais são continuamente renovadas. As APCs de F1 promovem apresentação associativa do aloantígeno (B6) junto a epítomos singênicos (BALB/c) e sua reposição fisiológica propicia uma estimulação prolongada dos linfócitos T respondedores. Nesses experimentos, a ocorrência de morte por doença enxerto-*versus*-hospedeiro (GvHD) foi utilizada para indicar a ausência de tolerância.

Timócitos e esplenócitos de idade neonatal e timócitos de idade adulta são igualmente capazes de expandir no compartimento periférico semi-alogênico dos hospedeiros F1 nu/nu e atingem frequências semelhantes à observada quando TN de BALB/c são transferidos para camundongos atímicos singênicos. Entretanto, apenas as populações linfóides neonatais (TN e EN) adquirem tolerância aos antígenos de B6, como indicado pela baixa incidência de GvHD. Em contraste, timócitos de BALB/c adulto não se tornam tolerantes quando transferidos para o hospedeiro F1 nu/nu, desenvolvendo sinais clínicos típicos de doença enxerto-*versus*-hospedeiro, resultando em morte do animal 3-5 semanas após a inoculação (*figura 7*).

Diversos estudos já demonstraram que um número elevado de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ aloantígeno-específicas pode inibir a alorreatividade (Graca *et al.*, 2004; Karim *et al.*, 2004; Nishimura *et al.*, 2004; Fucs *et al.*, 2006). Além disso, o ambiente linfopênico é favorável à expansão e/ou geração periférica de células Treg (Min *et al.*, 2003). Nós especulamos, então, que a tolerância observada nos animais injetados com células neonatais poderia ser decorrente de um aumento quantitativo na população de células Treg, resultante da expansão preferencial de células Treg contidas na população respondedora ou da conversão de células T

virgens ao fenótipo regulador após proliferação no compartimento semi-alogênico linfopênico. Para testar essa hipótese, comparamos a frequência de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ obtidas após a expansão de TN em hospedeiros singênicos (BALB/c nu/nu) e semi-alogênicos (F1 nu/nu). Embora as frequências de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ nos hospedeiros semi-alogênicos sejam maiores que as normalmente observadas em camundongos eutímicos, elas não diferem significativamente dos valores encontrados em hospedeiros singênicos (*figura 8*), evidenciando que a aquisição de alo-tolerância periférica em ambiente linfopênico não está correlacionada ao percentual de células Treg no compartimento de linfócitos T $CD4^+$.

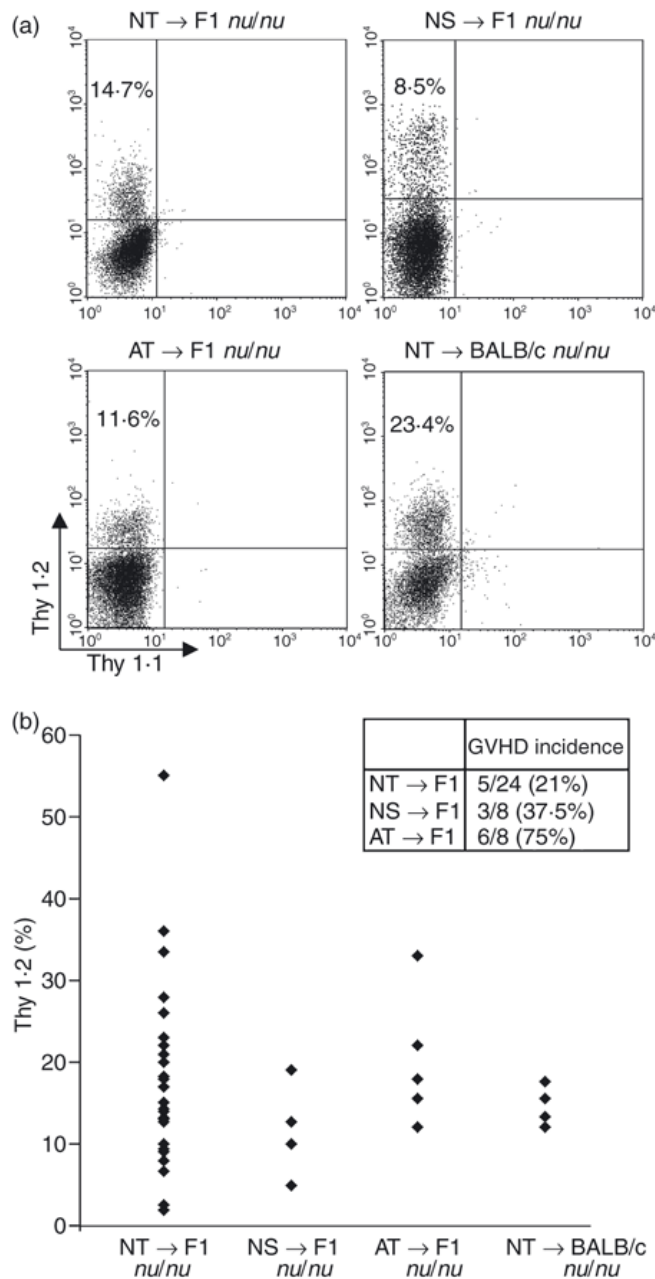


Figura 7: Timócitos/esplenócitos de neonato e timócitos de adulto são igualmente capazes de expandir no compartimento periférico linfopênico do hospedeiro F1 nu/nu, porém apenas as populações neonatais adquirem tolerância aos aloantígenos de B6. (a) A expansão das diferentes populações linfóides de BALB/c (Thy-1.2⁺) transferidas para camundongos F1 nu/nu ($20\text{-}30 \times 10^6$) foi analisada no sangue dos animais, por citometria de fluxo, 30 dias após a transferência. Resultados obtidos em cada animal dos diferentes grupos são mostrados em (b). A incidência de GvHD para cada experimento é mostrada na tabela.

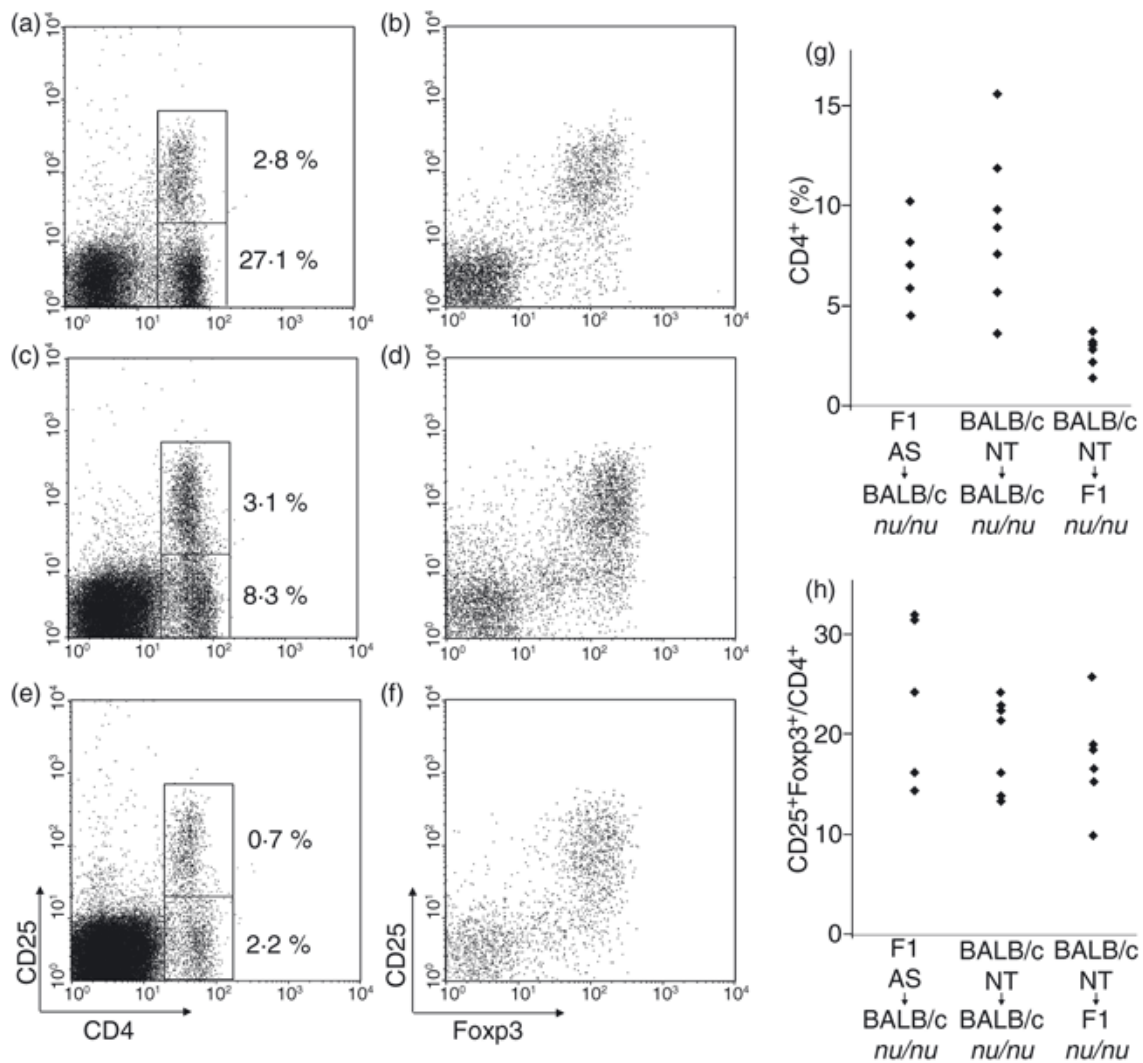


Figura 8: Timócitos de idade neonatal exibem freqüências semelhantes de células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ após expansão em hospedeiros atímicos singênico e semi-alogênico. Amostras de sangue de camundongos BALB/c nu/nu (c, d) e F1 nu/nu (e, f) injetados com timócitos de BALB/c neonato (30×10^6) foram analisadas, por citometria de fluxo, para a presença de células CD4⁺CD25⁺ e CD25⁺Foxp3⁺ trinta dias após a transferência, e comparadas com amostras correspondentes de camundongos eutímicos BALB/c (a, b). Os gráficos de dispersão mostram os percentuais de células CD4⁺ (g) ou CD25⁺Foxp3⁺ entre as CD4⁺ (h) quando diferentes populações celulares foram transferidas para hospedeiros atímicos (BALB/c nu/nu e F1 nu/nu).

Apesar de nenhuma diferença expressiva nos níveis totais de células Treg ter sido identificada nos animais tolerantes, é possível que existam diferenças qualitativas, com aumento preferencial na frequência de células Treg alo-específicas. Segundo essa hipótese, os linfócitos T CD4⁺CD25⁺ presentes na população respondedora exerceriam influência decisiva na indução de tolerância por nosso protocolo.

A partir destes resultados, procuramos compreender em mais detalhes a influência exercida por células Treg derivadas da população respondedora na indução de alo-tolerância neonatal. Para isso, diferentes populações linfóides de doadores BALB/c neonatos foram depletadas de células CD25⁺ através de purificação magnética e a indução de tolerância foi avaliada após sua transferência para hospedeiros F1→BALB/cnu/nu ou F1 nu/nu (ver seção *Materiais e Métodos*, Protocolo Experimental 3).

A ausência de células CD25⁺ na população respondedora de esplenócitos de neonato (EN) não impediu sua tolerização aos aloantígenos de B6 após interação com células T F1 que previamente colonizavam os órgãos linfóides periféricos de camundongos F1→BALB/cnu/nu. As células T semi-alogênicas de F1 inicialmente transferidas foram preservadas tanto nos hospedeiros injetados com EN totais quanto nos que receberam população depletada de células CD25⁺ (*figura 9*). Em contraste, quando timócitos CD25⁻ de doadores BALB/c neonatos foram transferidos para hospedeiros atímicos F1 nu/nu a tolerância aos aloantígenos de B6 não foi estabelecida, como verificado pelo alto índice (6/7) de morte em decorrência de doença enxerto-*versus*-hospedeiro (*figura 10*).

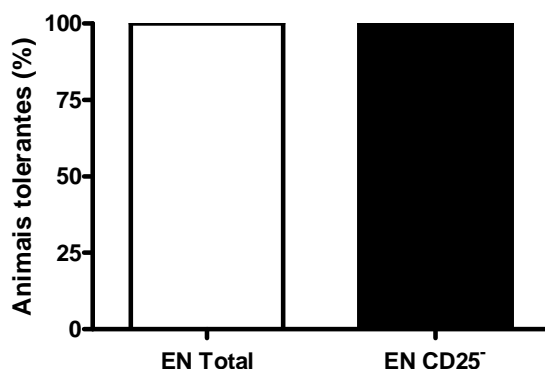


Figura 9: A depleção de células CD25⁺ da população de EN de BALB/c não impediu sua tolerização aos antígenos de B6 após interação com células semi-alogênicas que previamente colonizam o compartimento periférico do hospedeiro F1→BALB/c nu/nu. Camundongos BALB/c nu/nu previamente reconstituídos com 30×10^6 esplenócitos de F1(BALB/c x B6.Ba) receberam 15×10^6 de EN totais (n = 12) ou depletados de células CD25⁺ (n = 3). A indução de tolerância foi avaliada 1 mês após esta transferência, através da análise da presença de células Thy1.1⁺/Thy1.2⁺ em amostras de sangue por citometria de fluxo.

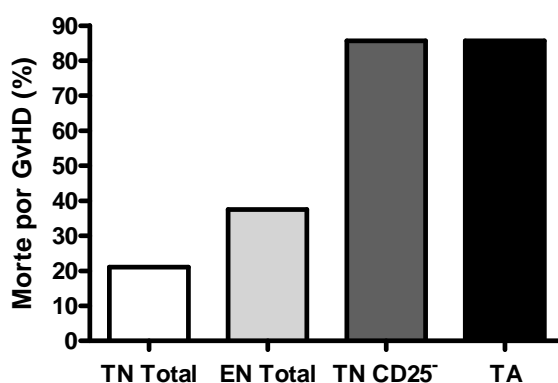


Figura 10: A transferência de timócitos de BALB/c neonato depletados de células CD25⁺ para hospedeiros F1 nu/nu resulta em alta incidência de morte por GvHD. Camundongos F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu foram injetados com diferentes populações linfóides ($20-30 \times 10^6$) de doadores BALB/c [timócitos totais de neonato (TN; n = 24), esplenócitos totais de neonato (EN; n = 8), timócitos de neonato depletados de células CD25⁺ (TN CD25⁻; n = 7) e timócitos de adulto (TA; n = 14)] e acompanhados em relação ao aparecimento de sinais típicos de GvHD.

5. DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou que populações linfóides neonatais (timócitos e esplenócitos) e timócitos adultos podem se tornar tolerantes a um haplotipo alogênico de MHC quando transferidos para hospedeiros atímicos previamente reconstituídos com células T semi-alogênicas. Estas populações – TN, EN e TA – foram incapazes de eliminar os linfócitos T de F1(BALB/c x B6.Ba) residentes no hospedeiro F1→BALB/cnu/nu (*figura 1*). Esta alo-tolerância foi estabelecida na ausência do timo, evidenciando que mecanismos periféricos podem mediar o estabelecimento da não-responsividade específica a aloantígenos por células recém-emigradas do timo, mesmo sem a utilização de manobras experimentais imunossupressoras.

Em alguns animais, a persistência de ambas as populações (BALB/c e F1) foi observada um mês após a transferência das células respondedoras BALB/c, revelando a geração de quimerismo misto (*figura 3*). Entretanto, as células de BALB/c não persistem na maioria dos hospedeiros F1→BALB/cnu/nu, apesar de sofrerem uma proliferação inicial na primeira semana após sua transferência (*figura 4*). Nesses animais, apenas as células de F1 foram detectadas no sangue e em diversos órgãos linfóides periféricos um mês após as células de BALB/c terem sido transferidas. Esses resultados indicam que a presença de células T de F1 não impede a ativação inicial das células de BALB/c injetadas, mas pode dificultar sua expansão e implantação subsequente. De maneira interessante, TA de BALB/c proliferam mais intensamente no hospedeiro reconstituído com esplenócitos semi-alogênicos, provavelmente como consequência da estimulação

aloantigênica. TN, EN e TA são populações celulares naturalmente enriquecidas em células RTE e já foi relatada a existência de um período de 3-4 semanas durante o qual células RTE não necessitam competir por fatores de sobrevivência na periferia (Takeda *et al.*, 1996; Berzins *et al.*, 1999). Isto poderia explicar a presença inicial das células transferidas no hospedeiro BALB/c nu/nu e sua proliferação. Entretanto, a sobrevivência dos linfócitos T no compartimento periférico depende de interações constantes com complexos MHC-peptídeo (Brocker, 1997; Ernst *et al.*, 1999), o que torna a competição com células T de F1 pelo reconhecimento de peptídeos restritos ao haplotipo de MHC H-2^d um importante obstáculo à proliferação homeostática e persistência das células de BALB/c, provavelmente porque as duas populações compartilham, em parte, o mesmo nicho.

A proliferação homeostática não é observada quando células T maduras são transferidas para hospedeiros singênicos não-linfopênicos, um fenômeno conhecido como "barreira isogênica" (Moses *et al.*, 2003). Uma vez que os nichos periféricos estão ocupados pelos linfócitos do hospedeiro, as células transferidas não conseguem captar recursos homeostáticos necessários à sua sobrevivência e proliferação, o que impede sua permanência no animal linfo-repleto. Estudos recentes demonstraram que linfócitos T maduros podem superar essa "barreira" se o antígeno cognato estiver presente no hospedeiro (Troy & Shen, 2003; Min & Paul, 2005). Isso parece explicar os resultados obtidos com a transferência de esplenócitos de adulto (EA) para hospedeiros F1→BALB/cnu/nu, o que resulta na completa eliminação das células de F1 residentes, permitindo a ocupação do compartimento periférico pelas células de BALB/c. As células de F1 foram

totalmente rejeitadas mesmo quando inóculos de EA continham números de células simples-positivas CD4⁺ e CD8⁺ equivalentes aos presentes nas populações que naturalmente contêm alta frequência de células RTE (dados não mostrados). Em contraste, as células de F1 foram preservadas apenas quando os hospedeiros F1→BALB/cnu/nu receberam populações naturalmente enriquecidas em células RTE. Esses resultados sugerem que a incapacidade de TN, EN e TA eliminarem as células de F1 pode ser atribuída ao estado funcional dessas populações e não a um número insuficiente de linfócitos T maduros na população respondedora.

As células RTEs são consideradas imunologicamente imaturas, principalmente com relação à geração de células T efetoras ou de memória (Boursalian *et al.*, 2004; Clise-Dwyer *et al.*, 2007). É possível, então, que o encontro de clones alorreativos RTEs com seus antígenos cognatos permita uma proliferação inicial, seguida por inativação funcional, anergia e eliminação fisiológica por apoptose, resultante de uma resposta ineficiente ao estímulo antigênico. Nossos dados suportam a idéia de que tolerância ao estímulo alogênico e dificuldade de implantação das células respondedoras no animal não-lymfopênico sejam fenômenos associados. As células T auto-reativas contidas nas populações RTE (TN, EN e TA) não conseguiriam se estabelecer no compartimento periférico não-lymfopênico do hospedeiro F1→BALB/cnu/nu devido à barreira isogênica e as células T alorreativas não persistiriam quando tolerizadas. Portanto, as células RTEs de BALB/c tornar-se-iam tolerantes aos aloantígenos de B6 durante sua colonização periférica, tornando-se incapazes de eliminar as células de F1, o que impediria sua posterior permanência no compartimento periférico devido à carência de nichos. Em contraste, células T contidas no inóculo de EA são

funcionalmente maduras e tornam-se eficientemente ativadas em resposta ao estímulo aloantigênico, o que leva à completa destruição das células de F1 e permite o estabelecimento das células T tolerantes a BALB/c.

No entanto, as células RTE não são indefinidamente incompetentes na geração de linfócitos alorreativos efetores, pois quando inoculadas previamente no hospedeiro linfopênico BALB/c nu/nu foram capazes de desencadear a rejeição de células de F1 transferidas um mês depois (*figura 5*). Nessas condições, as células RTEs de BALB/c podem expandir no compartimento periférico linfopênico do hospedeiro singênico, provavelmente completando sua maturidade funcional nesse período. A transferência simultânea de células de F1 e RTEs de BALB/c para hospedeiros BALB/c nu/nu reduz consideravelmente o índice de alo-tolerância alcançado (*figura 6*). Coletivamente, esses resultados revelam não só que as populações RTE são capazes de desencadear respostas efetoras, mas ressaltam a importância da colonização prévia do ambiente periférico por células que expressem o aloantígeno para o estabelecimento da alo-tolerância.

Além de possibilitar que as células RTE alcancem a maturidade funcional necessária à alorreatividade, o intervalo de um mês entre a transferência das células indutoras de tolerância (F1) e respondedoras (BALB/c) poderia resultar no desaparecimento das APCs profissionais frescas de F1 ou na alteração de seu estado funcional. Se APCs tolerogênicas ou fracamente imunogênicas predominam um mês após a transferência dos esplenócitos de F1, o desenvolvimento de respostas alorreativas efetoras pelas populações BALB/c, em especial pelos linfócitos T não completamente maduros, pode ser prejudicado. Alternativamente, esse

intervalo poderia permitir a expansão de células Treg de F1 no hospedeiro linfopênico, as quais seriam importantes para suprimir a ativação dos clones alorreativos presentes no inóculo de células respondedoras RTE. A utilização de camundongos F1nu/nu como hospedeiros em nosso segundo protocolo de indução de tolerância trouxe duas vantagens principais. A primeira delas é a possibilidade de eliminar a influência de células T da população semi-alogênica na indução de tolerância. Além disso, nesses animais há uma combinação de alta carga aloantigênica e reposição fisiológica de APCs profissionais, propriedades que propiciam a indução eficaz de uma resposta efetora alorreativa.

Com este protocolo, verificamos que apenas populações linfóides neonatais são suscetíveis à aquisição de tolerância quando expandem no compartimento periférico linfopênico do hospedeiro F1nu/nu, uma vez que a maioria dos animais injetados com timócitos de doadores BALB/c adultos morreu de GvHD (*figura 7*). O fato de que TA são resistentes à tolerização no hospedeiro F1nu/nu, enquanto são tolerizados no hospedeiro F1→BALB/cnu/nu, sugere uma interferência da abundância de APCs profissionais no processo tolerogênico para esta população. Entretanto, o estabelecimento da alo-tolerância por TN e EN após expansão no hospedeiro F1nu/nu, em que há uma renovação permanente de APCs semi-alogênicas, indica que esse mecanismo não impede a tolerização de populações neonatais. Nesses animais, os linfócitos T neonatais proliferam no ambiente linfopênico e as células tolerantes persistem indefinidamente, sem desencadear GvHD na maior parte dos hospedeiros. A especificidade da tolerância e a imunocompetência dos hospedeiros foram confirmadas pela aceitação de esplenócitos de F1 posteriormente transferidos e pela rejeição

de enxertos de pele alogênica não-relacionada (dados não mostrados).

Portanto, é possível que populações RTEs de diferentes idades (neonatal e adulta) tenham requerimentos diferentes para adquirirem tolerância periférica a aloantígenos. Neste contexto, RTEs de idade neonatal dispensariam a influência supressora de células Treg semi-alogênicas, sendo capazes de adquirir tolerância no hospedeiro F1 nu/nu, talvez por intensa expansão de células Treg de sua própria população ou por conversão periférica de células CD25⁻ ao fenótipo Treg, favorecida pela expansão linfopênica. Em compensação, quando transferidas para hospedeiros não-linfopênicos, como BALB/c nu/nu previamente reconstituídos com células esplênicas de F1, as RTEs neonatais não sofreriam proliferação induzida por linfopenia e conseqüente conversão ao fenótipo CD25⁺Foxp3⁺, e as células Treg presentes na periferia do hospedeiro F1→BALB/cnu/nu poderiam contribuir, então, para tolerizá-las. Já timócitos de adulto, talvez por serem células fenotipicamente mais maduras e com maior restrição de repertório, teriam menor tendência a sofrer conversão ao fenótipo regulador após expansão no compartimento periférico dos camundongos F1 nu/nu, necessitando assim da influência educadora/inibitória oferecida por células Treg da população de F1 para que sejam tolerizados aos aloantígenos. A ausência da influência inibitória proporcionada por células Treg semi-alogênicas no ambiente periférico dos hospedeiros F1 nu/nu poderia favorecer a expansão e diferenciação de timócitos alorreativos maduros em células T efetoras capazes de mediar a GvHD. Além disso, a ausência de linfócitos T no compartimento periférico resulta em nichos periféricos disponíveis (Min & Paul, 2005), que podem então ser ocupados pelos timócitos de idade adulta, que expandiriam mais intensamente que nos

hospedeiros F1→BALB/c nu/nu pela carência de competidores e células Treg semi-alogênicas. A condição linfopênica, aliada à presença de APCs profissionais do nude F1 poderiam favorecer a expansão e ativação dos tímócitos alorreativos de idade adulta.

As células RTE constituem, assim, uma população especial por seu potencial de adquirir tolerância no compartimento periférico, quando comparadas a células com maior tempo de colonização dos órgãos linfóides secundários, como as células esplênicas adultas. A idade da população linfóide, entretanto, parece trazer uma facilidade ainda maior na aquisição de tolerância, indicando a participação de outros mecanismos. Nossos resultados evidenciaram que a população RTE de neonatos é tolerizada mesmo na ausência de linfócitos T previamente selecionados pelo aloantígeno e na presença de APCs profissionais adultas, no hospedeiro atímico F1nu/nu.

A idade neonatal é considerada um estágio do desenvolvimento animal especialmente propício à aquisição de tolerância (Billingham & Brent, 1959; Modigliani *et al.*, 1996). A maior facilidade de indução de tolerância nessa janela de tempo em relação à idade adulta pode ser decorrente de diversas características particulares do indivíduo neonato. Alguns estudos apontam, por exemplo, que o repertório de TCRs de camundongos neonatos é constituído por uma maior proporção de clones multirreativos, devido à deficiência inicial de expressão da enzima TdT, cujos níveis só atingem os de animais adultos por volta do 4º dia pós-natal (Garcia *et al.*, 2000). A multirreatividade dos primeiros linfócitos que ingressam no compartimento pós-tímico do neonato poderia levar tanto a um aumento da autoimunidade, por reatividade cruzada com constituintes próprios, quanto a uma maior

facilidade de indução de tolerância, uma vez que células Treg naturais expressando TCRs multirreativos poderiam controlar a resposta de maior número de clones efetores.

Outros autores consideram que a principal característica que leva à maior facilidade de tolerização do neonato não está na população linfóide, mas no microambiente, como a frequência de DCs maduras. O grupo de P. Matzinger (Ridge *et al.*, 1996) demonstrou que a transferência de DCs maduras purificadas de camundongos machos (que expressam o antígeno menor de histocompatibilidade H-Y) para camundongos neonatos fêmeas estimula a ativação de resposta citotóxica do hospedeiro. De maneira semelhante, a transferência de células esplênicas neonatais para hospedeiros adultos resulta em potente resposta Th1, suficiente para resolver pneumonia causada por *Pneumocystis carinii* (Qureshi & Garvy, 2001). Esses trabalhos indicam que as células T neonatais não possuem uma deficiência intrínseca de ativação, e que o microambiente em que estão presentes é crucial para modular o tipo de resposta que será gerada: tolerância ou imunidade. Em contrapartida, linfócitos T dos linfonodos de camundongos neonatos P7 retêm sua propensão a gerar respostas do tipo Th2 e são deficientes na indução de respostas Th1 quando transferidos para hospedeiros adultos (Adkins *et al.*, 2002). A disparidade entre os resultados de Garvy e Adkins pode ser decorrente das diferenças de microambiente nos órgãos linfóides (baço e linfonodo, respectivamente) de onde obtiveram as populações a serem transferidas.

Além disso, o compartimento periférico do neonato constitui um ambiente naturalmente linfopênico. Desta forma, as primeiras células que emigram do timo, portando TCRs multirreativos, tendem a sofrer uma

intensa expansão no compartimento periférico neonatal (Min *et al.*, 2003; Stockinger *et al.*, 2004). Já foi descrito que a expansão de linfócitos T virgens em ambiente linfopênico leva à conversão de células CD25⁻ ao fenótipo CD25⁺Foxp3⁺, com aquisição de função supressora (Apostolou & von Boehmer, 2004; Curotto De Lafaille *et al.*, 2004). Com isso, é possível que a proliferação induzida por linfopenia durante os primeiros dias de vida do animal seja essencial para a aquisição de tolerância natural por possibilitar a expansão de células Treg recém-emigradas do timo e a geração periférica de células Treg. Esse acúmulo inicial de células Treg (seja por expansão ou por conversão periférica a partir de CD25⁻) no ambiente pós-tímico neonatal seria importante para a educação de novas células ao fenótipo regulador e, assim, uma maior supressão de respostas autoimunes. Esse processo de conversão à linhagem reguladora poderia ser dirigido pelos antígenos presentes no compartimento periférico neste período, explicando a maior facilidade para indução experimental de tolerância a antígenos exógenos na idade neonatal.

Uma outra característica da idade neonatal que pode contribuir para a maior facilidade de indução de tolerância nesse período é o estado funcional das RTEs. O ambiente neonatal é predominantemente composto por RTEs (Opiela *et al.*, 2009) e alguns autores acreditam que estas células sejam mais suscetíveis à aquisição do fenótipo regulador do que células maduras (Modigliani, Bandeira *et al.*, 1996). Modigliani e cols., ao enxertarem rudimentos de epitélio tímico alogênico (não colonizados por células hematopoiéticas) em camundongos atímicos, demonstraram que os hospedeiros tornam-se quimeras especificamente tolerantes a enxertos de tecidos periféricos da mesma origem do doador (Modigliani, Coutinho *et al.*,

1996). Apesar da presença de linfócitos T imunocompetentes, capazes de rejeitar os enxertos alogênicos, células T reguladoras alo-específicas, selecionadas pelo epitélio tímico alogênico enxertado, inibem esta resposta. Após interação periférica, as células Treg selecionadas em epitélio tímico alogênico conseguem recrutar seletivamente células RTEs alorreativas, mas não linfócitos T residentes, à função reguladora, num processo dependente do contato com antígenos específicos. Nos resultados relatados por esse grupo, ao contrário do que evidenciamos em nossos experimentos, a tolerização das RTEs de idade neonatal requer sua interação com células Treg previamente selecionadas no timo pelo epítipo alogênico.

Outros autores já descreveram que as células RTEs deixam o timo num estado relativamente imaturo e completam sua maturação pós-timicamente, num processo provavelmente influenciado pelos peptídeos próprios e ambientais (Boursalian *et al.*, 2004; Clise-Dwyer *et al.*, 2007). As RTEs neonatais são menos eficientes do que células T maduras na produção de citocinas efetoras e respondem intensamente à citocina IL-7, o que contribui para sua proliferação no ambiente linfopênico (Opiela *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos demonstraram que os linfócitos, apenas durante a idade neonatal, conseguem trafegar com maior facilidade entre órgãos linfóides e não linfóides na ausência de sinais inflamatórios (Alferink *et al.*, 1998; Arnold *et al.*, 2005). Desta forma, os resultados citados reforçam a idéia de que as RTEs que expandem sob influência de estímulos antigênicos periféricos, durante o período neonatal, podem adquirir fenótipo supressor à medida que completam sua maturação pós-tímica e, assim, serem mais facilmente tolerizáveis do que células maduras de adultos.

As células RTE constituem, assim, uma população especial, por seu potencial de adquirir tolerância no compartimento periférico, quando comparadas a células com maior tempo de colonização dos órgãos linfóides secundários, como as células esplênicas adultas. A idade da população linfóide, entretanto, parece trazer uma facilidade ainda maior na aquisição de tolerância, indicando a participação de outros mecanismos. Nossos resultados evidenciaram que a população RTE de neonatos é tolerizada mesmo na ausência de linfócitos T previamente selecionados pelo aloantígeno e na presença de APCs profissionais adultas, no hospedeiro atímico F1nu/nu.

A indução de tolerância periférica a aloantígenos ainda é uma questão bastante discutida. Bingaman e cols. investigaram a resposta de células T a aloantígenos periféricos previamente expressos por transplantes de pele ou de coração em presença ou ausência de sinais inflamatórios (Bingaman *et al.*, 2000). Neste estudo, camundongos imunodeficientes B6 Rag1^{-/-} foram transplantados com pele ou coração de doadores alogênicos BALB/c e posteriormente transferidos com células T respondedoras de doadores B6 de diferentes idades e origens. Os transplantes, estabelecidos por mais de 50 dias e sem qualquer sinal de inflamação, foram rejeitados após a inoculação de células T de B6. Além disso, se as células T maduras de B6 fossem substituídas por esplenócitos de neonato ou timócitos de adulto, populações ricas em RTEs, os enxertos alogênicos ainda eram vigorosamente rejeitados tanto em condições inflamatórias quanto em não-inflamatórias. Ao reconstituir os camundongos Rag1^{-/-}, previamente transplantados com pele de BALB/c, com medula óssea de camundongos B6 nu/nu adultos, este grupo observou que as células T recém-emigradas do

timo também não foram tolerizadas para os aloantígenos do enxerto em condições não-inflamatórias. Portanto, células RTE, exportadas do timo a uma taxa fisiológica, não são tolerizadas no ambiente periférico ao interagir com antígenos expressos em órgãos transplantados, mesmo na ausência de sinais inflamatórios. Segundo os autores, enquanto o reconhecimento do antígeno pelas células T no timo leva à tolerância, sua interação com o mesmo antígeno na periferia induz imunidade, o que reforçaria a idéia de que os mecanismos de tolerância periférica não são suficientes para a aquisição de tolerância a aloantígenos.

Algumas diferenças importantes entre nosso protocolo e o de Bingaman e cols. poderiam explicar as contradições entre seus resultados e os nossos. Bingaman utiliza como estímulos indutores de tolerância enxertos de pele e coração, conhecidos por serem fracamente tolerogênicos. Em comparação, nosso modelo utiliza como população indutora de tolerância células de origem hematopoiética (esplenócitos semi-alogênicos), consideradas altamente tolerogênicas. Uma outra diferença importante entre os protocolos é a presença de células T no estímulo indutor de tolerância. Em nosso estudo, a população linfóide semi-alogênica contém células Treg, que poderiam inibir a atividade efetora de células T de BALB/c aloantígeno-específicas e facilitar seu recrutamento para o perfil regulador/anérgico, desta forma promovendo a geração de tolerância periférica (Waldmann *et al.*, 2006).

Entretanto, a presença de células Treg na população estimuladora não explica totalmente a indução de tolerância neonatal que obtivemos em nossos protocolos. RTEs neonatais (timócitos e esplenócitos) adquirem tolerância aos aloantígenos de B6 tanto quando colonizam o compartimento

periférico onde existem células Treg semi-alogênicas (hospedeiro F1→BALB/cnu/nu), quanto no compartimento periférico em que esta subpopulação está ausente (hospedeiro F1 nu/nu). Embora as populações RTE neonatais e adultas tenham sido similarmente tolerizadas no hospedeiro BALB/c nu/nu aos antígenos expressos nas células semi-alogênicas, apenas as populações neonatais adquirem tolerância no hospedeiro F1 nu/nu, conforme discutido anteriormente.

A maior carga alo-antigênica proporcionada pela colonização do compartimento periférico pelas células de F1 em nossos protocolos, comparada a enxertos de tecidos sólidos, de localização mais restrita, utilizada pelo grupo de Bingaman, também pode ter influenciado nos resultados. Algumas evidências da literatura apontam que a alta carga antigênica e a estimulação crônica dos linfócitos T pelo aloantígeno podem favorecer a geração e a expansão de células Treg alorreativas capazes de manter alo-tolerância periférica (Fehervari & Sakaguchi, 2004; Walsh *et al.*, 2004). Estudos de Le Douarin e cols. demonstraram que o transplante de asa de codorna em embriões de galinha não induz tolerância e, após o nascimento, a galinha rejeita o tecido alogênico. Em compensação, quando a asa de galinha foi enxertada em embriões de codorna, o que representa uma carga antigênica bem mais elevada para o hospedeiro, as cordornas adultas não rejeitaram a asa, evidenciando a geração de tolerância (Martin *et al.*, 1991).

A dose antigênica parece influenciar de maneira decisiva a indução de tolerância ou imunidade. Enquanto a transferência de altas doses de células esplênicas semi-alogênicas para hospedeiros neonatos resulta em tolerância, o ajuste do inóculo para uma concentração 10 vezes menor leva

ao desenvolvimento de atividade citotóxica específica, com conseqüente eliminação das células expressando o aloantígeno (Adkins *et al.*, 2004). De maneira semelhante, a inoculação de altas doses do vírus da leucemia murina em camundongos neonatos resulta em vigorosa resposta do tipo Th2, ausência de atividade citotóxica específica e, conseqüentemente, de proteção contra a doença. Em contrapartida, a redução da concentração de partículas virais presentes no inóculo leva ao desenvolvimento de respostas Th1 e atividade citotóxica específica semelhantes às observadas no hospedeiro adulto imunizado com altas doses do vírus, garantindo a proteção do hospedeiro (Sarzotti *et al.*, 1996). Ou seja, as células neonatais são capazes de desenvolver respostas efetoras eficientes desde que sejam estimuladas por doses adequadas de antígenos. A estimulação excessiva pode levar a não-responsividade devido à incapacidade das APCs de apresentarem todos os antígenos relevantes para os linfócitos T.

Em contraste com os resultados de Bingaman e cols., outros trabalhos na literatura encontraram indução de tolerância a aloantígenos a nível periférico. Um estudo demonstrou que esplenócitos de ratos cuja tireóide foi removida *in útero*, ao contrário de esplenócitos de ratos controles não manipulados, são incapazes de impedir o desenvolvimento de tireoidite autoimune quando transferidos para animais nos quais a doença é experimentalmente induzida. Em contrapartida, timócitos dos mesmos doadores são eficientes na prevenção da doença. Os autores concluíram que a interação com o auto-antígeno no compartimento periférico é essencial para que células Treg geradas intra-timicamente evitem a auto-imunidade (Seddon & Mason, 1999).

Outros autores evidenciaram que mecanismos semelhantes podem operar na indução de tolerância a tecidos alogênicos. O reconhecimento associativo, no compartimento periférico, de epítomos tolerados e não-tolerados por uma mesma APC parece favorecer a indução de tolerância ao epítomo não-tolerado (Kong *et al.*, 1996; Cobbold & Waldmann, 1998; Fucs *et al.*, 2006). Kong e cols. demonstraram que interações de linfócitos no compartimento periférico podem levar tanto à indução de tolerância a novos antígenos quanto à reversão de tolerâncias anteriormente estabelecidas. Células T reguladoras de fêmeas B6 tolerantes ao aloantígeno do MHC de classe II I-A^{bm12} suprimem a resposta imunológica contra um antígeno de macho não relacionado co-expresso com o antígeno bm12 no mesmo enxerto. Entretanto, a supressão original a bm12 pode ser revertida quando as fêmeas interagem pela primeira vez com o antígeno de macho expresso junto a outro aloantígeno, para o qual não são tolerantes (Kong *et al.*, 1996).

Em nossos experimentos, o estímulo indutor de tolerância (sejam as células esplênicas de F1 ou o compartimento periférico do hospedeiro F1 nu/nu) contém células semi-alogênicas que possibilitam a apresentação associativa de epítomos singênicos (BALB/c) e alogênicos (B6) à população de RTEs respondedora. É possível, assim, que estejamos diante de duas características importantes, consideradas facilitadoras da indução de tolerância: a natureza RTE da população respondedora e a apresentação do tolerógeno de forma associativa com epítomos próprios, já tolerados, e para os quais já existam células Treg diferenciadas intra-timicamente. É possível que células Treg reativas a antígenos de BALB/c (ou mesmo reativas a B6) presentes na população semi-alogênica ou na população de RTEs possam

converter células T virgens potencialmente alorreativas ao fenótipo regulador, desta forma ampliando a tolerância para os aloantígenos de B6.

Alguns autores sugerem que existe um balanço entre deleção de clones alorreativos e supressão dominante por atividade reguladora na indução de alo-tolerância periférica (Lechler *et al.*, 2003; Zheng *et al.*, 2003). Esta questão não foi avaliada em nossas experiências, mas supomos que tanto a deleção de clones anti-B6 como a geração de células Treg possam ocorrer em nossos animais experimentais. Caso a deleção de clones alorreativos seja um dos fenômenos envolvidos na geração de tolerância induzida por nosso protocolo, devemos investigar quais mecanismos são responsáveis por tal deleção periférica. Alguns autores (Miyara & Sakaguchi, 2007) defendem que células Treg podem mediar supressão de resposta alorreativas através de mecanismos citotóxicos que resultam na morte da célula aloantígeno-específica. É possível, portanto, que células Treg atuem não só inibindo a proliferação e/ou ativação de clones autorreativos como induzindo sua citólise no compartimento periférico. Desta forma, será importante saber se células Treg aloantígeno-específicas são mais eficientes no desencadeamento da supressão e quais são os mecanismos empregados para garantir a tolerância.

As células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, sejam as naturalmente exportadas do timo ou as induzidas perifericamente, são essenciais para controlar auto-imunidade, e têm sido consideradas um componente indispensável na aquisição de tolerância a aloantígenos (Jonuleit *et al.*, 2003; Graca *et al.*, 2005, Joffre & van Meerwijk, 2006; Cobbold *et al.*, 2006). A importância do estabelecimento prévio das células de F1 no compartimento periférico do hospedeiro F1→BALB/cnu/nu para que os

linfócitos de BALB/s sejam tolerizados poderia indicar a necessidade da expansão de uma subpopulação de linfócitos de F1, tais como Treg, para o processo tolerogênico. Nós investigamos se, um mês após a transferência para o hospedeiro BALB/c nu/nu, as células Treg estavam aumentadas antes da inoculação dos linfócitos T respondedores de BALB/c. Embora um maior percentual de células $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ tenha sido observado nos hospedeiros F1→BALB/cnu/nu quando comparados com animais BALB/c eutímicos, camundongos BALB/c reconstituídos com esplenócitos BALB/c singênicos (BALB/c→BALB/cnu/nu) também exibiram freqüências aumentadas dessa subpopulação (*figura 8*).

Como as células Treg participam da indução de alo-tolerância neonatal, inclusive pelo protocolo estabelecido pelo grupo de Medawar (Field *et al.*, 2001), nós verificamos se a transferência de populações neonatais para hospedeiros linfopênicos semi-alogênicos F1nu/nu, onde linfócitos de BALB/c são tolerizados e persistem indefinidamente, resultaria numa freqüência aumentada de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ expandidas e/ou convertidas periféricamente. Novamente, os números de Treg presentes um mês após a transferência foram maiores que os observados em animais eutímicos BALB/c e B6. Entretanto, nenhuma diferença significativa foi identificada quando TN expandiram em hospedeiros singênicos (BALB/c nu/nu) ou semi-alogênicos, sugerindo que a tolerância a B6 não é associada com um aumento na freqüência total de células Treg (*figura 8*).

Apesar do número total de células Treg $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ em nossos animais experimentais ser equivalente após expansão das populações neonatais em hospedeiros singênicos e alogênicos, mudanças qualitativas

no repertório, decorrentes de um aumento preferencial na proporção de clones reguladores alorreativos específicos no hospedeiro semi-alogênico, não podem ser descartadas.

A importância da especificidade antigênica das células Treg na sua atividade supressora ainda é uma questão debatida. Diversos estudos *in vitro* e *in vivo* (van Maurik *et al.*, 2002; Koenen *et al.*, 2003; Yamazaki *et al.*, 2006; Coenen *et al.*, 2007; Giorgini & Noble, 2007; Turnquist *et al.*, 2007) demonstram que células Treg CD4⁺CD25⁺ aloantígeno-específicas são mais competentes na supressão de respostas a transplantes, garantindo a imunossupressão eficiente dos clones reativos aos aloantígenos e possibilitando a sobrevivência prolongada do alo-enxerto. Em contrapartida, outros autores afirmam que a atividade supressora desta subpopulação é antígeno-inespecífica (Thornton & Shevach, 1998; Thornton & Shevach, 2000). Esses últimos consideram que a interação com o antígeno específico é necessária apenas para a ativação da Treg; uma vez ativada, a célula Treg poderia mediar a supressão de respostas imunológicas a antígenos que não determinaram sua ativação.

Em nossos experimentos, é possível que as células Treg semi-alogênicas reativas a BALB/c expandam no compartimento periférico do hospedeiro F1→BALB/c nu/nu e controlem a resposta de clones BALB/c anti-B6 que interajam na mesma APC. Uma outra possibilidade é que tenham sido geradas células Treg aloantígeno-específicas durante a interação periférica das RTEs com o aloantígeno (por influência de células Treg previamente expandidas nos hospedeiros BALB/c nu/nu ou como resultado da expansão induzida por linfopenia na tolerização das RTE neonatais no

hospedeiro F1 nu/nu) e estas células Treg poderiam, então, regular a resposta contra as células semi-alogênicas de F1 de maneira específica.

A fim de avaliar a influência das células Treg $CD4^+CD25^+$ naturais contidas na população respondedora no processo de tolerância neonatal alcançada por nossos protocolos, inicialmente transferimos EN e TN depletados de células $CD25^+$ para hospedeiros $F1 \rightarrow BALB/cnu/nu$ e $F1nu/nu$, respectivamente, e comparamos o índice de tolerância com animais que haviam sido injetados com populações não-depletadas. A deficiência de células $CD25^+$ na população de EN não impediu a tolerização dos linfócitos de BALB/c aos antígenos de B6 quando transferidos para os camundongos não-lymfo-pênicos $F1 \rightarrow BALB/cnu/nu$, uma vez que as células T semi-alogênicas de F1 previamente transferidas foram preservadas tanto nos hospedeiros injetados com EN totais quanto nos que receberam população depletada de células $CD25^+$ (*figura 9*). Em contraste, a colonização de hospedeiros $F1 nu/nu$ por TN $CD25^-$ de doadores BALB/c não é acompanhada pela aquisição de tolerância aos aloantígenos de B6. Pelo contrário, TN $CD25^-$ induzem a morte por GvHD na maior parte dos animais injetados, um índice equivalente ao observado quando camundongos $F1 nu/nu$ são reconstituídos com TA (*figura 10*). Estes resultados sugerem que a presença de células Treg $CD4^+CD25^+$ semi-alogênicas no compartimento periférico dos hospedeiros $F1 \rightarrow BALB/cnu/nu$ é suficiente para garantir a tolerização de esplenócitos neonatais $CD25^-$ aos antígenos próprios e aos aloantígenos de B6, compensando assim a ausência de células $CD25^+$ na população respondedora BALB/c. Por outro lado, as células $CD25^+$ contidas na população BALB/c são essenciais para inibir respostas alorreativas ao

haplotipo de MHC de B6 quando o compartimento periférico não é colonizado por células T semi-alogênicas.

A transferência de células CD25⁻ para hospedeiros BALB/c nu/nu induz autoimunidade, evidenciando o papel essencial de células T CD4⁺CD25⁺ na manutenção da tolerância periférica (Asano *et al.*, 1996). Um estudo recente (Velásquez-Lopera *et al.*, 2008) demonstrou que tanto células Treg da população indutora de tolerância como da população respondedora são capazes de inibir a alorreatividade de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ *in vitro*. A transferência de células Tregs derivadas de uma dessas populações (indutora ou respondedora), mas não Treg alogênicas não-relacionadas, para hospedeiros atímicos previamente transferidos com células CD4⁺CD25⁻ aumenta significativamente a sobrevivência de aloenxertos de pele, evidenciando a indução de alo-tolerância específica também *in vivo*. Além disso, a transferência de células T CD4⁺ para hospedeiros linfopênicos leva à expansão espontânea de células Treg CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, que são capazes de inibir a proliferação induzida por antígeno específico e facilitar a indução de anergia clonal na população CD4⁺CD25⁻ durante a recuperação da linfopenia (Vanasek *et al.*, 2006). Coletivamente, esses resultados, assim como os obtidos em nosso estudo, destacam o potencial de células Treg alorreativas na indução de tolerância a tecidos alogênicos. Transferências de populações TN depletadas de células CD25 para hospedeiros F1→BALB/cnu/nu e de EN depletadas de células CD25 para camundongos F1(BALB/c x C57BL/6) nu/nu estão atualmente sendo realizadas a fim de confirmar esses resultados.

O presente trabalho demonstrou que células recém-emigradas do timo, especialmente de idade neonatal, podem se tornar tolerantes a

antígenos alogênicos, no compartimento periférico, quando estes são apresentados de forma associativa por células semi-alogênicas. Os mecanismos que possibilitam essa indução de tolerância são ainda elusivos, mas a participação de células Treg parece ser importante para esse fenômeno. Atualmente, a terapia clínica empregada para potencializar a tolerância a transplantes geneticamente incompatíveis consiste na administração de imunossuppressores que acarretam diversos efeitos colaterais nos pacientes (como a suscetibilidade a infecções oportunistas) e, muitas vezes, são ineficientes no bloqueio da rejeição a longo prazo. O avanço no entendimento dos mecanismos envolvidos na tolerância periférica a transplantes será de grande importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas que minimizem a alorreatividade e, assim, favoreçam a aceitação de transplantes de doadores não relacionados geneticamente, na ausência de imunossupressão sistêmica. A manipulação de tais mecanismos e, até mesmo, a administração terapêutica de células Treg podem ser futuras ferramentas para superar as dificuldades encontradas para garantir a persistência do transplante e a sobrevida do paciente.

6. BIBLIOGRAFIA

ADKINS, B.; BU, Y. & GUEVARA, P. **Murine neonatal CD4⁺ lymph node cells are highly deficient in the development of antigen-specific Th1 function in adoptive adult hosts.** J. Immunol., 169(9), 4998-5004, 2002.

ADKINS, B.; LECLERC, C. & MARSHALL-CLARKE, S. **Neonatal adaptive immunity comes of age.** Nat. Rev. Immunol., 4(7), 553-64, 2004.

ADKINS, B.; JONES, M.; BU, Y. & LEVY, R. B. **Neonatal tolerance revisited again: specific CTL priming in mouse neonates exposed to small numbers of semi- or fully allogeneic spleen cells.** Eur. J. Immunol., 34:1901-1909, 2004.

ADKINS, B. **Heterogeneity in the CD4 T cell compartment and the variability of neonatal immune responsiveness.** Curr. Immunol. Rev., 3(3), 151-159, 2007.

ALFERINK, J.; TAFURI, A.; VESTWEBER, D.; HALLMANN, R.; HÄMMERLING, G. J. & ARNOLD, B. **Control of neonatal tolerance to tissue antigens by peripheral T cell trafficking.** Science, 282(5392), 1338-1341, 1998.

ALMEIDA, A. R.; ROCHA, B.; FREITAS, A. A. & TANCHOT, C. **Homeostasis of T cell numbers: from thymus production to peripheral compartmentalization and the indexation of regulatory T cells.** Semin. Immunol., 17(3), 239-249, 2005.

ALMEIDA, A. R. M.; ZARAGOZA, B. & FREITAS, A. A. **Competition controls the rate of transition between the peripheral pools of CD4⁺CD25⁻ and CD4⁺CD25⁺ T cells.** Int. Immunol., 18(11), 1607-1613, 2006.

APPLEBY, M. W. & RAMSDELL, F. **Scurfy, the Foxp3 locus, and the molecular basis of peripheral tolerance.** Curr. Top. Microbiol. Immunol., 321, 151-168, 2008.

APOSTOLOU, I.; SARUKHAN, A.; KLEIN, L. & VON BOEHMER, H. **Origin of regulatory T cells with known specificity for antigen.** Nat. Immunol., 3(8), 756-763, 2002.

APOSTOLOU, I. & VON BOEHMER, H. **In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells.** J. Exp. Med., 199(10), 1401-1408, 2004.

ARNOLD, B.; SCHULER, T. & HÄMMERLING, G. J. **Control of peripheral T-lymphocyte tolerance in neonates and adults.** Trend. Immunol., 26(8), 406-411, 2005.

ASANO, M.; TODA, M.; SAKAGUCHI, N. & SAKAGUCHI, S. **Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation.** J. Exp. Med., 184(2), 387-396, 1996.

ASCHENBRENNER, K.; D'CRUZ, L. M.; VOLLMANN, E. H.; HINTERBERGER, M.; EMMERICH, J.; SWEE, L. K.; ROLINK, A. & KLEIN, L. **Selection of Foxp3⁺ regulatory T cells specific for self antigen expressed and presented by Aire⁺ medullary thymic epithelial cells.** Nat. Immunol., 8(4), 351-358, 2007.

ASSEMAN, C.; MAUZE, S.; LEACH, M. W.; COFFMAN, R. L. & POWRIE, F. **An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation.** J. Exp. Med., 190, 995-1004, 1999.

BAUTISTA, J. L.; LIO, C. J.; LATHROP, S. K.; FORBUSH, K.; LIANG, Y.; LUO, J.; RUDENSKY, A. Y. & HSIEH, C. **Intraclonal competition limits the fate determination of regulatory T cells in the thymus.** Nat. Immunol., 10(6), 610-617, 2009.

BECKER, C.; STOLL, S.; BOPP, T.; SCHMITT, E. & JONULEIT, H. **Regulatory T cells: present facts and future hopes.** Med. Microbiol. Immunol., 195(3), 113-124, 2006.

BEISSERT, S.; SCHWARZ, A. & SCHWARZ, T. **Regulatory T cells.** J. Invest. Dermatol., 126, 15-24, 2006.

BELKAID, Y. & TARBELL, K. **Regulatory T cells in the control of host-microorganism interactions.** Annu. Rev. Immunol., 27, 551-589, 2009.

BERZINS, S. P.; BOYD, R. L. & MILLER, J. **The role of the thymus and recent thymic migrants in the maintenance of the adult peripheral lymphocyte pool.** J. Exp. Med., 187(11), 1839-1848, 1998.

BETTELLI, E.; DASTRANGE, M. & OUKKA, M. **Foxp3 interacts with nuclear factor of activated T cells and NF- κ B to repress cytokine gene expression and effector functions of T helper cells.** Proc. Natl. Acad. Sci., 102(14), 5138-5143, 2005.

BILLINGHAM, R. E., BRENT, L. & MEDAWAR, P. B. **Actively acquired tolerance of foreign cells.** Nature, 172(4379), 603-606, 1953.

BILLINGHAM, R. E. & BRENT, L. **Quantitative studies on tissue transplantation immunity. IV. Induction of tolerance in newborn mice and studies on the phenomenon of runt disease.** Phil. Trans. R. Soc. Lond. B, 242(694), 439-477, 1959.

BINGAMAN, A. W.; HA, J.; WAITZE, S. Y.; DURHAM, M. M.; CHO, H. R.; TUCKER-BURDEN, C.; HENDRIX, R.; COWAN, S. R.; PEARSON, T. C. & LARSEN, C. P. **Vigorous allograft rejection in the absence of danger.** J. Immunol., 164(6), 3065-3071, 2000.

BLUESTONE, J. A. & ABBAS, A. K. **Natural versus adaptive regulatory T cells.** Nat. Rev. Immunol., 3(3), 253-257, 2003.

BOPP, T.; BECKER, C.; KLEIN, M.; KLEIN-HESSLING, S.; PALMETSHOFER, A.; SERFLING, E.; HEIB, V.; BECKER, M.; KUBACH, J.; SCHMITT, S.; STOLL,

S.; SCHILD, H.; STAEGE, M. S.; STASSEN, M.; JONULEIT, H. & SCHMITT, E. **Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression.** J. Exp. Med., 204(6)1303-1310, 2007.

BORSELLINO, G.; KLEINWIETFELD, M.; DI MITRI, D.; STERNJAK, A.; DIAMANTINI, A.; GIOMETTO, R.; HÖPNER, S.; CENTONZE, D.; BERNARDI, G.; DELL'ACQUA, M. L.; ROSSINI, P. M.; BATTISTINI, L.; RÖTZSCHKE, O. & FALK, K. **Expression of ectonucleotidase CD39 by Foxp3⁺ Treg cells: hydrolysis of extracellular ATP and immune suppression.** Blood, 110(4), 1225-1232, 2007.

BOURSALIAN, T. E.; GOLOB, J.; SOPER, D. M.; COOPER, C. J. & FINK, P. J. **Continued maturation of thymic emigrants in the periphery.** Nat. Immunol., 5(4), 418-425, 2004.

BROCKER, T. **Survival of mature CD4 T lymphocytes is dependent on major histocompatibility complex class II-expressing dendritic cells.** J. Exp. Med., 186, 1223-32, 1997.

CABARROCAS, J.; CASSAN, C.; MAGNUSSON, F.; PIAGGIO, E.; MARS, L.; DERBINSKI, J.; KYEWSKI, B.; GROSS, D.; SALOMON, B. L.; KHAZAIE, K.; SAOUDI, A. & LIBLAU, R. S. **Foxp3⁺CD25⁺ regulatory T cells specific for a neo-self-antigen develop at the double-positive thymic stage.** Proc. Natl. Acad. Sci., 103(22), 8453-8458, 2006.

CAMPBELL, D. J. & ZIEGLER, S. F. **Foxp3 modifies the phenotypic and functional properties of regulatory T cells.** Nat. Rev. Immunol., 7(4), 305-310, 2007.

CAO, X.; CAI, S. F.; FEHNIGER, T. A.; SONG, J.; COLLINS, L. I.; PIWNICA-WORMS, D. R. & LEY, T. J. **Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance.** Immunity, 27(4), 635-646, 2007.

CARAMALHO, I.; LOPES-CARVALHO, T.; OSTLER, D.; ZELENAY, S.; HAURY, M. & DEMENGEOT, J. **Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and are activated by lipopolysaccharide.** J. Exp. Med., 197(4), 403-400, 2003.

CEDERBOM, L.; HALL, H. & IVARS, F. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells.** Eur. J. Immunol., 30(6), 1538-1543, 2000.

CHEN, W.; JIN, W.; HARDEGEN, N.; LEI, K.; LI, L.; MARINOS, N.; MCGRADY, G. & WAHL, S. M. **Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naïve T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3.** J. Exp. Med., 198(12), 1875-1886, 2003.

CLISE-DWYER, K.; HUSTON, G. E.; BUCK, A. L.; DUSO, D. K. & SWAIN, S. L. **Environmental and intrinsic factors lead to antigen unresponsiveness in CD4⁺ recent thymic emigrants from aged mice.** J. Immunol., 178(3), 1321-1331, 2007.

COBBOLD, S. & WALDMANN, H. **Infectious tolerance**. *Curr. Opin. Immunol.*, 10(5), 518-524, 1998.

COBBOLD, S. P.; ADAMS, E.; GRACA, L.; DALEY, S.; YATES, S.; PATERSON, A.; ROBERTSON, N. J.; NOLAN, K. F.; FAIRCHILD, P. J. & WALDMANN, H. **Immune privilege induced by regulatory T cells in transplantation tolerance**. *Immunol. Rev.*, 213, 239-255, 2006.

COENEN, J. J. A.; KOENEN, H. J. P. M.; EMMER, P. M.; VAN RIJSSSEN, E.; HILBRANDS, L. B. & JOOSTEN, I. **Allogeneic stimulation of naturally occurring CD4⁺CD25⁺ T cells induces strong regulatory capacity with increased donor-reactivity**. *Transpl. Immunol.*, 17, 237-242, 2007.

COLLISON, L. W.; WORKMAN, C. J.; KUO, T. T.; BOYD, K.; WANG, Y.; VIGNALI, K. M.; CROSS, R.; SEHY, D.; BLUMBERG, R. S. & VIGNALI, D. A. **The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function**. *Nature*, 450(7169), 566-569, 2007.

COOMBES, J. L.; SIDDIQUI, K. R. R.; ARANCIBIA-CÁRCAMO, C. V.; HALL, J.; SUN, C.; BELKAID, Y. & POWRIE, F. **A functionally specialized population of mucosal CD103⁺ DCs induces Foxp3⁺ regulatory T cells via a TGF- β - and retinoic acid-dependent manner**. *J. Exp. Med.*, 204(8), 1757-1764, 2007.

COUTINHO, A. **The Le Douarin phenomenon: a shift in the paradigm of developmental self-tolerance**. *Int. J. Dev. Biol.*, 49(2-3), 131-136, 2005.

CRELLIN, N. K.; GARCIA, R. V.; HADISFAR, O.; ALLAN, S. E.; STEINER, T. S. & LEVINGS, M. K. **Human CD4⁺ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells**. *J. Immunol.*, 175, 8051-8059, 2005.

CURIEL, T. J. **Regulatory T cells and treatment of cancer**. *Curr. Opin. Immunol.*, 20, 241-246, 2008.

CUROTTO-DE-LAFAILLE, M. A.; LINO, A. C.; KUTCHUKHIDZE, N. & LAFAILLE, J. **CD25⁻ T cells generate CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells by peripheral expansion**. *J. Immunol.*, 173(12), 7259-7268, 2004.

CUROTTO DE LAFAILLE, M. A. & LAFAILLE, J. J. **Natural and adaptive Foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?** *Immunity*, 30(5), 626-635.

DAVIES, J. D.; LEONG, L. Y. W.; MELLOR, A.; COBBOLD, S. P. & WALDMANN, H. **T cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition**. *J. Immunol.* 156(10), 3602-3607, 1996.

DEAGLIO, S.; DWYER, K. M.; GAO, W.; FRIEDMAN, D.; USHEVA, A.; ERAT, A.; CHEN, J. F.; ENJYOJI, K.; LINDEN, J.; OUKKA, M.; KICHROO, V. K.;

STROM, T. B. & ROBSON, S. C. **Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression.** *J. Exp. Med.*, 204(6), 1257-1265, 2007.

DE LA ROSA, M.; RUTZ, S.; DORNINGER, H. & SCHEFFOLD, A. **Interleukin-2 is essential for CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell function.** *Eur. J. Immunol.*, 34(9), 2480-2488, 2004.

ERNST, B.; LEE, D. S.; CHANG, J. M.; SPRENT, J. & SURH, C. D. **The peptide ligands mediating positive selection in the thymus control T cell survival and homeostatic proliferation in the periphery.** *Immunity*, 11, 173-81, 1999.

FAHLÉN, L.; READ, S.; GORELIK, L.; HURST, S. D.; COFFMAN, R. L. FLAVELL, R. A. & POWRIE, F. **T cells that cannot respond to TGF- β escape control by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *J. Exp. Med.*, 201(5), 737-746, 2005.

FALLARINO, F.; GROHMANN, U.; HWANG, K. W.; ORABONA, C.; VACCA, C.; BIANCHI, R.; BELLADONNA, M. L.; FIORETTI, M. C.; ALEGRE, M. L. & PUCETTI, P. **Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells.** *Nat. Immunol.*, 4(12), 1206-1212, 2003.

FEHÉRVARI, Z. & SAKAGUCHI, S. **CD4⁺ Tregs and immune control:** *J. Clin. Invest.*, 114(9), 1209-1217, 2004.

FIELD, E. H.; GAO, Q.; CHEN, N. X. & ROUSE, T. M. **Balancing the immune system for tolerance: a case for regulatory CD4 cells.** *Transplantation*, 64(1), 1-7, 1997.

FIELD, E. H.; MATESIC, D.; RIGBY, S.; FEHR, T.; ROUSE, T. & GAO, Q. **CD4⁺CD25⁺ regulatory cells in acquired MHC tolerance.** *Immunol. Rev.* 182, 99-112, 2001.

FONTENOT, J. D.; GAVIN, M. A.; RUDENSKY, A. Y.; CHEN, W. J.; JIN, W. W.; HARDEGEN, N.; LEI, K. J. & LI, L. **Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *Nat. Immunol.*, 4(4), 330-336, 2003.

FONTENOT, J. D.; RASMUSSEN, J. P.; WILLIAMS, L. K.; DOOLEY, J. L.; FARR, A. G. & RUDENSKY, A. **Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor Foxp3.** *Immunity*, 22, 329-341, 2005.

FORSTHUBER, T.; YIP, H. C. & LEHMANN, P. V. **Induction of Th1 and Th2 immunity in neonatal mice.** *Science*. 271, 1728-1730, 1996.

FUCS, R.; JESUS, J. T.; SOUZA JUNIOR, P. H. N.; FRANCO, L.; VERICIMO, M.; BELLIO, M. & NÓBREGA, A. **Frequency of natural regulatory CD4⁺CD25⁺ T lymphocytes determines the outcome of tolerance across fully mismatched MHC barrier through linked recognition of self and allogeneic stimuli.** *J. Immunol.*, 176(4), 2324-2329, 2006.

GAO, Q.; ROUSE, T. M. & FIELD, E. H. **CD4⁺CD25⁺ cells regulate CD8 cell anergy in neonatal tolerant mice.** *Transplantation*, 68(12), 1891-1897, 1999.

GARCIA, A. M.; FADEL, S. A.; CAO, S. & SARZOTTI, M. **T cell immunity in neonates.** *Immunol. Res.*, 22(2-3), 177-190, 2000.

GARIN, M. I.; CHU, C. C.; GOLSHAYAN, D.; CERNUDA-MOROLLÓN, E.; WAIT, R. & LECHLER, R. I. **Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4⁺CD25⁺ T cells.** *Blood*, 109(5), 2058-2065, 2007.

GAVIN, M. A.; RASMUSSEN, J. P.; FONTENOT, J. D.; VASTA, V.; MANGANIELLO, V. C.; BEAVO, J. A. & RUDENSKY, A. Y. **Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation.** *Nature*, 445(7129), 771-775, 2007.

GIORGINI, A. & NOBLE, A. **Blockade of chronic graft-versus-host disease by alloantigen-induced CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells in nonlymphopenic hosts.** *J. Leukoc. Biol.*, 82, 1053-1061, 2007.

GONDEK, D. C.; LU, L. F.; QUEZADA, S. A.; SAKAGUCHI, S. & NOELLE, R. J. **Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism.** *J. Immunol.*, 174(4), 1783-1786, 2005.

GONDEK, D. C.; DEVIRES, V.; NOWAK, E. C.; LU, L. F.; BENNET, K. A.; SCOTT, Z. A. & NOELLE, R. J. **Transplantation survival is maintained by granzyme B⁺ regulatory cells and adaptive regulatory T cells.** *J. Immunol.*, 181(7), 4752-4760, 2008.

GRACA, L.; LE MOINE, A.; LIN, C. Y.; FAIRCHILD, P. J.; COBBOLD, S. P. & WALDMANN, H. **Donor-specific transplantation tolerance: The paradoxical behavior of CD4⁺CD25⁺ T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 101(27), 10122-10126, 2004.

GRACA, L.; CHEN, T.; LE MOINE, A.; COBBOLD, S. P.; HOWIE, D. & WALDMANN, H. **Dominant tolerance: activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells.** *Trend. Immunol.*, 26(3), 130-135, 2005.

GREEN, E. A.; GORELIK, L.; MCGREGOR, C. M.; TRAN, E. H. & FLAVELL, R. A. **CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells control anti-islet CD8⁺ T cells through TGF- β -TGF- β receptor interactions in type 1 diabetes.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 100(19), 10878-10883, 2003.

GUO, F.; ICLOZAN, C.; SUH, W.; ANASETTI, C. & YU, X. **CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naïve CD4 T cells.** *J. Immunol.*, 181(4), 2285-2291, 2008.

HALE, J. S.; BOURSALIAN, T. E.; TURK, G. L. & FINK, P. J. **Thymic output in aged mice.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(22), 8447-8452, 2006.

HSIEH, C.; LIANG, Y.; TYZNIK, A. J.; SELF, S. G.; LIGGITT, D. & RUDENSKY, A. Y. **Recognition of the peripheral self by naturally arising CD25⁺CD4⁺ T cell receptors.** *Immunity*, 21(2), 267-277, 2004.

HSIEH, C.; ZHENG, Y.; LIANG, Y.; FONTENOT, J. D. & RUDENSKY, A. Y. **An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires.** *Nat. Immunol.*, 7(4), 401-410, 2006.

HUANG, C. T.; WORKMAN, C. J.; FLIES, D.; PAN, X.; MARSON, A. L.; ZHOU, G.; HIPKISS, E. L.; RAVI, S.; KOWALSKI, J.; LEVITSKY, H. I.; POWELL, J. D.; PARDOLL, D. M.; DRAKE, C. G. & VIGNALI, D. A. **Role of LAG-3 in regulatory T cells.** *Immunity*, 21(4), 503-513, 2004.

ITOH, M.; TAKAHASHI, T.; SAKAGUCHI, N.; KUNIYASU, Y.; SHIMIZU, J.; OTSUKA, F. & SAKAGUCHI, S. **Thymus and autoimmunity: production of CD25⁺CD4⁺ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance.** *J. Immunol.*, 162(9), 5317-5326, 1999.

JOETHAM, A.; TAKEDA, K.; MIYAHARA, N.; MATSUBARA, S.; KOYA, T.; RHA, Y. H.; DAKHAMA, A. & GELFAND, E. W. **Naturally occurring lung CD4⁺CD25⁺ T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF- β .** *J. Immunol.*, 178(3), 1433-1442, 2007.

JOFFRE, O. & VAN MEERWIJK, J. P. M. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in bone marrow transplantation.** *Semin. Immunol.*, 18, 128-135, 2006.

JONULEIT, H.; ADEMA, G. & SCHMITT, E. **Immune regulation by regulatory T cells: implications for transplantation.** *Transpl. Immunol.*, 11, 267-276, 2003.

JORDAN, M. S.; BOESTEANU, A.; REED, A. J.; PETRONE, A. L.; HOLENBECK, A. E.; LERMAN, M. A.; NAJI, A. & CATON, A. J. **Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide.** *Nat. Immunol.*, 2(4), 301-306, 2001.

KARIM, M.; KINGSLEY, C. I.; BUSHELL, A. R.; SAWITZKI, B. S. & WOOD, K. J. **Alloantigen-induced CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells can develop in vivo from CD25⁻CD4⁺ precursors in a thymus-independent process.** *J. Immunol.*, 172, 923-928, 2004.

KIM, J. M.; RASMUSSEN, J. P. & RUDENSKY, A. Y. **Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice.** *Nat. Immunol.*, 8(2), 191-197, 2006.

KOENEN, H. J. P. M.; FASSE, E. & JOOSTEN, I. **IL-15 and cognate antigen successfully expand de novo-induced human antigen-specific regulatory CD4⁺ T cells that require antigen-specific activation for suppression.** *J. Immunol.*, 171, 6431-6441, 2003.

KOMATSU, N.; MARIOTTI-FERRANDIZ, M. E.; WANG, Y.; MALISSEN, B.; WALDMANN, H. & HORI, S. **Heterogeneity of natural Foxp3⁺ T cells: a committed regulatory T-cell lineage and an uncommitted minor population retaining plasticity.** Proc. Natl. Acad. Sci., 106(6), 1903-1908, 2009.

KONG, Y.; ETO, M.; OMOTO, K.; UMESUE, M.; HASHIMOTO, A. & NOMOTO, K. **Regulatory T cells in maintenance and reversal of peripheral tolerance in vivo.** J. Immunol., 157, 5284-5289, 1996.

KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M. & KUCHROO, V. K. **IL-17 and Th17 cells.** Annu. Rev. Immunol., 27, 485-517, 2009.

KYEWSKI, B. & DERBINSKI, J. **Self-representation in the thymus: an extended view.** Nat. Rev. Immunol., 4(9), 688-698, 2004.

LA CAVA, A.; KAER, L. V. & FU-DONG-SHI. **CD4⁺CD25⁺ Tregs and NKT cells: regulators regulating regulators.** Trend. Immunol., 27(7), 322-327, 2006.

LARKIN III, J.; RANKIN, A. L.; PICCA, C. C.; RILEY, M. P.; JENKS, S. A.; SANT, A. J. & CATON, A. J. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell repertoire formation shaped by differential presentation of peptides from a self-antigen.** J. Immunol., 180(4), 2149-2157, 2008.

LATHROP, S. K.; SANTACRUZ, N. A.; PHAM, D.; LUO, J. & HSIEH, C. **Antigen-specific peripheral shaping of the natural regulatory T cell population.** J. Exp. Med., 205(13), 3105-3117, 2008.

LE CAMPION, A.; BOURGEOIS, C.; LAMBOLEZ, F.; MARTIN, B.; LÉAUMENT, S.; DAUTIGNY, N.; TANCHOT, C.; PÉNIT, C. & LUCAS, B. **Naive T cells proliferate strongly in neonatal mice in response to self-peptide/self-MHC complexes.** Proc. Natl. Acad. Sci., 99(7), 4538-43, 2002.

LECHLER, R. I.; GARDEN, O. A. & TURKA, L. A. **The complementary roles of deletion and regulation in transplantation tolerance.** Nat. Rev. Immunol., 3(2), 147-158, 2003.

LE DOUARIN, N.; CORBEL, C.; BANDEIRA, A.; THOMAS-VASLIN, V.; MODIGLIANI, Y.; COUTINHO, A. & SALAÜN, J. **Evidence for a thymus-dependent form of tolerance that is not based on elimination or anergy of reactive T cells.** Immunol. Rev., 149, 35-53, 1996.

LERMAN, M. A.; LARKIN III, J.; COZZO, C.; JORDAN, M. & CATON, A. J. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T cell repertoire formation in response to varying expression of a neo-self-antigen.** J. Immunol., 173(1), 236-244, 2004.

LIANG, B.; WORKMAN, C.; LEE, J.; CHEW, C.; DALE, B. M.; COLONNA, L.; FLORES, M.; LI, N.; SCHWEIGHOFFER, E.; GREENBERG, S.; TYBULEWICZ, V.; VIGNALI, D. & CLYNES, R. **Regulatory T cells inhibit dendritic cells**

by lymphocyte activation gene-3 engagement of MHC class II. *J. Immunol.*, 180(9), 5916-5926, 2008.

LIANG, S.; ALARD, P.; ZHAO, Y.; PARNELL, S.; CLARK, S. L. & KOSIEWICZ, M. M. **Conversion of CD4⁺CD25⁻ cells into CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in vivo requires B7 costimulation, but not the thymus.** *J. Exp. Med.*, 201(1), 127-137, 2005.

LIMMER, A.; OHL, J.; KURTS, C.; LJUNGGREN; H. G.; REISS, Y.; GROETTRUP, M.; MOMBURG, F.; ARNOLD, B. & KNOLLE, P. A. **Efficient presentation of exogenous antigen by liver endothelial cells to CD8 T cells results in antigen-specific T-cell tolerance.** *Nat. Med.*, 6, 1348-1354, 2000.

LIO, C. J. & HSIEH, C. **A two-step process for thymic regulatory T cell development.** *Immunity*, 28(1), 100-111, 2008.

LISTON, A.; FARR, A. C.; CHEN, Z.; BENOIST, C.; MATHIS, D.; MANLEY, N. R. & RUDENSKY, A. Y. **Lack of Foxp3 function and expression in the thymic epithelium.** *J. Exp. Med.*, 204(3), 475-780, 2007.

LIU, G. & ZHAO, Y. **Toll-like receptors and immune regulation: their direct and indirect modulation on regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells.** *Immunology*, 122, 149-156, 2007.

LIU, G.; BURNS, S.; HUANG, G.; BOYD, K.; PROIA, R. L.; FLAVELL, R. A. & CHI, H. **The receptor S1P₁ overrides regulatory T cell-mediated immune suppression through Akt-mTOR.** *Nat. Immunol.*, 10(7), 769-777, 2009.

LIU, H.; KOMAI-KOMA, M.; XU, D. & LIEW, F. Y. **Toll-like receptor 2 signaling modulates the functions of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(18), 7048-7053, 2006.

LIU, Y.; AMARNATH, S. & CHEN, W. **Requirement of CD28 signaling in homeostasis/survival of TGF- β converted CD4⁺CD25⁺ Tregs from thymic CD4⁺CD25⁻ single positive T cells.** *Transplantation*, 82, 953-964, 2006.

LIU, Y.; ZHANG, P.; LI, J.; KULKARNI, A. B.; PERRUCHE, S. & CHEN, W. **A critical function for TGF- β signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.** *Nat. Immunol.*, 9(6), 632-640, 2008.

MAGGI, E.; COSMI, L.; LIOTTA, F.; ROMAGNANI, P.; ROMAGNANI, S. & ANNUNZIATO, F. **Thymic regulatory T cells.** *Autoimmun. Rev.*, 4(8), 579-586, 2005.

MARSON, A.; KRETSCHMER, K.; FRAMPTON, G. M.; JACOBSEN, E. S.; POLANSKY, J. K.; MACLSAAC, K. D.; LEVINE, S. S.; FRAENKEL, E.; VON BOEHMER, H. & YOUNG, R. A. **Foxp3 occupancy and regulation of key**

target genes during T-cell stimulation. *Nature*, 445(22), 931-935, 2007.

MARTIN, C.; OHKI-HAMAZAKI, H.; CORBEL, C.; COLTEY, M. & LE DOUARIN, N. M. **Successful xenogeneic transplantation in embryos: induction of tolerance by extrathymic chick tissue grafted into quail.** *Dev. Immunol.*, 1(4), 265-277, 1991.

MATHIS, D. & BENOIST, C. **Aire.** *Annu. Rev. Immunol.*, 27, 287-312, 2009.

MELLOR, A. L. & MUNN, D. H. **IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism.** *Nat. Rev. Immunol.*, 4(10), 762-774, 2004.

MIN, B.; MCHUGH, R.; SEMPOWSKI, G. D.; MACKALL, C.; FOUCRAS, G. & PAUL, W. E. **Neonates support lymphopenia-induced proliferation.** *Immunity*, 18(1), 131-140, 2003.

MIN, B. & PAUL, W. E. **Endogenous proliferation: Burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings.** *Semin. Immunol.*, 17(3), 201-207, 2005.

MIN, B.; YAMANE, H.; HU-LI, J. & PAUL, W. E. **Spontaneous and homeostatic proliferation of CD4 T cells are regulated by different mechanisms.** *J. Immunol.*, 174(10), 6039-6044, 2005.

MISRA, N.; BAYRY, J.; LACROIX-DESMAZES, S.; KAZATCHKINE, M. D. & KAVERI, S. V. **Cutting edge: human CD4⁺CD25⁺ T cells restrain the maturation and antigen-presenting function of dendritic cells.** *J. Immunol.*, 172(8), 4676-4680, 2004.

MIYARA, M. & SAKAGUCHI, S. **Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression.** *Trend. Mol. Med.*, 13(3), 108-116, 2007.

MODIGLIANI, Y.; THOMAS-VASLIN, V.; BANDEIRA, A.; COLTEY, M.; LE DOUARIN, N. M.; COUTINHO, A. & SALAÜN, J. **Lymphocytes selected in allogeneic thymic epithelium mediate dominant tolerance toward tissue grafts of the thymic epithelium haplotype.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92, 7555-7559, 1995.

MODIGLIANI, Y.; PEREIRA, P.; THOMAS-VASLIN, V.; SALAÜN, J.; BURLLEN-DEFRAUX, O.; COUTINHO, A.; LE DOUARIN, N. & BANDEIRA, A. **Regulatory T cells in thymic epithelium-induced tolerance. I. Suppression of mature peripheral non-tolerant T cells.** *Eur. J. Immunol.*, 25(9), 2563-2571, 1995.

MODIGLIANI, Y.; BANDEIRA, A. & COUTINHO, A. **A model for developmentally acquired thymus-dependent tolerance to central and peripheral antigens.** *Immunol. Rev.*, 149(1), 155-174, 1996.

MODIGLIANI, Y.; COUTINHO, A.; PEREIRA, P.; LE DOUARIN, N.; THOMAS-VASLIN, V.; BURLLEN-DEFRAUX, O.; SALAÜN, J. & BANDEIRA, A.

Establishment of tissue-specific tolerance is driven by regulatory T cells selected by thymic epithelium. Eur. J. Immunol., 26(8), 1807-1815, 1996.

MOLITOR-DART, M. L.; ANDRASSY, J.; KWUN, J.; KAYAOGU, H. A.; ROENNEBURG, D. A.; HAYNE, L. D.; TORREALBA, J. R.; BOBADILLA, J. L.; SOLLINGER, H. W.; KNECHTLE, S. J. & BURLINGHAM, W. J. **Developmental exposure to noninherited maternal antigens induces CD4⁺ T regulatory cells: relevance to mechanism of heart allograft tolerance.** J. Immunol., 179(10), 6749-6761, 2007.

MORELLI, A. E. & THOMSON, A. W. **Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplantation tolerance.** Nat. Rev. Immunol., 7(8), 610-621, 2007.

MOSER, M. **Dendritic cells in immunity and tolerance - do they display opposite functions?** Immunity, 19(1), 5-8, 2003.

MOSES, C. T.; THORSTENSON, K. M.; JAMESON, S. C. & KHORUTS, A. **Competition for self ligands restrains homeostatic proliferation of naive CD4 T cells.** Proc. Natl. Acad. Sci., 100(3), 1185-1190, 2003.

MUCIDA, D.; PARK, Y.; KIM, G.; TUROVSKAYA, O.; SCOTT, I.; KRONENBERG, M. & CHEROUTRE, H. **Reciprocal Th17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid.** Science, 317(5835), 256-260, 2007.

MIN, B. & PAUL, W. E. **Endogenous proliferation: burst-like CD4 T cell proliferation in lymphopenic settings.** Semin. Immunol., 17(3), 201-207, 2005

MIYARA, M. & SAKAGUCHI, S. **Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression.** Trends Mol. Med., 13, 108-116, 2007.

MUTHUKKUMAR, S.; GOLDSTEIN, J. & STEIN, K. E. **The ability of B cells and dendritic cells to present antigen increases during ontogeny.** J. Immunol., 165(9), 4803-4813, 2000.

NAKAMURA, K.; KITANI, A. & STROBER, W. **Cell contact-dependent immunosuppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor β .** J. Exp. Med., 194(5), 629-644, 2001.

NETEA, M. G.; SUTMULLER, R.; HERMANN, C.; VAN DER GRAAF, C. A.; VAN DER MEER, J. W.; VAN KRIEKEN, J. H.; HARTUNG, T.; ADEMA, G. & KULLBERG, B. J. **Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells.** J. Immunol., 172(6), 3712-3718, 2004.

NISHIMURA, E.; SAKIHAMA, T.; SETOGUCHI, R.; TANAKA, K. & SAKAGUCHI, S. **Induction of antigen-specific immunologic tolerance by *in vivo* and *in vitro* antigen-specific expansion of naturally arising**

Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells. *Int. Immunol.*, 16, 1189–201, 2004.

NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. **Foxp3 and Aire in thymus-generated Treg cells: a link in self-tolerance.** *Nat. Immunol.*, 8(4), 333-334, 2007.

OCHS, H. D.; GAMBINERI, E. & TORGERSON, T. R. **IPEX, FOXP3 and regulatory T cells: a model for autoimmunity.** *Immunol. Res.*, 38(1-3), 112-121, 2007.

OHKI, H.; MARTIN, C.; COLTEY, M. & LE DOUARIN, N. M. **Implants of quail thymic epithelium generate permanent tolerance in embrionically constructed quail/chick chimeras.** *Development*, 104, 619-630, 1988.

OPIELA, S. J.; KORU-SENGUL, T. & ADKINS, B. **Murine neonatal recent thymic emigrants are phenotypically and functionally distinct from adult recent thymic emigrants.** *Blood*, 113(22), 5635-5643, 2009.

OSORIO, F.; LEIBUNDGUT-LANDMANN, S.; LOCHNER, M.; LAHL, K.; SPARWASSER, T.; EBERL, G. & REIS E SOUZA, C. **DC activated via dectin-1 convert Treg into IL-17 producers.** *Eur. J. Immunol.*, 38, 3274-3281, 2008.

PACHOLCZYK, R.; KRAJ, P. & IGNATOWICZ, L. **Peptide specificity of thymic selection of CD4⁺CD25⁺ T cells.** *J. Immunol.*, 168(2), 613-620, 2002.

PACHOLCZYK, R.; IGNATOWICZ, H.; KRAJ, P. & IGNATOWICZ, L. **Origin and T cell receptor diversity of Foxp3⁺CD4⁺CD25⁺ T cells.** *Immunity*, 25(2), 249-259, 2006.

PACHOLCZYK, R. & KERN, J. **The T-cell receptor repertoire of regulatory T cells.** *Immunology*, 125(4), 450-458, 2008.

PANDIYAN, P.; ZHENG, L.; ISHIHARA, S.; REED, J. & LENARDO, M. J. **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4⁺ T cells.** *Nat. Immunol.*, 8(12), 1353-1362, 2007.

PASARE, C. & MEDZHITOV, R. **Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells.** *Science*, 299, 1033-1036, 2003.

PENG, G.; GUO, Z.; KINIWA, Y.; VOO, K. S.; PENG, W.; FU, T.; WANG, D. Y.; LI, Y.; WANG, H. Y. & WANG, R. **Toll-like receptor 8-mediated reversal of CD4⁺ regulatory T cell function.** *Science*, 309, 1380-1384, 2005.

PENNINGTON, D. J.; SILVA-SANTOS, B.; SILBERZAHN, T.; ESCÓRCIO-CORREIA, M.; WOODWARD, M.; ROBERTS, S. J.; SMITH, A. L., DYSON, P. J.

& HAYDAY, A. C. **Early events in the thymus affect the balance of effector and regulatory T cells.** *Nature*, 444(21), 1073-1077, 2006.

QIN, S.; COBBOLD, S. P.; POPE, H.; ELLIOTT, J.; KIOUSSIS, D.; DAVIES, J. & WALDMANN, H. **"Infectious" transplantation tolerance.** *Science*, 259(5097), 974-977, 1993.

QURESHI, M. H. & GARVY, B. A. **Neonatal T cells in an adult lung environment are competent to resolve *Pneumocystis carinii* pneumonia.** *J. Immunol.*, 166(9), 5704-5711, 2001.

READ, S.; MALMSTROM, V. & POWRIE, F. **Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells that control intestinal inflammation.** *J. Exp. Med.*, 192(2), 295-302, 2000.

REIBKE, R.; GARBI, N.; GANSS, R.; HÄMMERLING, G. J.; ARNOLD, B. & OELERT, T. **CD8⁺ regulatory T cells generated by neonatal recognition of peripheral self-antigen.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 103(41), 15142-15147, 2006.

REIS E SOUZA, C. **Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity.** *Curr. Opin. Immunol.*, 16(1), 21-25, 2004.

RIBOT, J.; ROMAGNOLI, P. & VAN MEERWIJK, J. P. M. **Agonist ligands expressed by thymic epithelium enhance positive selection of regulatory T lymphocytes from precursors with a normally diverse TCR repertoire.** *J. Immunol.*, 177(2), 1101-1107, 2006.

RIBOT, J.; ENAULT, G.; PILIPENKO, S.; HUCHENQ, A.; CALISE, M.; HUDRISIER, D.; ROMAGNOLI, P. & VAN MEERWIJK, J. P. M. **Shaping of the autoreactive regulatory T cell repertoire by thymic cortical positive selection.** *J. Immunol.*, 179(10), 6741-6748, 2007.

RIDGE, J. P.; FUCHS, E. J. & MATZINGER, P. **Neonatal tolerance revisited: turning on newborn T cells with dendritic cells.** *Science*, 271, 1723-1726, 1996.

RIVIERA, J.; PROIA, R. L. & OLIVEIRA, A. **The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity.** *Nat. Rev. Immunol.*, 8, 753-763, 2008.

ROMAGNANI, S. **State-of-the-art-review: Regulation of the T cell response.** *Clin. Exp. Allergy*, 36, 1357-1366, 2006.

RONCAROLO, M. & BATTAGLIA, M. **Regulatory T-cell immunotherapy for tolerance to self antigens and alloantigens in humans.** *Nat. Rev. Immunol.*, 7, 585-598, 2007.

RONCAROLO, M. G. & GREGORI, S. **The validity of Foxp3 to define human and mouse regulatory T cells. Is FOXP3 a *bona fide* marker for human regulatory T cells?** *Eur. J. Immunol.*, 38, 925-927, 2008.

RUBTSOV, Y. P.; RASMUSSEN, J. P.; CHI, E. Y.; FONTENOT, J.; CASTELLI, L.; YE, X.; TREUTING, P.; SIEWE, L.; ROERS, A.; HENDERSON JR., W. R.; MULLER, W. & RUDENSKY, A. Y. **Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces.** *Immunity*, 28(4), 546-558, 2008.

SAKAGUCHI, S.; SAKAGUCHI, N.; ASANO, M.; ITOH, M. & TODA, M. **Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor α -chains. Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases.** *J. Immunol.*, 155(3), 1151-1164, 1995.

SAKAGUCHI, S. **Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses.** *Annu. Rev. Immunol.*, 22, 531-562, 2004.

SAKAGUCHI, S. **Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self.** *Nat. Immunol.*, 6(4), 345-352, 2005.

SAKAGUCHI, S.; ONO, M.; SETOGUCHI, R.; YAGI, H.; HORI, S.; FEHÉRVARI, Z.; SHIMIZU, J.; TAKAHASHI, T. & NOMURA, T. **Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease.** *Immunol. Rev.*, 212, 8-27, 2006.

SAKAGUCHI, S.; YAMAGUCHI, T.; NOMURA, T. & ONO, M. **Regulatory T cells and immune tolerance.** *Cell*, 133, 775-787, 2008.

SALOMON, B.; LENSCHOW, D. J.; RHEE, L.; ASHOURIAN, N.; SINGH, B.; SHARPE, A. & BLUESTONE, J. A. **B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes.** *Immunity*, 12(4), 431-440, 2000.

SARZOTTI, M.; ROBBINS, D. S. & HOFFMAN, P. M. **Induction of protective CTL responses in newborn mice by a murine retrovirus.** *Science*, 271, 1726-1728, 1996.

SCOLLAY, R. G.; BUTCHER, E. C. & WEISSMAN, I. L. **Thymus cell migration. Quantitative aspects of cellular traffic from the thymus to the periphery in mice.** *Eur. J. Immunol.*, 10, 210-218, 1980.

SCOLLAY, R. **Thymus cell migration: cells migrating from thymus to peripheral lymphoid organs have a "mature" phenotype.** *J. Immunol.*, 128(4), 1566-1570, 1982.

SCOLLAY, R.; CHEN, W. & SHORTMAN, K. E. N. **The functional capabilities of cells leaving the thymus.** *J. Immunol.*, 132, 25-30, 1984.

SEDDON, B. & MASON, D. **Peripheral autoantigen induces regulatory T cells that prevent autoimmunity.** *J. Exp. Med.*, 189(5), 877-881, 1999.

SHARMA, R.; SUNG, S. J.; FU, S. M. & JU, S. **Regulation of multi-organ inflammation in the regulatory T cell-deficient scurfy mice.** *J. Biom. Sci.*, 16(20), 1-8, 2009.

SHEVACH, E. M. **CD4⁺CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers.** *Nat. Rev. Immunol.*, 2(6), 389-400, 2002.

SHI, H. Z. & QIN, X. J. **CD4⁺CD25⁺ regulatory T lymphocytes in allergy and asthma.** *Allergy*, 60, 986-995, 2005.

STARR, T. K., JAMESON, S. C. & HOGQUIST, K. A. **Positive and negative selection of T cells.** *Annu. Rev. Immunol.*, 21(1), 139-176, 2003.

STOCKINGER, B.; BARTHLOTT, T. & KASSIOTIS, G. **The concept of space and competition in immune regulation.** *Immunology*, 111(3), 241-247, 2004.

STOCKINGER, B.; KASSIOTIS, G. & BOURGEOIS, C. **Homeostasis and T cell regulation.** *Curr. Opin. Immunol.*, 16(6), 775-779, 2004.

STUTMAN, O. **Intrathymic and extrathymic T cell maturation.** *Immunol. Rev.*, 42, 138-184, 1978.

SUN, C.; HALL, J. A.; BLANK, R. B.; BOULADOUX, N.; OUKKA, M.; MORA, J. R. & BELKAID, Y. **Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 Treg cells via retinoic acid.** *J. Exp. Med.*, 204(8), 1775-1785, 2007.

SURI-PAYER, E.; AMAR, A. Z.; THORNTON, A. M. & SHEVACH, E. M. **CD4⁺CD25⁺ T cells inhibit both the induction and effector function of autoreactive T cells and represent a unique lineage of immunoregulatory cells.** *J. Immunol.*, 160(3), 1212-1218, 1998.

SUTMULLER, R. P. M.; DEN BROEK, M. H. M. G. M.; KRAMER, M.; BENNINK, E. J.; TOONEN, L. W. J.; KULLBERG, B.; JOOSTEN, L. A.; AKIRA, S.; NETEA, M. G. & ADEMA, G. J. **Toll-like receptor 2 controls expansion and function of regulatory T cells.** *J. Clin. Invest.*, 116(2), 485-494, 2006.

TAI, X.; COWAN, M.; FEIGENBAUM, L. & SINGER, A. **CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2.** *Nat. Immunol.*, 6(2), 152-162, 2005.

TAKEDA, S.; RODEWALD, H. R.; ARAKAWA, H.; BLUETHMANN, H. & SHIMIZU, T. **MHC class II molecules are not required for survival of newly generated CD4⁺ T cells, but affect their long-term life span.** *Immunity*, 5(3), 217-228, 1996.

TARBELL, K. V., YAMAZAKI, S. & STEINMAN, R. M. **The interactions of dendritic cells with antigen-specific, regulatory T cells that suppress autoimmunity.** *Semin. Immunol.*, 18(2), 93-102, 2006.

THORNTON, A. M. & SHEVACH, E. M. **CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation *in vitro* by inhibiting interleukin 2 production.** J. Exp. Med., 188(2), 287-296, 1998.

THORNTON, A. M. & SHEVACH, E. M. **Suppressor effector function of CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells is antigen-nonspecific.** J. Immunol., 164, 183-190, 2000.

TIEMESSEN, M. M.; JAGGER, A. L.; EVANS, H. G.; VAN HERWIJNEN, M. J. C.; JOHN, S. & TAAMS, L. S. **CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells induce alternative activation of human monocytes/macrophages.** Proc. Natl. Acad. Sci., 104(49), 19446-19451, 2007.

TORCHINSKY, M. B.; GARAUDE, J.; MARTIN, A. P. & BLANDER, J. M. **Innate immune recognition of infected apoptotic cells directs Th17 cell differentiation.** Nature, 458(7234), 78-82, 2009.

TROY, A. E. & SHEN, H. Cutting edge: **Homeostatic proliferation of peripheral T lymphocytes is regulated by clonal competition.** J. Immunol., 170(2), 672-676, 2003.

TURNQUIST, H. R.; RAIMONDI, G.; ZAHORCHAK, A. F.; FISCHER, R. T.; WANG, Z. & THOMSON, A. W. **Rapamycin-conditioned dendritic cells are poor stimulators of allogeneic CD4⁺ T cells, but enrich for antigen-specific Foxp3⁺ T regulatory cells and promote organ transplant tolerance.** J. Immunol., 178, 7018-7031, 2007.

VANASEK, T. L.; NANDIWADA, S. L.; JENKINS, M. K. & MUELLER, D. L. **CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells facilitate CD4⁺ T cell clonal anergy induction during the recovery from lymphopenia.** J. Immunol., 176, 5880-5889, 2006.

VAN DER VLIET, H. J. J. & NIEUWENHUIS, E. E. **IPEX as a result of mutations in FOXP3.** Clin. Dev. Immunol., 2007(89017), 1-5, 2007.

VAN MAURIK, A.; HERBER, M.; WOOD, K. J. & JONES, N. D. **Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ alloantigen-specific immunoregulatory cells that can prevent CD8⁺ T cell-mediated graft rejection: implications for anti-CD154 immunotherapy.** J. Immunol., 169, 5401-5404, 2002.

VELÁSQUEZ-LOPERA, M. M.; EATON, V. L.; LERRET, N. M.; CORREA, L. A.; DeCRESCCE, R. P.; GARCÍA, L. F. & JARAMILLO, A. **Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.** Transpl. Immunol., 19, 127-135, 2008.

VIGNALI, D. A. A.; COLLISON, L. W. & WORKMAN, C. J. **How regulatory T cells work.** Nat. Rev. Immunol., 8(7), 523-532, 2008.

VOO, K. S.; WANG, Y. H.; SANTORI, F. R.; BOGGIANO, C.; WANG, Y. H.; ARIMA, K.; BOVER, L.; HANABUCHI, S.; KHALILI, J.; MARINOVA, E.; ZHENG, B.; LITTMAN, D. R. & LIU, Y. J. **Identification of IL-17**

producing FOXP3⁺ regulatory T cells in humans. Proc. Natl. Acad. Sci., 106(12), 4793-4798, 2009.

WALDMANN, H. & COBBOLD, S. **How do monoclonal antibodies induce tolerance? A role for infectious tolerance?** Ann. Rev. Immunol., 16(1), 619-644, 1998.

WALDMANN, H.; ADAMS, E.; FAIRCHILD, P. J. & COBBOLD, S. **Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue.** Immunol. Rev., 212, 301-313, 2006.

WALSH, P. T.; TAYLOR, D. K. & TURKA, L. A. **Tregs and transplantation tolerance.** J. Clin. Invest., 114(10), 1398-1403, 2004.

WAN, Y. Y. & FLAVELL, R. A. **Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression.** Nature, 445(15), 776-780, 2007.

WEAVER, C. T.; HARRINGTON, L. E.; MANGAN, P. R.; GAVRIELI, M. & MURPHY, K. M. **Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties.** Immunity, 24, 677-688, 2006.

WILLEMS, F.; VOLLSTEDT, S. & SUTER, M. **Phenotype and function of neonatal DC.** Eur. J. Immunol., 39, 26-35, 2009.

WILLIAMS, L. M. & RUDENSKY, A. Y. **Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3.** Nat. Immunol., 8(3), 277-284, 2007.

WING, K.; ONISHI, Y.; PRIETO-MARTIN, P.; YAMAGUCHI, T.; MIYARA, M.; FEHERVARI, Z.; NOMURA, T. & SAKAGUCHI, S. **CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function.** Science, 322, 271-275, 2008.

WIRNSBERGER, G.; MAIR, F. & KLEIN, L. **Regulatory T cell differentiation of thymocytes does not require a dedicated antigen-presenting cell but is under T cell-intrinsic developmental control.** Proc. Natl. Acad. Sci., 106(25), 10278-10283, 2009.

WONG, J.; OBST, R.; CORREIA-NEVES, M.; LOSYEV, G.; MATHIS, D. & BENOIST, C. **Adaptation of TCR repertoires to self-peptides in regulatory and nonregulatory CD4⁺ T cells.** J. Immunol., 178(11), 7032-7041, 2007.

WOOD, K. J. & SAKAGUCHI, S. **Regulatory T cells in transplantation tolerance.** Nat. Rev. Immunol., 3(3), 199-210, 2003.

YAMAZAKI, S.; PATEL, M.; HARPER, A.; BONITO, A.; FUKUYAMA, H.; PACK, M.; TARBELL, K. V.; TALMOR, M.; RAVETCH, J. V.; INABA, K. & STEINMAN, R. M. **Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3⁺CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction.** Proc. Natl. Acad. Sci., 103(8), 2758-2763, 2006.

YANG, X. O.; NURIEVA, R.; MARTINEZ, G. J.; KANG, H. S.; CHUNG, Y.; PAPPU, B. P.; SHAH, B.; CHANG, S. H.; SCHLUNS, K. S.; WATOWICH, S. S.; FENG, X. H.; JETTEN, A. M. & DONG, C. **Molecular antagonism and plasticity of regulatory and inflammatory T cell programs.** *Immunity*, 29(1), 44-56, 2008.

ZAREK, P. E.; HUANG, C. T.; LUTZ, E. R.; KOWALSKI, J.; HORTON, M. R.; LINDEN, J.; DRAKE, C. G. & POWELL, J. D. **A₂A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells.** *Blood*, 111(1), 251-259, 2008.

ZELENAY, S.; LOPES-CARVALHO, T.; CARAMALHO, I.; MORAES-FONTES, M. F.; REBELO, M. & DEMENGEOT, J. **Foxp3⁺CD25⁻CD4⁺ T cells constitute a reservoir of committed regulatory T cells that regain CD25 expression upon homeostatic expansion.** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 102(11), 4091-4096, 2005.

ZENG, M.; GUINET, E. & NOURI-SHIRAZI, M. **B7-1 and B7-2 differentially control peripheral homeostasis of CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells.** *Transpl. Immunol.*, 20(3), 171-179, 2009.

ZHENG, S. G.; WANG, J.; WANG, P.; GRAY, J. D. & HORWITZ, D. A. **IL-2 is essential for TGF- β to convert naïve CD4⁺CD25⁻ cells to CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells and for expansion of these cells.** *J. Immunol.*, 178(4), 2018-2027, 2007.

ZHENG, Y. & RUDENSKY, A. Y. **Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage.** *Nat. Immunol.*, 8(5), 457-462, 2007.

ZHENG, X. X.; SANCHEZ-FUEYO, A.; DOMENIG, C. & STROM, T. B. **The balance of deletion and regulation in allograft tolerance.** *Immunol. Rev.*, 196, 75-84, 2003.

ZHOU, L.; LOPES, J. E.; CHONG, M. M.; IVANOV, I. I.; MIN, R.; VICTORA, G. D.; SHEN, Y.; DU, J.; RUBTSOV, Y. P.; RUDENSKY, A. Y.; ZIEGLER, S. F. & LITTMAN, D. R. **TGF- β -induced Foxp3 inhibits Th17 cell differentiation by antagonizing ROR γ t function.** *Nature*, 453(7192), 236-240, 2008.

ZHOU, L.; CHONG, M. M. W. & LITTMAN, D. R. **Plasticity of CD4⁺ T cell lineage differentiation.** *Immunity*, 30, 646-655, 2009.

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](#)