

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA



**Rodolfo Thomé**

**Modulação da artrite experimental induzida pela associação de  
colágeno tipo II e ovalbumina**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Rodolfo Thomé  
Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia para obtenção do Título de  
Mestre em Genética e Biologia  
Molecular, na área de Imunologia.

Orientadora: Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro  
Co-Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Ucelli Simioni

Campinas, 2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
ROBERTA CRISTINA DAL' EVEDOVE TARTAROTTI – CRB8/7430  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

T36m	<p>Thomé, Rodolfo, 1987- Modulação da artrite experimental induzida pela associação de colágeno tipo II e ovalbumina / Rodolfo Thomé. – Campinas, SP: [s.n.], 2011.</p> <p>Orientador: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.</p> <p>1. Artrite experimental. 2. Citocinas. 3. Células T reguladoras. 4. Células dendríticas. 5. Tolerância oral. I. Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.</p>
------	---

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Modulation of experimental arthritis induced by the association of ovalbumin and type II collagen

**Palavras-chave em Inglês:**

Experimental arthritis

Cytokines

Regulatory T cells

Dendritic cells

Oral tolerance

**Área de concentração:** Imunologia

**Titulação:** Mestre em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro [Orientador]

Dagmar Ruth Stach Machado

Alexandrina Sartori

**Data da defesa:** 22-07-2011

**Programa de Pós Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 22 de julho de 2011

**BANCA EXAMINADORA**

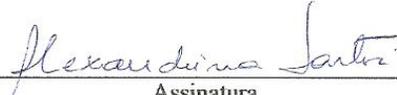
Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

  
Assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Profa. Dra. Alexandrina Sartori

  
Assinatura

Prof. Dr. Ronei Luciano Mamoni

  
Assinatura

Profa. Dra. Maria Marluce dos Santos Vilela

\_\_\_\_\_  
Assinatura

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação do Departamento de Genética, Evolução e Bioagentes da Universidade Estadual de Campinas, contando com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo.

Ao que está assentado sobre o trono e ao Cordeiro sejam dadas ações de graças, e honra, e glória, e poder para todo o sempre.

Apocalipse 5:13

Ao meu Deus, por todas as  
bênçãos, por tudo o que tens feito e  
tudo o que há de fazer.

À minha noiva Luciana,  
meus pais e familiares, por todo  
apoio e companheirismo.

## AGRADECIMENTOS

O mestrado não foi apenas um curso que me garantiu um título, foi uma fase, uma etapa de transformação na minha vida. Uma pessoa entrou no programa de pós-graduação em março de 2009 e outra melhor saiu em julho de 2011. Aqui agradeço, de coração, a todas as pessoas que estiveram presentes nas horas alegres e tristes. Aquelas que me aconselharam e aquelas que, em silêncio, disseram mais do que palavras. **MUITO OBRIGADO.**

Ao meu Deus. Companheiro, consolador, médico, amigo, pai. Ele é FIEL, mesmo quando não sou. Nada disso seria possível sem que Ele permitisse.

À minha noiva, Luciana, que me ensinou, e ensina, muito. Pelos momentos de descontração, pelas conversas. Pelo amor verdadeiro.

Aos meus pais, Valter e Jandira, por me conceber, educar, sustentar, financiar e acreditar em meu potencial. Por tudo o que tenho conquistado, agradeço a Deus por suas vidas e por ter me deixado com pais tão importantes e zelosos.

Aos meus sogros, João e Maria.

Aos meus irmãos, Ana, Ednaldo e Ricardo, e seus respectivos cônjuges, Mura, Eliana e Denise.

À minha orientadora, Profa Wirla Tamashiro, por ser mais que uma orientadora e ter me ensinado com bom ânimo. Espero ser tão bom profissional com meus alunos quanto a senhora foi comigo.

À minha co-orientadora, Dra Patricia Simioni, por toda a ajuda e conversas.

Aos meus colegas de laboratório, Grethel, Marcela Mineiro, Júlia Bier, Felipe, Bianca, Luís Gustavo e, em especial à Maristela, por altas conversas que me ajudaram e fizeram pensar.

À minha amiga e colega de profissão Dirce. Sem você, o laboratório não seria a mesma coisa tanto pela qualidade de trabalho quanto pela alegria e companheirismo.

Aos colegas da RheaBiotech, Luís Peroni, Igor, Júlia, Fernanda e Paulo pelo ambiente de trabalho convidativo e muito tranquilo, e também pelos almoços promovidos no departamento.

Aos meus amigos de departamento, Marcos, José Raimundo, Thiago, Rosária, Carol.

Aos professores da área de Imunologia do IB, Liana, Dagmar e Leonilda.

Aos professores Ronei Luciano Mamoni, Maria Heloisa Lima Blotta, Alexandrina Sartori, Maria Marluce dos Santos Vilela e Dagmar Ruth-Stach Machado, pela ajuda dispensada na avaliação deste trabalho.

À FAPESP pela bolsa de estudos e apoio financeiro à pesquisa.

## SUMÁRIO

ABREVIATURAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
RESUMO	4
ABSTRACT	6
INTRODUÇÃO	8
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
<i>Artrite reumatóide</i>	14
<i>Artrite induzida por colágeno tipo II</i>	18
<i>Tolerância imune</i>	23
<i>Células dendríticas na tolerância</i>	26
OBJETIVOS E ESTRATÉGIA EXPERIMENTAL	32
MATERIAL E MÉTODOS	37
<i>Animais</i>	38
<i>Indução de artrite por colágeno e tolerância oral à ovalbumina</i>	38
<i>Indução de tolerância oral à OVA</i>	38
<i>Indução de artrite por colágeno</i>	39
<i>Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA e anti-CII</i>	40
<i>Avaliação da proliferação específica anti-OVA e anti-Colágeno tipo II</i>	41
<i>Caracterização dos níveis de citocinas secretadas in vitro</i>	42
<i>Isolamento de células dendríticas, co-cultura com linfócitos T e transferência adotiva</i>	42

<i>Isolamento de células dendríticas esplênicas</i>	42
<i>Enriquecimento de linfócitos T esplênicos</i>	43
<i>Co-culturas</i>	44
<i>Transferência adotiva de células dendríticas</i>	45
<i>Citometria de fluxo</i>	45
<i>Dosagem de proteínas pelo método de Lowry modificado</i>	46
<i>Análise estatística</i>	46
<b>RESULTADOS</b>	47
<i>Ingestão de OVA por via oral reduz os níveis de anticorpos em animais desafiados por via parenteral</i>	48
<i>A administração de CII+OVA induz alterações inflamatórias em articulações de camundongos BALB/c</i>	48
<i>Camundongos BALB/c artríticos apresentam elevados níveis séricos de anticorpos anti-CII e intensa proliferação celular específica in vitro</i>	53
<i>Alimentação com OVA modula a artrite em camundongos BALB/c</i>	56
<i>Prevenção do desenvolvimento de edema de pata</i>	56
<i>Restauração da integridade dos tecidos articulares</i>	58
<i>Queda dos níveis séricos de anticorpos anti-CII</i>	60
<i>Redução da linfoproliferação antígeno-específica e da produção de citocinas em cultura de células esplênicas e expansão de células T supressoras/reguladoras</i>	60
<i>Alimentação com OVA induz células dendríticas capazes de modular as respostas imunes in vitro à CII</i>	66
<i>Caracterização das células dendríticas CD11c<sup>+</sup> isoladas de baço</i>	66
<i>Enriquecimento de linfócitos T esplênicos</i>	68

<i>Redução da Proliferação de linfócitos TCII-específicos em co-culturas conduzidas na presença de células dendríticas de camundongos tolerantes à OVA</i>	68
<i>Expansão de células T supressoras/reguladoras CII-específicas em co-culturas com células dendríticas de camundongos tolerantes OVA</i>	71
<i>Alterações na produção de citocinas em co-culturas de células T CII-específicas com células dendríticas de camundongos tolerantes OVA</i>	71
<i>A transferência adotiva de células dendríticas modula a severidade da artrite experimental</i>	75
<i>Prevenção do desenvolvimento de edema de pata</i>	75
<i>Restauração da integridade dos tecidos articulares</i>	75
<i>Níveis séricos de anticorpos anti-CII</i>	78
<i>Redução da linfoproliferação antígeno-específica e da produção de citocinas inflamatórias em cultura de células esplênicas e expansão de células T supressoras/reguladoras em animais recipientes de células dendríticas tolerogênicas</i>	78
DISCUSSÃO	84
CONCLUSÕES	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	106
<i>Protocolo de aceite da Comissão de Ética em Experimentação Animal</i>	107
<i>Declaração da Comissão de Ética no Uso de Animais</i>	108
<i>Indicação de artigo enviado</i>	109

## ABREVIATURAS

AA – Artrite adjuvante

ACF – Adjuvante Completo de Freund

CIA – *Collagen-induced arthritis*

CII – Colágeno tipo II

DCs – Células Dendríticas

HLA – *Human Leukocyte Antigen*

IDO – Indoleamine 2,3 Dioxygenase

IFN $\gamma$  – Interferon  $\gamma$

IL – Interleucina

IMC – Índice de Massa Corporal

KLH – *Keyhole Lympet Hemocyanin*

MALT – Tecido Linfóide Associado à Mucosa

MHC-II – *Major Histocompatibility Complex*

OMS – Organização Mundial da Saúde

OVA – Ovalbumina

PGIA – Artrite induzida por proteoglicano

TGF $\beta$  – *Transforming Growth Factor  $\beta$*

TNF $\alpha$  – Fator de Necrose Tumoral  $\alpha$

Tregs – Células T reguladoras

## Lista de figuras

	Página
Figura 1 – Efeito da ingestão de OVA sobre os níveis de anticorpos séricos específicos.....	50
Figura 2 – Progressão da artrite em camundongos BALB/c.....	51
Figura 3 – Análise histológica das articulações de camundongos imunizados com CII+OVA.....	52
Figura 4 – Níveis de anticorpos específicos em soros de camundongos imunizados com CII+OVA.....	54
Figura 5 – Proliferação específica de células esplênicas de camundongos BALB/c artríticos.....	55
Figura 6 – Efeitos da administração oral de OVA sobre os sinais clínicos da artrite.....	57
Figura 7 – Análise histológica das patas dos animais artríticos tratados com OVA por via oral.....	59
Figura 8 – Efeitos da administração de OVA por via oral sobre a produção de anticorpos em camundongos BALB/c artríticos.....	62
Figura 9 – Efeito do tratamento oral com OVA sobre a proliferação específica de linfócitos T esplênicos de animais artríticos.....	63
Figura 10 – Avaliação do perfil das células em proliferação.....	64
Figura 11 – Efeito do tratamento oral com OVA sobre a produção de citocinas em culturas de esplenócitos de camundongos artríticos.....	65
Figura 12 – Avaliação fenotípica de células dendríticas esplênicas isoladas de camundongas tolerantes a OVA.....	67
Figura 13 – Enriquecimento de linfócitos T esplênicos.....	69
Figura 14 – Avaliação da proliferação de linfócitos T na presença de células dendríticas.....	70
Figura 15 – Avaliação do perfil das células em proliferação.....	73
Figura 16 – Dosagem de citocinas em sobrenadantes de cultura de linfócitos T CII-específicos.....	74

Figura 17 – Progressão da artrite em camundongos BALB/c recipientes de células dendríticas.....	76
Figura 18 – Análise histológica das patas dos animais artríticos recipientes de células dendríticas.....	77
Figura 19 – Efeito da transferência de células dendríticas sobre os níveis séricos de anticorpos anti-CII em camundongos artríticos.....	80
Figura 20 – Efeito da transferência de células dendríticas sobre a proliferação específica de células esplênicas de animais artríticos.....	81
Figura 21 – Avaliação do perfil de células em proliferação.....	82
Figura 22 – Dosagens de citocinas em sobrenadantes de cultura de linfócitos T CII-específicos.....	83

## RESUMO

O camundongo BALB/c, linhagem geneticamente resistente à artrite induzida por colágeno (CIA), pode desenvolver um quadro similar ao de camundongos susceptíveis quando uma proteína não relacionada ao próprio, como a ovalbumina (OVA), é associada a colágeno tipo II (CII). Utilizando esse modelo, avaliamos se a tolerância oral a OVA poderia interferir nas respostas imunes contra CII, bem como o efeito da transferência adotiva de células dendríticas (DCs) tolerogênicas para camundongos artríticos. Para avaliação dos efeitos da tolerância oral sobre o desenvolvimento de artrite em BALB/c, os camundongos foram alimentados com OVA misturada à água de beber na concentração de 4mg/mL, por sete dias consecutivos, antes ou depois do desafio com CII+OVA (100µg/mL de cada antígeno). Para avaliar a participação de células dendríticas (DCs) tolerogênicas na modulação da artrite em BALB/c, células CD11c<sup>+</sup> foram isoladas de baços de animais tolerantes à OVA e transferidas adotivamente para camundongos naïve, que foram subsequentemente imunizados com CII+OVA (100µg de cada antígeno). Para acompanhamento da evolução dos quadros de artrite, foram avaliados: o edema de patas, tomando-se regularmente as medidas de espessura de patas; realizadas análises histológicas dos tecidos articulares de joelhos e; conduzidas avaliações ex-vivo dos níveis séricos de anticorpos anti-CII e de respostas proliferativas e produção de citocinas de linfócitos T esplênicos. O tratamento com OVA antes da indução de CIA preveniu o desenvolvimento da artrite em todos os parâmetros analisados, enquanto que o tratamento com OVA após o estabelecimento da doença reduziu significativamente a inflamação e a produção de anticorpos anti-CII. Observamos ainda que a transferência de DCs tolerogênicas preveniu o aparecimento dos sinais clínicos da doença e o aumento dos níveis de anticorpos específicos no soro e reduziu

significativamente a proliferação de linfócitos T CII-específicos. Enquanto a frequência de células  $CD4^+CD25^+Foxp3^+$  foi maior nas culturas de células de animais recipientes de DCs tolerogênicas, houve redução significativa na frequência de células produtoras de  $IFN\gamma$  e IL-17. Os níveis de TGF- $\beta$ , IL-4 e IL-10 foram significativamente mais elevados nas culturas de células esplênicas de animais recipientes de DCs tolerogênicas, enquanto que os de  $IFN-\gamma$ , IL-6 e TNF- $\alpha$  foram mais reduzidos. Tomados em conjunto, nossos resultados indicam que a tolerância oral a um antígeno não relacionado ao próprio modifica o curso da artrite experimental em resposta ao colágeno, e que células dendríticas com perfil tolerogênico estão envolvidas nos fenômenos observados.

## ABSTRACT

BALB/c mice, genetically resistant to collagen-induced arthritis (CIA), can develop a inflammatory condition resembling what is observed in susceptible strains when a non-related protein, such as ovalbumin (OVA), is associated with type II collagen (CII). Using this model, we evaluated whether oral tolerance to OVA could interfere in the immune response against CII, as well as the effect of adoptive transfer of tolerogenic dendritic cells (DCs) to arthritic mice. In order to evaluate the effect of oral tolerance over arthritis development in BALB/c mice, animals were fed with OVA in the drinking water at a 4mg/mL concentration, for seven consecutive days, before or after challenge with CII+OVA (100µg of each antigen). In order to evaluate the participation of tolerogenic DCs in the modulation of arthritis, splenic CD11c<sup>+</sup> cells were isolated from OVA tolerant mice and adoptively transferred to naïve mice, which were subsequently immunized with CII+OVA. In order to monitor the evolution of the severity of arthritis, we evaluated paw edema, taking paw thickness regularly measured; performed histological analyses of articular knee tissues and, conducted ex-vivo evaluation of serum specific antibody levels and proliferation and cytokine secretion of splenic T lymphocytes. The treatment with OVA before CIA induction prevented the development of arthritis in all analyzed parameters, while the treatment after disease onset significantly reduced inflammation and CII-specific antibody production. We also observed that tolerogenic DC transfer prevented the appearance of clinical signs of arthritis, the increase of serum specific antibody levels and significantly reduced CII-specific T lymphocytes proliferation. While the frequency of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> cells were higher in cell culture from tolerogenic DC recipient mice, frequency of IFNγ- and IL-17-producing cells were significantly reduced. We observed that levels of TGF-β, IL-4 and IL-10

were significantly higher in cultures of splenic cells from mice recipient of tolerogenic DC, while levels of IFN- $\gamma$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  were reduced. Taken together, our results indicate that oral tolerance to a non-related antigen modifies the course of experimental arthritis in response to collagen, and that dendritic cells with a tolerogenic profile are involved in the observed phenomena.

# INTRODUÇÃO

A artrite reumatóide é uma doença autoimune sistêmica caracterizada por dor, inchaço das articulações, perda de peso e deformação óssea resultantes da resposta imune específica que acomete tecidos cartilagosos e sinoviais (ARNETT *et al.*, 1988). As manifestações observadas são orquestradas por componentes do sistema imune humoral e celular, que se estimulam mutuamente. A quebra da tolerância às proteínas presentes nas articulações é o evento desencadeador da inflamação e, posteriormente, da doença (ANDRIOPOULOS *et al.*, 1976a; ANDRIOPOULOS *et al.*, 1976b). Porém, os eventos que levam a quebra de tolerância ao próprio ainda são desconhecidos. Sabe-se, no entanto, que o desenvolvimento de doenças auto-imunes é um evento complexo e dependente de diversos fatores genéticos e ambientais (PERRICONE *et al.*, 2011).

Os principais fatores genéticos envolvidos na susceptibilidade à artrite reumatoide se relacionam à expressão de certos Antígenos Leucocitários Humanos (HLA, do inglês *Human Leukocyte Antigen*), sendo mais susceptíveis os indivíduos que possuem haplótipos HLA-DR1 e HLA-DR4 (WAGNER *et al.*, 2003). Essa predisposição genética pode explicar a distribuição da incidência de artrite entre os países com população predominante caucasiana ou negra (LOUZADA-JUNIOR *et al.*, 2008; PERRICONE *et al.*, 2011). Essa influência também ocorre em linhagens de camundongos, nas quais se observa resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento de artrite dependendo de seus haplótipos de MHC II. Camundongos de linhagens que apresentam haplótipo H-2<sup>q</sup> e H-2<sup>r</sup> (como o DBA/1 e SWR) são susceptíveis enquanto os de haplótipo H-2<sup>b</sup> (como o BALB/c) são resistentes à indução experimental de artrite.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), a incidência de artrite reumatóide na população mundial varia entre 0,1% a 3%, atingindo 50 a 210 milhões de pessoas.

Em simulação de gastos a serem efetuados em tratamento com duração de 48 meses, utilizando os medicamentos Infiximab e metotrexato, o valor aproximado seria de R\$ 9.292.879,31 (nove milhões e duzentos e noventa e dois mil e oitocentos e setenta e nove reais e trinta e um centavos) por indivíduo. O tratamento mais simples, utilizando metotrexato, custaria aproximadamente R\$ 113.900,00 (cento e treze mil e novecentos reais) (MONTEIRO e ZANINI, 2008). Assim, identificar os principais fatores de risco da doença e desenvolver alternativas para sua prevenção e tratamento, além de importante, é necessário.

Nesse sentido, a manipulação das respostas imunes específicas visando o restabelecimento da tolerância ao próprio vem sendo considerada como abordagem alternativa no tratamento de doenças crônicas de natureza inflamatória (TRENTHAM *et al.*, 1993; WEINER *et al.*, 1994; FARIA e WEINER, 2006). O trato gastrointestinal está em contato constante com antígenos de diversos tipos, incluindo desde microrganismos patogênicos, que devem ser eliminados, até componentes da microbiota normal e proteínas da dieta, que devem ser tolerados. O delicado balanço entre responder e tolerar um antígeno é alcançado pela expansão de células com atividade supressora suficientemente forte para inibir a proliferação de células reativas efectoras. Assim, a tolerância oral se caracteriza por ser um tipo especial de resposta imunológica, na qual são expandidas populações de células reguladoras que inibem a eliminação local e/ou sistêmica do antígeno ingerido (STROBEL e MOWAT, 1998; SIMIONI *et al.*, 2004; FARIA e WEINER, 2006).

A regulação das respostas imunes é alcançada principalmente por supressão ativa, anergia clonal e deleção clonal (ILAN, 2009). A supressão resulta da atividade de células T reguladoras (Tregs), presentes nos tecidos associados à mucosa (MALT), que secretam TGF- $\beta$  e IL-4, citocinas com atividade antiinflamatória (WEINER, 2001). Outras células que

desempenham papel importante na tolerância de mucosa são as células dendríticas (DCs), capazes de induzir tanto tolerância a bactérias comensais, ao alimento e aos antígenos próprios quanto imunidade a organismos virulentos e toxinas (IWASAKI, 2007). Quando imaturas, as células dendríticas podem favorecer a criação de um microambiente imunossupressor, através da secreção de IL-10 e redução da expressão de moléculas co-estimuladoras, induzindo um estado de anergia em linfócitos T ou sua diferenciação em células T reguladoras (LUTZ e SCHULER, 2002).

O desenvolvimento e aplicação de terapias alternativas são realizados, primeiramente, em modelos experimentais animais capazes de mimetizar os principais aspectos da ocorrência correspondente em humanos. O modelo experimental desenvolvido, amplamente aceito e caracterizado para o estudo da artrite reumatóide, é a artrite induzida em camundongos DBA/1 pela administração de colágeno tipo II, emulsificado em adjuvante contendo *M. tuberculosis* H37Ra morto por aquecimento, denominado CIA (de *collagen-induced arthritis*), que apresenta vários dos parâmetros clínicos e imunológicos observados na doença humana (COURTENAY *et al.*, 1980). Recentemente, foi observado que camundongos geneticamente resistentes desenvolvem CIA quando uma proteína exógena, como a ovalbumina (OVA), é adicionada ao inóculo de antígenos (BÄCKSTRÖM e DAHLGREN, 2007). As implicações desses achados são vastas, pois ampliam grandemente a possibilidade de desenvolvimento de novas terapias e outras formas de abordagem no tratamento da artrite experimental, e posteriormente, humana.

No presente estudo foram avaliados os efeitos da tolerância oral à ovalbumina (OVA) e da transferência adotiva de células dendríticas de animais tolerantes à OVA sobre as respostas imunes na artrite induzida em camundongos BALB/c pela administração parenteral de colágeno tipo II + OVA. Os resultados obtidos mostraram que o tratamento oral com OVA reduziu os

---

sinais clínicos da artrite experimental, efeito que foi mimetizado pela transferência adotiva de células dendríticas provenientes de camundongos tolerantes à OVA. A resposta imune humoral de camundongos artríticos tornados ativamente tolerantes à OVA foi caracterizada pela redução de anticorpos anti-CII. Tanto a tolerância oral como a transferência adotiva de células dendríticas tolerogênicas foram acompanhadas pela expansão de células T reguladoras CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, produtoras de TGF- $\beta$  e IL-10, e pela queda da produção de citocinas inflamatórias IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ .

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## A ARTRITE REUMATÓIDE

A artrite reumatóide é uma doença humana caracterizada por dor, inchaço, enrijecimento das articulações e, nos casos mais graves, deformação óssea, consequentes da ativação do sistema imune contra as proteínas presentes nas cartilagens. Trata-se, portanto, de uma doença autoimune. O evento inicial que leva ao desenvolvimento da artrite reumatóide é desconhecido, embora esteja relacionado a fatores genéticos e ambientais.

A artrite reumatóide é mais frequentemente encontrada em caucasianos do que em negros e asiáticos (MODY e CARDIEL, 2008). De maneira semelhante, a incidência de artrite é mais elevada em regiões onde a frequência de indivíduos portadores do haplótipo HLA-DR4 é maior. Na Nigéria, por exemplo, onde o HLA-DR4 é encontrado em menos de 0,1% da população, a artrite é uma doença incomum. Na América Latina, a artrite atinge aproximadamente 1% da população (MODY e CARDIEL, 2008).

Embora o background genético exerça grande influência, outros fatores estão associados ao agravamento e predisposição à artrite, dentre os quais se destaca as diferenças de gênero. A artrite reumatóide afeta mais mulheres do que homens, em uma proporção que pode chegar a 8:1. Recentemente, um estudo cooperativo entre vinte e cinco países, inclusive o Brasil, revelou que a doença costuma ser mais severa e duradoura em mulheres (JAWAHEER *et al.*, 2010). Experimentalmente, já havia sido descrito um o efeito protetor da testosterona sobre o desencadeamento da artrite em ratos (GANESAN *et al.*, 2008). Contudo, a predisposição do gênero feminino para desenvolver doenças autoimunes não se explica unicamente por diferenças hormonais, mas também por diferenças em seu estilo de vida (OLIVER e SILMAN, 2009). Por exemplo, suspeita-se que a utilização de produtos químicos capilares (SANCHEZ-GUERRERO *et al.*, 1996) e o uso continuado de cosmético labial (WANG *et al.*, 2008) se correlacionem

fortemente com o desenvolvimento de doenças autoimunes em mulheres. De forma semelhante, o tabagismo está associado ao agravamento da artrite em homens e mulheres (SAAG *et al.*, 1997). Novos estudos, no entanto, são de fundamental importância para determinar o papel relativo de cada um desses elementos na resposta imune característica da artrite.

O desenvolvimento da artrite se dá pela quebra da tolerância às proteínas presentes nas cartilagens. A partir do momento em que o colágeno tipo II e os proteoglicanos são percebidos como antígenos exógenos, o sistema imune arquitetava uma resposta ofensiva contra proteínas exclusivas das articulações sinoviais. O processo inflamatório que se desenvolve de forma crônica é responsável pela destruição das cartilagens e espessamento da membrana sinovial que recobre as articulações, e está na origem dos sintomas da artrite reumatóide. O desenvolvimento de modelos experimentais e o acompanhamento de casos clínicos humanos vêm revelando as células que participam da inflamação observada na artrite.

O infiltrado inflamatório na artrite reumatóide é caracterizado pelo acúmulo de leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e osteoclastos (TAKAYANAGI *et al.*, 1997; TAKAYANAGI, 2005), além de alterações na expressão de moléculas de superfície de fibroblastos e células endoteliais dos vasos sanguíneos proximais (BRENOL *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2007; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Os linfócitos T também são abundantes nos tecidos articulares acometidos, onde desempenham um papel essencial no desenvolvimento da inflamação (STASTNY, 1978; TODD *et al.*, 1988), particularmente os linfócitos T CD4+ de padrão Th1 e/ou Th17 (YAMADA *et al.*, 2008; HASHIMOTO *et al.*, 2009; KORN *et al.*, 2009). Indivíduos artríticos apresentam elevados níveis de IFN $\gamma$  e IL-17 e de fator reumatóide no plasma (KOTAKE *et al.*, 1999a; KOTAKE *et al.*, 1999b). Expressão exacerbada de IL-17 também foi detectada em lesões cerebrais e em células isoladas de sangue e líquido cefalorraquidiano de

pacientes com esclerose múltipla (LOCK *et al.*, 2002), bem como em tecido lesionado de camundongos portadores de encefalomielite experimental (EAE) (PETERMANN e KORN, 2011; ZEPP *et al.*, 2011). Alguns autores sugerem que a imunidade mediada por células Th17 é mais importante do que a via clássica de inflamação (Th1) na patogênese de alguns modelos experimentais de artrite (CHO *et al.*, 2007; CHU *et al.*, 2007). Contudo esses achados precisam ser esclarecidos na doença humana.

Além dos linfócitos T, as células dendríticas desempenham papel importante na artrite e vêm sendo amplamente estudadas, principalmente após o reconhecimento de seu papel imunomodulador em respostas imunes adaptativas (STEINMAN e NUSSENZWEIG, 2002). O envolvimento das células dendríticas na artrite é evidenciado pelo seu encontro no líquido sinovial de articulações inflamadas de pacientes com artrite, onde a proporção de DCs imaturas/maduras é substancialmente diferente da encontrada em tecidos saudáveis (PAGE *et al.*, 2002).

A perpetuação da inflamação no indivíduo artrítico pode facilitar o surgimento de aterosclerose. A aterosclerose é uma inflamação gradual dentro da parede arterial, com sérias complicações cardíacas (ROJAS-VILLARRAGA *et al.*, 2008). Essas complicações, aliás, são as principais responsáveis pelo óbito dos pacientes com artrite reumatóide (TORIGOE e LAURINDO, 2006; BRENOL *et al.*, 2007).

A artrite reumatóide atinge um grande número de indivíduos em idade produtiva, pode trazer complicações perigosas, causa redução da qualidade de vida e aumento dos gastos médicos e previdenciários. Por isso, é de fundamental importância a elaboração de estudos visando desenvolver tratamentos alternativos para os acometidos e buscar soluções para prevenção.

O conhecimento atual dos mecanismos inflamatórios da artrite permitiu a identificação dos principais fatores de risco, agravantes e causais em humanos. Por se tratar de uma doença cujos sintomas são resultados da atividade inflamatória dos leucócitos, o tratamento atual consiste na administração de fármacos com atividade antiinflamatória. Os mais receitados a pacientes são a leflunomida, sulfazalazima e o metotrexato, que apresentam mecanismos de ação semelhantes, isto é, a inibição da proliferação dos linfócitos ativados e auto-reativos, e causam redução do quadro clínico (ROSA *et al.*, 2007; FILIPPIN *et al.*, 2008). Contudo, alguns efeitos adversos estão geralmente associados ao uso desses fármacos tais como a nodulose acelerada (ROSA *et al.*, 2007). Nesse contexto, os anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  e anti-IL6R vem se apresentando como alternativa importante para a inibição da atividade dessas citocinas inflamatórias e o consequente controle dos sintomas da doença (MAROTTE e MIOSSEC, 2008; LEFFERS *et al.*, 2011). Experimentalmente, a administração de anticorpos anti-TNF $\alpha$  reduziu de modo significativo as manifestações clínicas de camundongos artríticos (WILLIAMS *et al.*, 1992). De forma semelhante, a utilização de Infliximab, um medicamento composto de anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$ , mostrou-se promissora no tratamento da artrite psoriásica (LOYOLA *et al.*, 2005). Os mecanismos de ação sugeridos para esses anticorpos na redução de sintomas e regressão do quadro clínico em pacientes artríticos são: a inibição da cascata de eventos inflamatórios promovidas pelo TNF $\alpha$  e a inibição da quimiotaxia de leucócitos para o sítio de inflamação (FELDMANN *et al.*, 1996). Contudo, o uso desses anticorpos também é acompanhado de efeitos colaterais tais como hepatite (MANCINI *et al.*, 2010), além de aumento de susceptibilidade a doenças oportunistas, como a candidíase e a tuberculose (WILLIAMS *et al.*, 1992; FELDMANN *et al.*, 1996; LOYOLA *et al.*, 2005). Recentemente, o complexo CTLA-4-Ig

foi avaliado em pacientes artríticos com resultados promissores (ALVAREZ-QUIROGA *et al.*, 2011).

A despeito dos recentes avanços no conhecimento a cerca dos fenômenos inflamatórios na artrite, bem como no desenvolvimento de alguns imunoterápicos dirigidos ao tratamento desses pacientes, estudos mais aprofundados sobre os mecanismos imunes envolvidos no desencadeamento da doença ainda se fazem necessários. O conhecimento advindo desses estudos será particularmente importante para a geração de novas alternativas de tratamento, com efeitos colaterais reduzidos.

## **A ARTRITE EXPERIMENTAL INDUZIDA POR COLÁGENO TIPO II**

O desenvolvimento de doenças autoimunes está ligado à resposta ofensiva de destruição de proteínas autólogas, como atestado pela presença de linfócitos auto-reativos e auto-anticorpos séricos (CHO *et al.*, 2007). No caso da artrite, são observadas respostas contra proteínas presentes nas articulações, principalmente em cartilagens ricas em colágeno tipo II e proteoglicanos (CAMPBELL *et al.*, 2000; JOHANSSON *et al.*, 2001; HOLMDAHL *et al.*, 2002; CHU *et al.*, 2003; BÄCKSTRÖM e DAHLGEN, 2004; KAI *et al.*, 2006; INGLIS *et al.*, 2007; JUNG *et al.*, 2007; ZHU *et al.*, 2007). O conhecimento dos mecanismos imunes que resultam na artrite se baseia primariamente na observação de seu curso em modelos experimentais. Um modelo experimental é uma simulação do quadro de uma doença humana em outra espécie animal. Quanto mais fiel ao quadro clínico, histopatológico e citológico da doença humana melhor é o modelo, pois é mais fidedigno. Já foram descritos vários modelos que mimetizam parte das características da doença em humanos, entre os quais o mais conhecido é a artrite induzida por proteoglicano (PGIA) e por adjuvante (AA).

O primeiro modelo desenvolvido para o estudo da artrite foi a AA, estabelecida pela imunização parenteral com adjuvante completo de Freund (ACF), por via intra-dérmica na base da cauda (COBELENS *et al.*, 2002; PRAKKEN *et al.*, 2003). Dentre as suas similaridades com a doença humana, pode-se destacar o balanço neuro-endócrino e a degeneração de cartilagens pela ação efetora de neutrófilos estimulados por linfócitos (PRAKKEN *et al.*, 2003). Como todo modelo, no entanto, a AA apresenta diferenças em relação à doença humana, particularmente no que diz respeito à sua característica de doença aguda em contraposição à cronicidade da doença humana.

A PGIA foi descrita posteriormente em camundongos BALB/c pela imunização com proteoglicano de cartilagem humana ou murina (MIKECZ *et al.*, 1990). Após a imunização parenteral os primeiros sinais clínicos aparecem ao redor do 40º dia e parecem ser resultantes da ativação de linfócitos T CD4+ (BARDOS *et al.*, 2003). Apenas recentemente os mecanismos inflamatórios vêm sendo desvendados nesse modelo e têm relação com a produção de IFN- $\gamma$  (DOODES *et al.*, 2010; GLANT *et al.*, 2011; OJEDA *et al.*, 2011).

Outros modelos de artrite foram descritos mais recentemente como a induzida por transferência de células auto-reativas (WAKASA-MORIMOTO *et al.*, 2008) e a desenvolvida espontaneamente por camundongos SKG (SAKAGUCHI *et al.*, 2003). Porém, o modelo experimental mais estudado e caracterizado dessa doença é a artrite induzida por colágeno tipo II (CIA) (TRENTHAM *et al.*, 1978).

A CIA é o modelo de artrite resultante da aplicação de colágeno tipo II emulsificado com ACF em duas doses (TRENTHAM *et al.*, 1978; JUNG *et al.*, 2007). Três semanas após a aplicação da primeira dose de antígenos, os primeiros sinais clínicos aparecem. Análises

histológicas das patas dos animais evidenciam a presença de significativo infiltrado celular inflamatório, concomitantemente com a elevação dos níveis séricos de anticorpos anti-CII. Outra característica semelhante à doença humana apresentada pelo modelo é o envolvimento de fatores genéticos (BRAND *et al.*, 2003). Em camundongos, as linhagens com haplótipos de MHC II H-2<sup>q</sup> e H-2<sup>r</sup>, como DBA/1 e SWR são susceptíveis a CIA, enquanto os portadores de outros haplótipos de H-2, como BALB/c, C57BL/6 e Swiss são resistentes. Contudo, o desenvolvimento de CIA não depende apenas das características do MHC II. Recentemente, observou-se que pequenas variações no protocolo de imunização podem resultar no estabelecimento de artrite mesmo em linhagens resistentes (INGLIS *et al.*, 2007). Nesse sentido, observou-se que camundongos resistentes da linhagem C57BL/6 desenvolviam CIA quando imunizados com CII de galinhas, mas não com CII de origem bovina (INGLIS *et al.*, 2007). De forma semelhante, Chu *et al.* (CHU *et al.*, 2003) conseguiram induzir CIA em camundongos C57BL/6 apenas aumentando a concentração de *M.tuberculosis* no inóculo de imunização.

Respostas humorais e celulares específicas sugerem que o desenvolvimento da artrite pode seguir diversas cascatas imunológicas, tais como a ativação do sistema complemento por anticorpos contra componentes da cartilagem e a secreção local e sistêmica de citocinas que exercem grande influência sobre a gravidade da artrite humana e experimental (BRAND *et al.*, 2003). A cronicidade observada tanto em artrite reumatóide humana quanto na CIA é resultante da atividade dos linfócitos T (CHU *et al.*, 2007). A interação dos linfócitos auto-reativos com macrófagos e fibroblastos dentro da membrana sinovial induz a produção de citocinas, enzimas de degradação de matriz extracelular e prostaglandinas contribuem para o processo inflamatório local continuado (MCINNES *et al.*, 2000; GERLI *et al.*, 2002; MAFFIA *et al.*, 2004). Por sua

vez, a inflamação articular desencadeia a erosão óssea e induz a formação de tecidos linfoides ectópicos ou terciários (MAFFIA *et al.*, 2004; YAGO *et al.*, 2007).

As citocinas com função inflamatória clássica como IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IFN $\gamma$  estão em concentrações elevadas nas articulações de animais e indivíduos com artrite. Com o avanço nas técnicas imunológicas e moleculares foi possível ampliar a compreensão do papel desempenhado por diversas dessas moléculas. Por exemplo, citocinas consideradas anteriormente como anti-inflamatórias, tais como o TGF $\beta$ , podem exibir caráter pró-inflamatório dependendo da concentração e da população celular alvo (FELDMANN *et al.*, 1996; DAI e MCMURRAY, 1999). Outras citocinas pró-inflamatórias detectadas tanto em culturas de células sinoviais de camundongos como nas articulações inflamadas incluem IL-6, IFN $\alpha$ , GM-CSF, M-CSF, IL-12. Recentemente, outras citocinas vêm sendo implicadas no desencadeamento das inflamações que acometem os pacientes com artrite, dentre as quais se destaca a IL-17, produzida por células Th17 (CHO *et al.*, 2007; CHU *et al.*, 2007; ROARK *et al.*, 2007; SHEIBANIE *et al.*, 2007; YOSHIHARA *et al.*, 2007) e outras doenças autoimunes (APOSTOLIDIS *et al.*, 2011; ZEPP *et al.*, 2011). O mecanismo pelo qual a IL-17 exerce sua atividade na artrite ainda não está bem esclarecido, mas acredita-se que a produção desregulada de IL-17 e TNF- $\alpha$  nos tecidos locais resulta em destruição tissular crônica mediada imunologicamente em doenças como a esclerose múltipla, artrite reumatoide e psoríase (MCKENZIE *et al.*, 2006). Foi constatado também que a IL-17 age sinergicamente com IL-1 $\beta$  e TNF $\alpha$  nas inflamações da CIA (CHO *et al.*, 2007). As evidências indicam que a expansão e diferenciação de linfócitos T naíve em células Th17 sejam induzidas pelas citocinas IL-23 e IL-15, presentes em alta concentração na articulação inflamada (CHO *et al.*, 2007; YOSHIHARA *et al.*, 2007). Com a definição do papel desempenhado pela IL-

17 na condução da inflamação crônica, a atuação do IFN $\gamma$  foi revista. Algumas evidências apontam que o IFN $\gamma$  desempenha papel inibidor da produção de IL-17 e, portanto protetor da destruição das cartilagens em alguns modelos murinos de artrite (KELCHTERMANS *et al.*, 2008; KELCHTERMANS *et al.*, 2009). Esse efeito foi demonstrado, por exemplo, em camundongos de linhagens resistentes *knock out* para os genes de IFN $\gamma$  que desenvolveram artrite como o modelo clássico de CIA (CHU *et al.*, 2003).

Recentemente, foi possível induzir artrite em camundongos BALB/c, geneticamente resistentes ao modelo clássico de CIA, quando uma proteína exógena não relacionada com o colágeno tipo II foi incluída na preparação de antígenos de imunização (BÄCKSTRÖM e DAHLGREN, 2007). O quadro de artrite se estabelece após a aplicação de três doses da mistura de antígenos e perdura por, pelo menos, setenta dias após a administração da primeira dose. Embora com escore clínico mais brando, os mecanismos envolvidos no processo inflamatório em BALB/c foram semelhantes aos exibidos por camundongos DBA/1, com presença de células auto-reativas, auto-anticorpos e destruição das cartilagens. A quebra da tolerância ao colágeno tipo II em camundongos resistentes após a inclusão de proteína exógena lança luz quanto aos possíveis agentes desencadeadores de artrite em pacientes com haplótipos de HLA resistentes. De forma semelhante, esses achados permitem a exploração de novas alternativas no tratamento da artrite. Uma alternativa interessante que vem sendo estudada é o restabelecimento da tolerância às proteínas das cartilagens pela administração de antígenos por via oral. Esse processo é denominado tolerância oral.

## TOLERÂNCIA IMUNE

Os precursores da linhagem linfocitária, assim como os demais leucócitos, são gerados na medula óssea. Enquanto os linfócitos B completam seu desenvolvimento na própria medula óssea, os precursores de linfócitos T migram para o timo, órgão localizado no mediastino médio da cavidade torácica, para concluir o processo de maturação e aquisição de competência funcional. Nesse órgão, por meio da movimentação entre suas diferentes regiões e o contato com células que apresentam antígenos próprios, os timócitos que reagem fortemente a esses antígenos são eliminados ou suprimidos (STARR *et al.*, 2003). A deleção clonal de células auto-reativas no timo é o principal mecanismo de indução de tolerância, neste caso denominada tolerância central (KAPPLER *et al.*, 1987).

Apesar da eficiência dos mecanismos centrais de tolerância, algumas células auto-reativas escapam para a periferia, onde podem gerar doenças autoimunes. A atuação de células e moléculas supressoras ou reguladoras da atividade desses clones marca o estabelecimento da tolerância periférica. Assim, a tolerância periférica pode ser definida como a supressão ativa das respostas imunes específicas a um antígeno.

Além da tolerância ao próprio que ocorre de forma fisiológica na maturação de linfócitos e na regulação periférica de clones auto-reativos, esse fenômeno pode ser induzido por antígenos exógenos (SCHWARTZ e DAMESHEK, 1959; SIMIONI *et al.*, 2004). Alguns fatores propiciam a indução de tolerância e incluem a origem e complexidade do antígeno exógeno - neste caso denominado de tolerógeno -, a via de entrada no organismo e o microambiente em que é capturado e processado (FRIEDMAN e WEINER, 1994; WEINER *et al.*, 1994). A via das mucosas é a mais empregada para a indução de tolerância a antígenos exógenos. A mucosa do trato gastrointestinal está em contato constante com antígenos de diversos tipos, incluindo desde

os microrganismos patogênicos, que devem ser eliminados, até os componentes da microbiota normal e as proteínas da dieta, que devem ser tolerados. Quando ingerido, o antígeno é exposto ao sistema imune de mucosa em um contexto que resulta em resposta imune de tolerância ao invés de eliminação.

As respostas imunes iniciadas pela via oral levam a um estado de baixa resposta efetora sistêmica dirigida aos antígenos ingeridos quando estes são posteriormente apresentados por outra via (FRIEDMAN e WEINER, 1994; WORBS *et al.*, 2006). De maneira geral, esse fenômeno se caracteriza pelo baixo nível de anticorpos específicos séricos e baixa proliferação de linfócitos T antígeno-específicos *in vitro* (SIMIONI *et al.*, 2004). A regulação das respostas imunes contra antígenos tolerados é alcançada pela indução de anergia, deleção clonal e a supressão ativa de células reativas pela ação de células e moléculas com função imunomoduladora. Porém, outros fatores, como a origem do antígeno e o envelhecimento, influenciam a habilidade tolerogênica do sistema imune. Já foi verificado que o envelhecimento acarreta mudanças no perfil de citocinas secretadas e na ativação de células imunocompetentes (SIMIONI *et al.*, 2007). Camundongos velhos apresentam menor secreção de anticorpos específicos e proliferação antígeno-específica a antígenos novos quando comparados com animais jovens (FRANCESCHI *et al.*, 2000). Assim, o envelhecimento dificulta tanto o estabelecimento de tolerância a neoantígenos como a eliminação de células transformadas e agentes infecciosos.

A supressão das respostas imunes é obtida graças à atuação de células T reguladoras (Tregs) e DCs com perfil tolerogênico presentes nos tecidos linfóides associados à mucosa (MALT). Quando ativadas, as Tregs exercem seu papel imunossupressor por diversas vias, dentre as quais se destacam a secreção de citocinas antiinflamatórias, a supressão por contato e a

liberação de grânulos de perforina e granzima contra células T efetoras (SAKAGUCHI *et al.*, 2008).

As Tregs apresentam potencial terapêutico que vem sendo atualmente mais explorado no tratamento experimental de autoimunidades, transplantes e alergias (TANG *et al.*, 2004; BRENNAN *et al.*, 2011; DI IANNI *et al.*, 2011; MA *et al.*, 2011). Embora sejam importantes na regulação de respostas indesejadas, verificou-se que um dos mecanismos pelo qual células tumorais evadem a resposta imune efetora é através da expansão de Tregs no sítio da inflamação (WOLF *et al.*, 2003; CURIEL, 2007; GAO *et al.*, 2007). Nesse sentido, a eliminação de células T reguladoras pelo uso de um conjugado recombinante de IL-2 e toxina diftérica (DAB389IL-2) se mostrou importante para a destruição eficiente de células transformadas (DANNULL *et al.*, 2005).

Outras células com papel importante na tolerância de mucosa são as células dendríticas, capazes de induzir tanto tolerância a bactérias comensais, aos alimentos e aos antígenos próprios quanto imunidade a organismos virulentos e toxinas.

Embora mais difícil de ser obtido, o reestabelecimento da tolerância a proteínas próprias já foi demonstrado experimentalmente (FARIA e WEINER, 2006). A severidade da artrite induzida em camundongos foi reduzida quando os animais ingeriram o colágeno tipo II antes ou depois dos desafios antigênicos (KIM *et al.*, 2002; MIN *et al.*, 2004). De forma semelhante, o quadro clínico de encefalomielite experimental autoimune (EAE), modelo experimental da esclerose múltipla, foi significativamente atenuado em animais alimentados com peptídeos derivados da proteína básica de mielina (PERON *et al.*, 2010). Contudo, o aproveitamento desse tipo de tratamento é sempre mais difícil em situações onde a resposta inflamatória já está estabelecida.

Além da tolerização ativa, verificou-se que a transferência de células dendríticas tolerogênicas é capaz de estabelecer o fenômeno em animais de forma passiva (OCHANDO *et al.*, 2006; LU *et al.*, 2011).

## CÉLULAS DENDRÍTICAS NA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA

As células dendríticas são heterogêneas e compostas por subpopulações que diferem entre si pela expressão de TLR e funções biológicas exercidas. Células dendríticas imaturas (iDCs) residem em diversos tecidos não linfóides tais como a pele ou mucosas do trato respiratório, onde são expostas a grande quantidade e variedade de alérgenos, patógenos e substâncias químicas (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Recentemente, demonstrou-se que imunoadjuvantes como LPS, forskolin e curdlan ativam DCs de modo peculiar, isto é, dependente de subpopulação, e induzem a expansão de células TH1, TH2 e TH17, respectivamente, sendo por esta razão designados adjuvantes de Th1/Th2/Th17 (MATSUSHITA *et al.*, 2011).

Com base em características fenotípico-funcionais, as DCs podem ser divididas em dois subgrupos principais: DCs plasmocitóides (pDCs) e DCs convencionais (cDCs). A subpopulação pDC são CD11c<sup>+</sup>B220<sup>+</sup> e se distingue do subgrupo cDC (CD11c<sup>+</sup>B220<sup>-</sup>) pelo repertório limitado de TLR (possuem exclusivamente TLR7 e TLR9) e por produzir grandes quantidades de IFNs tipo I quando infectadas por vírus, especialmente IFN- $\alpha$  (HOSHINO e KAISHO, 2008). Além de T7/9, outros receptores de padrões moleculares de patógenos presentes nessas células, como RIGI (*retinoic acid-inducible gene 1*)-like receptors (RLRs) e MDA-5 (*melanoma differentiation-associated gene 5*), são fundamentais nas respostas à infecção viral por detectarem ácidos nucleicos virais (HAYDEN e GHOSH, 2004).

As cDCs esplênicas de camundongos podem ainda ser subdivididas em CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> e CD4<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>. Células de medula óssea também podem dar origem a pDC e cDC quando cultivadas *in vitro* na presença de Flt3L (*Fms-like tyrosine kinase 3 ligand*). Essas cDCs se dividem em dois subgrupos: cDCs CD11b<sup>high</sup> e cDCs CD24<sup>high</sup>. As cDCs CD24<sup>high</sup> são similares às cDCs esplênicas CD4<sup>-</sup>8<sup>+</sup> no que diz respeito ao perfil de expressão gênica e em funções tais como a habilidade de internalizar células apoptóticas; a internalização de células apoptóticas é evento importante para a *crosspresentation* de antígenos virais e de tumores. Além de TLR7/9, as cDCs CD24<sup>high</sup> e as cDCs esplênicas CD4<sup>-</sup>CD8<sup>+</sup> expressam altos níveis de TLR-3, um receptor solúvel envolvido na detecção de ácidos nucleicos virais e na consequente produção de IL12p40 e IFN- $\alpha$ . Na presença de GM-CSF, por outro lado, células da medula óssea dão origem exclusivamente à cDCs CD11b<sup>high</sup>, que também expressam TLR7/9 além de outros TLR (HOSHINO e KAISHO, 2008).

Em condições especiais, como nos processos inflamatórios massivos, ácidos nucleicos do próprio hospedeiro podem ser carregados para o interior de pDCs, via vacúolos endossômicos, após a ligação desses ácidos nucleicos a anticorpos ou a certas proteínas expressas na superfície celular; TLR7/9 migram do retículo endoplasmático para o endossoma onde podem se ligar aos ácidos nucleicos internalizados. Após essa interação, as pDCs também geram grandes quantidades de IFNs tipo I, que contribuem para as manifestações da autoimunidade (MATSUSHITA *et al.*, 2011).

Ao entrar em contato com antígenos, as DCs os capturam e realizam o processamento proteolítico. Em seguida, as DCs migram para os órgãos linfoides secundários, onde apresentam os peptídeos resultantes para linfócitos T naïve. A ativação específica de células T em repouso

requer três sinais distintos para ocorrer. Esses sinais são a presença de peptídeos antigênicos associado a moléculas de classe II do MHC, ligação entre moléculas co-estimuladoras presentes nas APCs e linfócitos T e a secreção de citocinas pelas DCs (BANCHEREAU *et al.*, 2000). Foi demonstrado que DCs de MALT induzem, preferencialmente, a expansão de células T reguladoras específicas, e são importantes no estabelecimento da tolerância quando o antígeno é administrado por via oral (VINEY *et al.*, 1998). De fato, se verificou que células dendríticas presentes no trato digestório desempenham papéis distintos na resposta imune de acordo com os estímulos que recebem (KOSCIELNY *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; IWASAKI, 2007; LASKARIN *et al.*, 2007). A modulação das respostas de linfócitos T ocorre no momento da apresentação antigênica quando as DCs variam os sinais emitidos (GUERMONPREZ *et al.*, 2002). Nesse sentido, foi demonstrado acúmulo de DCs, expressando níveis aumentados de moléculas co-estimuladoras necessárias a uma resposta imune efetora, na muscular intestinal nas placas de Peyer e linfonodos mesentéricos em modelo experimental de injúria intestinal, isto é, a obstrução cirúrgica do esvaziamento gástrico, e injeção de LPS (KOSCIELNY *et al.*, 2006).

A confirmação do papel modulador desempenhado por células dendríticas nas respostas adaptativas foi possível após vários estudos conduzidos *in vitro*. Hoje, é amplamente conhecido que a apresentação antigênica realizada na ausência de moléculas co-estimuladoras leva os linfócitos a um estado de anergia, enquanto que a apresentação realizada por DCs secretoras de IL-10 induz a diferenciação de células TCD25<sup>+</sup> de ocorrência natural em células TCD25<sup>+</sup> reguladoras que expressam Foxp3 (Treg) (MAHNKE *et al.*, 2007). Também se observou a diferenciação em células Treg mediada por subpopulações de DCs produtoras de TGF- $\beta$  em humanos e animais portadores de tumores (ENK *et al.*, 1997; GHIRINGHELLI *et al.*, 2005). A imunossupressão decorrente da expansão de Treg costuma ser catastrófica para o paciente e está

diretamente relacionada a um mau prognóstico (BUDHU *et al.*, 2006). Além de DCs, outras APCs tolerogênicas como os macrófagos tem sido localizados no espaço peritumoral em exames histopatológicos da massa tumoral (KUANG *et al.*, 2009), onde inibem localmente a atividade de linfócitos TCD8<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>. Ainda assim, é indiscutível o potencial terapêutico da utilização de DCs no controle de manifestações inflamatórias e testes experimentais sugerem a sua eficácia. Nesse sentido, a administração oral de um peptídeo derivado de CII bovino foi capaz de aumentar a concentração de DCs CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> secretoras de altos níveis de IL-10 e TGFβ em placas de Peyer, promovendo a expansão de células Treg e resultando em melhora do quadro clínico de CIA em camundongos (MIN *et al.*, 2006; CHO *et al.*, 2007).

O estágio de maturação de células dendríticas também influencia o seu papel nas respostas imunes adaptativas. Quando atingem a maturidade, as DCs expressam elevados níveis de moléculas co-estimuladoras e MHC-I e MHC-II e geralmente desencadeiam respostas efetoras de caráter inflamatório (LEVIN *et al.*, 1993; BANCHEREAU *et al.*, 2000). Por outro lado, DCs imaturas favorecem a criação de um microambiente imunossupressor, através da secreção de IL-10 e ausência de moléculas co-estimuladoras (STEINMAN *et al.*, 2003). Outros fatores garantem o perfil tolerogênico em células dendríticas. Um deles é a expressão da enzima Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) que cataboliza o triptofano, aminoácido essencial para a proliferação de linfócitos, resultando na inativação dessas células ou morte pelo aumento na concentração de quinureninas (PALAFOX *et al.*, 2010). DCs expressando IDO são encontradas em grande quantidade na interface materno-fetal, e vem sendo responsabilizadas pela tolerância ao feto (LASKARIN *et al.*, 2007).

O conjunto de evidências apresentadas sugere o potencial terapêutico de manipulações envolvendo a transferência adotiva de DCs tolerogênicas no controle de quadros inflamatórios.

As células dendríticas podem ser obtidas por isolamento direto dos tecidos onde residem ou diferenciadas *in vitro* a partir de precursores presentes no sangue periférico e na medula óssea (BOWERS e BERKOWITZ, 1986; O'DOHERTY *et al.*, 1993). Mesmo quando isoladas de tecidos de animais naïve, as DCs são principalmente maduras, com elevada expressão de CD86, ao passo que as células diferenciadas *in vitro* podem ser moduladas para fenótipos ativadores ou tolerogênicos através da adição de estímulos pró-inflamatórios (LPS+IFN $\gamma$ ) ou anti-inflamatórios (IL-10, IL-4), respectivamente (LUTZ *et al.*, 2000; MULLER *et al.*, 2002). A vantagem em utilizar DCs diferenciadas *in vitro* é a elevada concentração celular obtida e a possibilidade de modular seu perfil de ativação. DCs isoladas diretamente dos tecidos refletem o papel que desempenham *in vivo*. Por exemplo, a transferência de DCs de animais portadores de diabetes (LO *et al.*, 1993), artrite (LEUNG *et al.*, 2002), encefalomielite experimental (DITTEL *et al.*, 1999) e outras doenças autoimunes inflige o aparecimento da moléstia nos animais recipientes através da ativação de linfócitos T naïve em células efectoras. Todavia, a transferência de DCs moduladas é capaz de atenuar o quadro inflamatório em diversos modelos experimentais. Nesse sentido, DCs exibindo perfil tolerogênico por ação de drogas anti-inflamatórias inibidoras de maturação foram capazes de modular inflamações experimentais após transferência adotiva (MOSER *et al.*, 1995; MULLER *et al.*, 2002).

A molécula quimérica CTLA4-Ig, produzida no final da década de 1990, tem atraído bastante atenção pela sua capacidade de reduzir processos inflamatórios instalados, como na psoríase vulgar em humanos (ABRAMS *et al.*, 1999), e de promover a sobrevivência de transplantes cardíacos alográficos em ratos (STELL *et al.*, 2003). O sucesso de sua utilização em pacientes com artrite juvenil também foi relatada mais recentemente (RUPERTO *et al.*, 2008). Embora os mecanismos de ação não estejam completamente esclarecidos, foi demonstrado que a

administração de CTLA-4-Ig induz alterações importantes em células dendríticas que se tornam supressoras e promovem a expansão de células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> (COQUERELLE *et al.*, 2009; KO *et al.*, 2009). Outros efeitos observados após o uso da CTLA-4-Ig dizem respeito à secreção de moléculas imunossupressoras como HLA-G (BAHRI *et al.*, 2009) e ativação deIDO (MELLOR *et al.*, 2004). DCs esplênicas isoladas de camundongos artríticos tratadas com CTLA4-Ig foram capazes de inibir o desenvolvimento da CIA em animais naïve após transferência adotiva (KO *et al.*, 2009). De forma semelhante, DCs tratadas com CTLA4-Ig inibem o desenvolvimento de asma experimental (YING *et al.*, 2011).

A administração de DCs provenientes de camundongos tolerantes ao CII também foi capaz de transferir a tolerância para camundongos naïve e prevenir o desenvolvimento de CIA. A análise das DCs transferidas mostrou elevada expressão deIDO e secreção de IL-10 (PARK *et al.*, 2008). De fato, tem sido demonstrado que a administração de antígenos por via oral dá origem a uma população de DCs secretoras de IL-10 e IL-27, que expandem células Treg antígeno-específicas capazes de modular processos inflamatórios em curso (PARK *et al.*, 2008; SHIOKAWA *et al.*, 2009).

Embora o tratamento de quadros inflamatórios com células dendríticas tolerogênicas desenvolvidas durante uma resposta antígeno-específica esteja amplamente descrito, não há relatos dos efeitos da utilização de DCs tolerogênicas desenvolvidas em resposta a um antígeno não relacionado sobre doenças autoimunes experimentais.

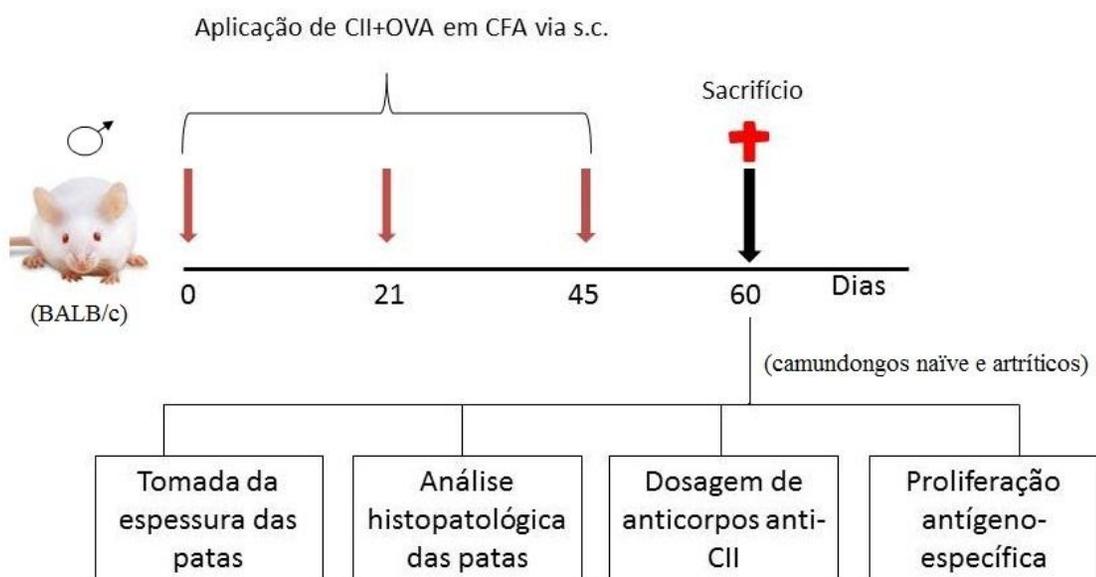
**OBJETIVOS E ESTRATÉZIA**

**EXPERIMENTAL**

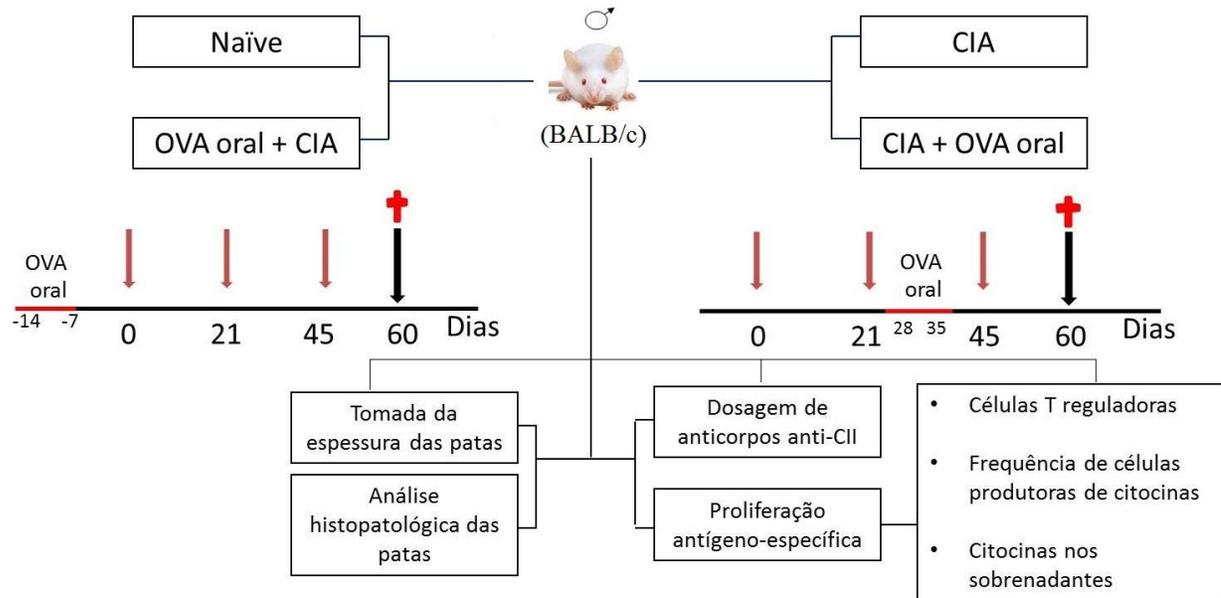
Embasado no exposto, foi objetivo deste trabalho verificar a possibilidade de modulação da CIA em camundongos BALB/c pela tolerância a ovalbumina induzida de forma ativa, pela tolerância oral, ou passiva, pela transferência adotiva de célula dendríticas.

As seguintes etapas foram cumpridas para este fim:

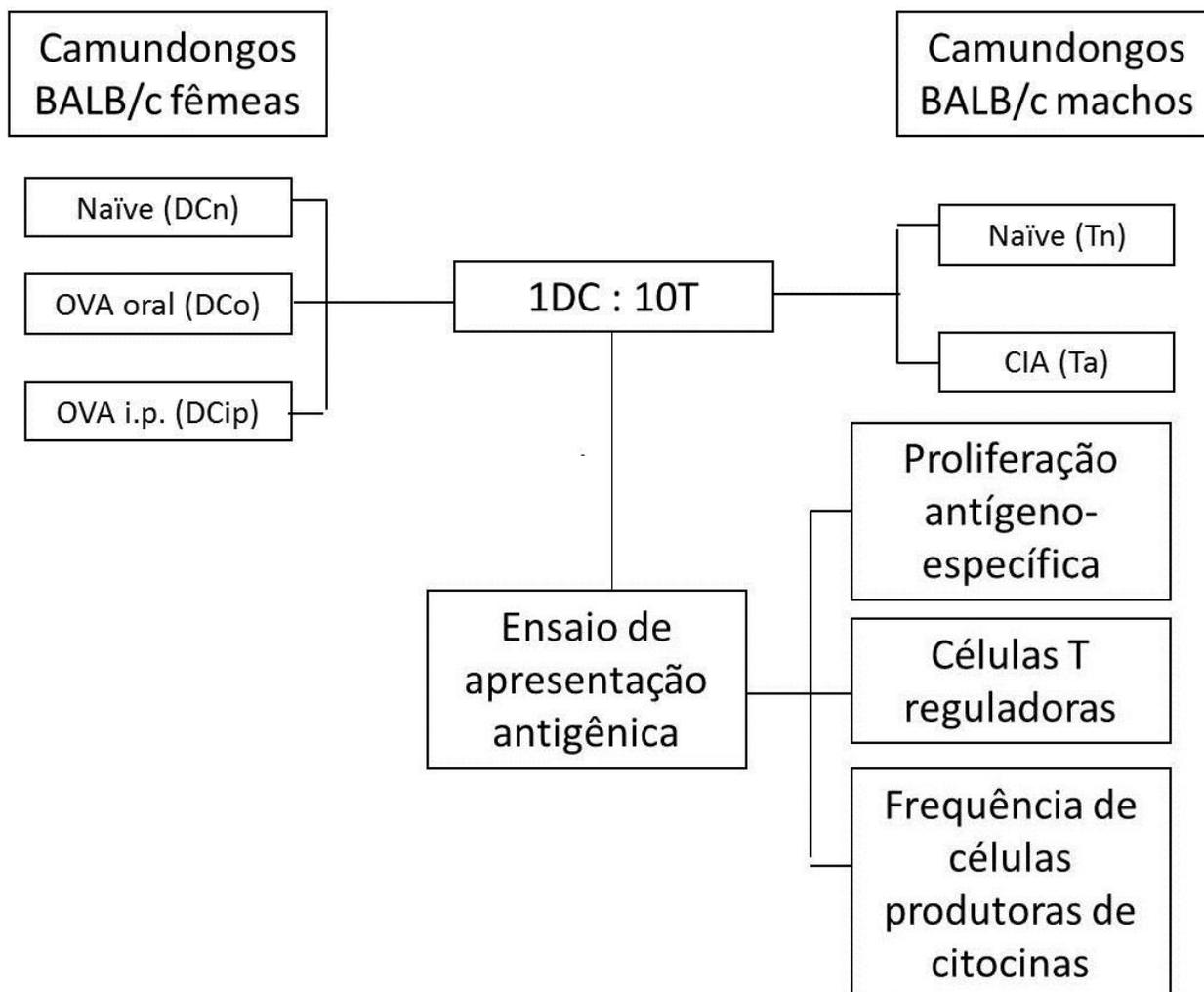
- Indução de artrite em camundongos BALB/c machos pela administração de CII+OVA



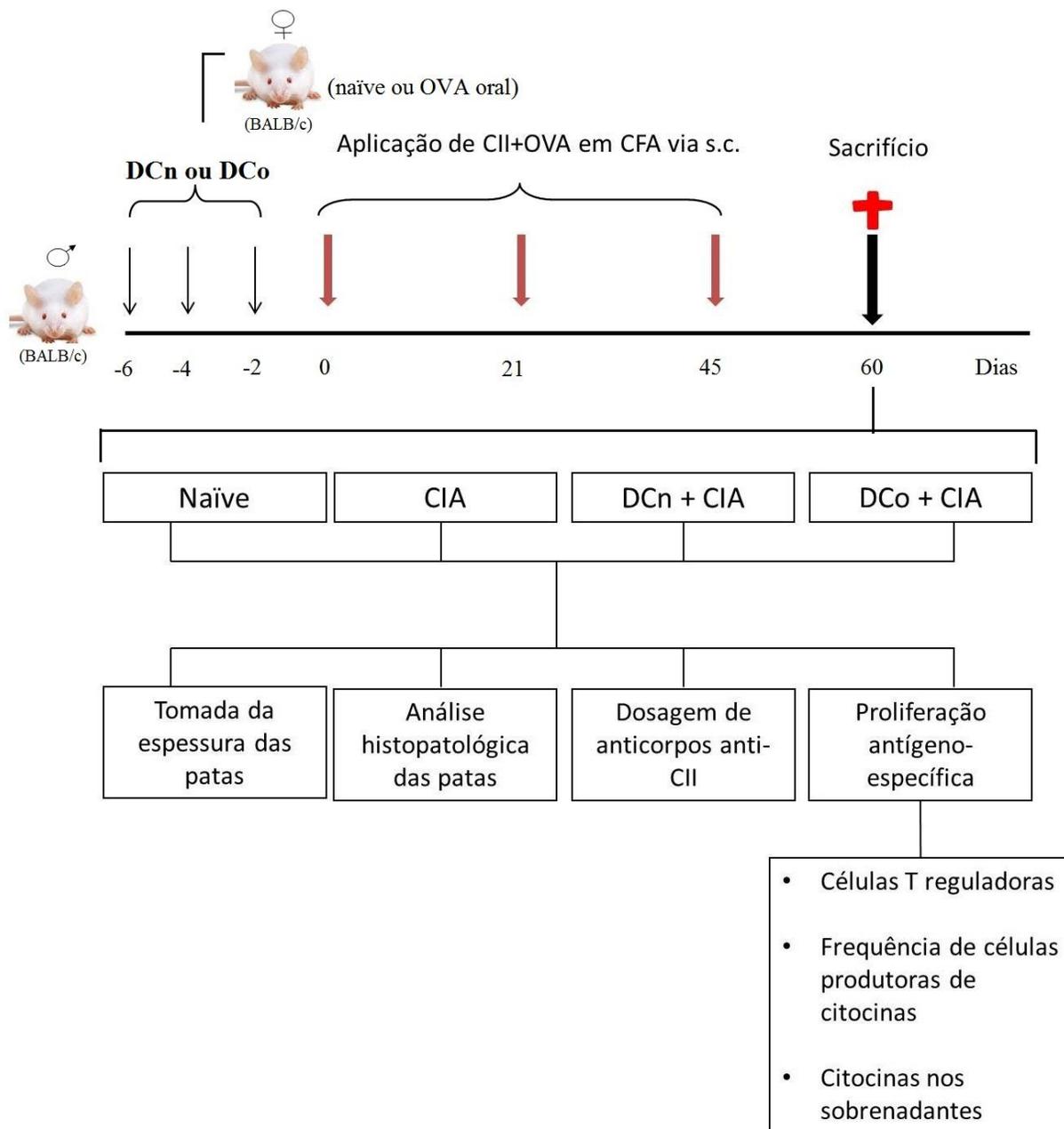
- Avaliação do efeito da ingestão voluntária de OVA sobre o desenvolvimento da artrite experimental em camundongos BALB/c.



- Avaliação do possível papel modulador desempenhado por células dendríticas de animais tolerantes a OVA sobre linfócitos T de animais artríticos.



- Avaliação do efeito da transferência adotiva de células dendríticas tolerogênicas sobre o desenvolvimento da artrite experimental em camundongos BALB/c.



## MATERIAL E MÉTODOS

## **1. Animais.**

Camundongos BALB/c machos, de oito semanas procedentes do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB/UNICAMP), foram mantidos em condições *S.P.F.* (*specific-pathogen free*) com água e ração autoclavados ad libitum, em temperatura e fotoperíodo em ciclos de 12 horas controlados durante todo o experimento. Os grupos (ou sub-grupos) experimentais foram: grupo naïve não tratado; grupo tratado oralmente com OVA; grupo de animais no qual foi induzida a artrite (CIA); grupo tratado oralmente com OVA e depois induzida a artrite por colágeno (OVA oral+CIA); grupo no qual foi induzida artrite e depois a administração oral de OVA (CIA+OVA oral); grupo recipiente de células dendríticas esplênicas de camundongos tolerantes à OVA antes da indução de artrite (DCo+CIA); grupo recipiente de células dendríticas esplênicas de camundongos naïve antes da indução de artrite (DCn+CIA); grupo imunizado com OVA apenas por via intraperitoneal (i.p.). Cada grupo era constituído por seis camundongos. Ao todo foram oito grupos. Os protocolos envolvendo o uso de animais de laboratório foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP, sob protocolo nº 1759-1.

## **2. Indução de artrite por colágeno e tolerância oral à Ovalbumina.**

### **2.1. Indução de tolerância à OVA.**

A indução de tolerância oral à OVA seguiu protocolo descrito anteriormente em nosso laboratório (SIMIONI *et al.*, 2004). Brevemente, a OVA (4mg/mL; Sigma) foi adicionada ao suprimento de água dos animais por uma semana. Após esse período, o suprimento de água foi trocado por água esterilizada por autoclavação. Decorrida uma semana da interrupção do tratamento, dois grupos-testemunha, constituídos por cinco animais tratados oralmente com OVA

ou por cinco animais naïve, foram desafiados com 10 µg da proteína combinada com hidróxido de alumínio (1mg/mL) em solução salina 0,15M, por via i.p. Quatorze dias depois, esses camundongos receberam uma segunda dose i.p. de 10 µg de OVA, sem hidróxido de alumínio. Sete dias após a última injeção ip, o sangue foi coletado individualmente do plexo retro-orbital e a tolerância foi averiguada pela quantificação de anticorpos séricos anti-OVA através de reações de ELISA.

## **2.2. Indução de artrite por colágeno.**

A indução de artrite por colágeno seguiu o protocolo descrito anteriormente (BÄCKSTRÖM e DAHLGREN, 2007). Brevemente, colágeno do tipo II de galinha (Chondrex) foi solubilizado em ácido acético a 0,1M por 18 horas, e depois dissolvido em PBS (solução de NaCl 0,15M, contendo tampão fosfato 0,02M, pH 7,4) para concentração de 4mg/mL. Uma solução de OVA purificada (Sigma) foi preparada em PBS pH 7,4 na concentração de 4mg/mL. Cada animal recebeu uma dose dos antígenos constituída pela mistura de 100µg de cada proteína – colágeno tipo II e OVA – emulsionadas em solução de adjuvante completo de Freund (ACF) a 50% (v:v), por via subcutânea, na base da cauda. Doses de reforço preparadas da mesma forma foram aplicadas três e seis semanas após a primeira. Para avaliar o estabelecimento da artrite, a espessura das patas foi tomada individualmente três vezes por semana a partir do vigésimo primeiro dia após a primeira administração dos antígenos de indução. Aos 60 dias após a primeira dose de antígenos, os animais foram sacrificados e suas patas traseiras retiradas, dissecadas, fixadas e descalcificadas em solução de Ácido fórmico 5% e formaldeído 15%, cortadas em micrótomos (cortes de 7µm) e coradas em H/E e Sirius Red, para análise histopatológica.

### 3. Avaliação dos níveis séricos de anticorpos anti-OVA e anti-Colágeno.

Os níveis de anticorpos séricos anti-OVA foram determinados por ELISA, de acordo com protocolo descrito anteriormente (SIMIONI *et al.*, 2004). Brevemente, placas de microtitulação de 96 poços receberam 50µl de solução de OVA (20µg/mL em tampão carbonato/bicarbonato, 0,05M, pH 9,2) por poço e foram incubadas a 37°C por 1 hora e, em seguida, a 4°C por 18 horas. O excesso de antígeno foi removido por lavagens com PBS Tween20 a 0,05%. O bloqueio dos sítios reativos foi realizado pela adição de PBS contendo leite desnatado a 5% por 1 hora a 37°C. Após lavagens, os soros normais e imunes foram adicionados em diluição seriada de 1:100 a 1:12.800, preparados em PBS contendo leite desnatado a 2%. As placas foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após lavagem com PBS Tween20, 50µl de uma solução contendo IgG de coelho anti-Ig murino conjugada com HRPO (preparados em nosso Laboratório), na diluição de 1:1000, foram adicionados a cada poço e as placas incubadas por sessenta minutos a 37°C. Os reagentes foram removidos das placas por lavagens e 50µL do substrato (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e orto-fenilenodiamina [OPD] 0,4mg/mL em tampão citrato/fosfato 0,05M pH5,0) foram adicionados a cada poço. As placas permaneceram no escuro por trinta minutos, quando 25µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N foram adicionados a cada poço para parar a reação. As absorbâncias foram lidas a 492nm em um leitor de ELISA (Labsystem, Finlândia). A quantificação dos níveis de anticorpos séricos anti-colágeno tipo II seguiu o protocolo acima descrito, com as seguintes modificações propostas anteriormente (ZHU *et al.*, 2007): as placas foram cobertas por colágeno tipo II (20µg/mL, Chondrex) e incubadas por dezoito horas a 4°C. Os resultados dos ELISAs para detecção de anticorpos anti-OVA e anti-colágeno tipo II foram expressos como somatória das absorbâncias ± Erro Padrão da Média (E.P.M.) em cada grupo experimental.

#### **4. Avaliação da proliferação específica anti-OVA e anti-Colágeno tipo II.**

Para avaliar a proliferação específica de linfócitos frente à OVA e colágeno tipo II, os camundongos foram sacrificados em câmara de CO<sub>2</sub> para remoção asséptica do baço e preparo de suspensões celulares em PBS. Após lavagens, os esplenócitos foram ressuspensos em PBS contendo CFSE (2,5µM), na densidade de 1,25x10<sup>6</sup> esplenócitos/mL, e então incubados a 37°C por 10 minutos. Em seguida, adicionou-se o meio RPMI com 10% de soro bovino fetal (meio completo) e as suspensões foram incubadas por 5 minutos no gelo. Na sequência, as células foram lavadas com meio completo por centrifugação a 300g, por 10 minutos. Os sedimentos de células foram ressuspensos no volume original com meio completo contendo 50µg/mL de OVA ou de CII, e distribuídas em placas de cultura de 96 poços (200µL/poço). Antes da adição dos antígenos, foi efetuada a análise de uma alíquota das células marcadas com CFSE por citometria de fluxo FACS Aria (BD Pharmingen), para definir o valor máximo de incorporação da sonda. As placas de cultura foram incubadas em estufa de CO<sub>2</sub> 5% a 37°C por 96 horas. Na sequência, os sobrenadantes foram coletados e estocados a -80° C para dosagens de citocinas e as células em cada poço foram fixadas com PBS contendo 1% de formaldeído, transferidas para tubos apropriados, e analisadas em citômetro de fluxo. Os dados individuais foram analisados em software específico (FACSDIVA, BD Pharmingen), e os gráficos com os valores de frequências celulares obtidas de cada grupo foram elaborados em GraphPad Prism (GraphPad). Em alguns experimentos, a proliferação de linfócitos foi medida pela técnica do MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 bromídeo difeniltetrazolio). Para isso, alíquotas de 10µL do MTT (5mg/mL) foram adicionadas a cada poço de cultura, 4 horas antes da interrupção do crescimento. A seguir, os cristais de formazan originados nas células que incorporaram o MTT foram solubilizados pela

adição de álcool isopropílico acidificado (0.04N), seguindo-se leitura espectrofotométrica das placas, a 540nm, em leitora de ELISA. Esses testes foram realizados em sextuplicata.

### **5. Caracterização dos níveis de citocinas secretadas *in vitro*.**

A caracterização dos níveis de citocinas secretadas *in vitro* foi realizada empregando-se kits comerciais, de acordo com as recomendações do fabricante. Foram analisadas as citocinas IL-17, IFN- $\gamma$ , IL-6, IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  (e-Bioscience) e também IL-12 e TNF- $\alpha$  (BD Pharmingen).

### **6. Isolamento de células dendríticas, co-cultura com linfócitos T e transferência adotiva.**

#### **6.1. Isolamento de células dendríticas esplênicas.**

Suspensões de células esplênicas foram enriquecidas em células dendríticas por centrifugação em gradiente de BSA (Albumina Bovina, Sigma; d=1,08 g/mL), a partir de suspensões de células esplênicas de camundongos que ingeriram ou não OVA, de acordo com indicações anteriores (STEINMAN *et al.*, 1983; LEVIN *et al.*, 1993; NUNEZ, 1999). Em seguida as DCs foram marcadas com esferas magnéticas recobertas com anti-CD11c e isoladas por passagem em coluna em campo magnético, seguindo as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotec, Alemanha). Brevemente: Os baços dos camundongos foram removidos e incubados em meio HBSS livre de cálcio e magnésio, contendo 1mg/mL de colagenase (tipo IA – Sigma), por 20 minutos, à 4° C. Em seguida, os órgãos foram homogeneizados e as suspensões celulares lavadas duas vezes por centrifugação a 200g por 10 min. Os sedimentos obtidos foram ressuspensos na solução de BSA e centrifugados a 250g, a 4° C, por 40 minutos. As células da

interface meio/BSA foram coletadas, lavadas, incubadas com esferas magnéticas recobertas com anti-CD11c (Miltenyi Biotec, Alemanha) e separadas seguindo as recomendações do fabricante. As células dendríticas isoladas foram postas em cultura na presença de OVA (Conalbumina, 50µg/mL, Sigma) e incubadas à 37° C, e 5% de CO<sub>2</sub>, por 18 horas. Para avaliar a frequência de células expressando proteínas de superfície típica de células dendríticas, uma alíquota das células pulsadas foi marcada com os seguintes anticorpos conjugados com fluorocromos: 1) anticorpo anti-CD11c de camundongo conjugado com alofococianina (clone-HL-3/APC; PharMingen, BD PharMingen, San Diego, CA, USA); 3) anti-MHC de classe II conjugado com PE, preparado em nosso laboratório (clone TIB229); 4) anti-CD205 de camundongo conjugado com FITC (clone NLDC-145; Diagnostics Inc, Flanders, NJ, USA). Para avaliação da presença de linfócitos T na preparação de DCs, as células foram marcadas com o anticorpo anti-CD3/PE-Cy7 (clone 145-2C11). Observamos que as suspensões continham aproximadamente 70% de células CD11c+ e 90% de células MHC classe II+; a frequência de células CD3+ foi próxima a 5%. As leituras foram realizadas em citômetro de fluxo localizado no Hemocentro da UNICAMP (FACS-Aria, Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). A amplificação e compensação ótimas foram determinadas pelo exame de células não marcadas e as análises foram realizadas pelo aplicativo FCSExpress (DeNovo Software).

## **6.2. Enriquecimento de linfócitos T esplênicos.**

O enriquecimento de linfócitos T esplênicos com colunas de algodão de nylon seguiu o protocolo indicado anteriormente (SIMIONI *et al.*, 2004). Para preparação das colunas, 0,8 gramas de lã de nylon foram pesados, desfiados e inseridos em seringa de 20 mL. A lã foi umedecida com água destilada e o conjunto foi esterilizado em autoclave. Em fluxo laminar, a

coluna foi equilibrada com meio RPMI completo aquecido a 37°C, pressionando-se a lâ para liberar as bolhas de ar. Após drenagem do excesso de meio, adicionaram-se as células esplênicas, provenientes de animais naïve e artríticos, ressuspensas em meio completo. Em seguida, mais 3mL do meio foram adicionados para evitar ressecamento. A coluna foi coberta com papel alumínio estéril e incubada por 30 minutos a 37°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Em seguida, a coluna foi alimentada com meio completo para a eluição dos linfócitos; os primeiros 15 mL drenados correspondem à fração rica em linfócitos T. A fração rica em linfócitos foi centrifugada a 300g por 6 minutos e o pellet ressuspenso em meio completo. A viabilidade celular foi verificada e a suspensão foi ajustada para 1,25x10<sup>6</sup> células/mL, Uma alíquota foi retirada para marcação de proteínas de superfície e analisadas por citometria de fluxo em equipamento FACS Aria (BD Pharmingen); as células restantes foram marcadas com a sonda CFSE como descrito acima.

### **6.3. Co-culturas**

As células dendríticas (DC) e os linfócitos T (T) foram semeadas em placas de cultura de 96 poços na proporção de 1 DC:10 T, em meio completo suplementado com os antígenos OVA ou CII a 50µg/mL, e incubadas a 37°C, por 96 horas em estufa de CO<sub>2</sub> 5%. Em seguida, as células em cada poço foram fixadas com PBS contendo 1% de formaldeído, transferidas para tubos apropriados, e analisadas em citômetro de fluxo. Os sobrenadantes das culturas foram coletados e estocados a -80°C até sua utilização em reações de ELISA para quantificação de citocinas como descrito acima.

#### **6.4. Transferência adotiva de células dendríticas.**

Camundongos naïve e tolerantes a OVA foram sacrificados e seus baços retirados para o preparo de suspensões celulares. As células dendríticas esplênicas foram isoladas por seleção positiva empregando-se esferas magnéticas recobertas com anti-CD11c, seguindo o protocolo descrito acima. Três doses de  $5 \times 10^5$  DCs purificadas foram transferidas adotivamente para camundongos dos grupos experimentais previstos (item 1) aos 6, 4 e 2 dias antes da imunização com colágeno + OVA, por via endovenosa pelo plexo retro-orbital

#### **7. Citometria de fluxo.**

As células T esplênicas nas culturas foram marcadas com anticorpos monoclonais conjugados com fluorocromos para análise por citometria de fluxo. Foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-CD3 (Clone 2C11, marcado com Percp-Cy5.5), anti-CD4 (clone GK1.5, IgG2b de rato marcado com PECy7), anti-CD25 (clone PC61.5, marcado com PE) e seus respectivos controles isotípicos. As marcações intracelulares seguiram o protocolo proposto pelo fabricante, utilizando-se os seguintes anticorpos anti-FOXP3 (clone FJK-16s, marcado com APC), anti-IL-17 (clone eBIO17B7, marcado com APC ou PE), anti-IFN- $\gamma$  (clone XMG1.2, marcado com APC ou PE) e anti-IL-10 (clone JES5-16E3, marcado com PE) e seus respectivos controles isotípicos, todos adquiridos da eBiosciense (San Diego, CA). As preparações foram analisadas em citometro de fluxo FACS-Aria (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA).

### **8. Dosagem de proteínas pelo método de Lowry modificado.**

As dosagens de proteínas nas amostras foram realizadas de acordo com o método de Lowry, modificado por Hartree (HARTREE, 1972), empregando-se como padrão soluções de albumina bovina altamente purificada (BSA; Sigma), em concentrações que variaram de 20 a 100 µg/mL.

### **9. Análise estatística.**

Os resultados foram analisados pelo teste t de “*Student*”, determinando-se como estatisticamente significativas as diferenças com valores de  $p \leq 0,05$ . Para a elaboração dessas análises, foi utilizado o Software GraphPad Prism.

## RESULTADOS

***Ingestão de OVA por via oral reduz os níveis de anticorpos em animais desafiados por via parenteral.***

Conforme ilustrado na figura 1, a administração de OVA na água de beber (4mg/ml), por sete dias consecutivos, foi capaz de reduzir significativamente a secreção de anticorpos séricos específicos em camundongos BALB/c desafiados com OVA por via intraperitoneal. É possível observar ainda que a ingestão de OVA não desencadeou a produção de anticorpos séricos específicos em níveis detectáveis nos animais tratados com o antígeno pela via oral.

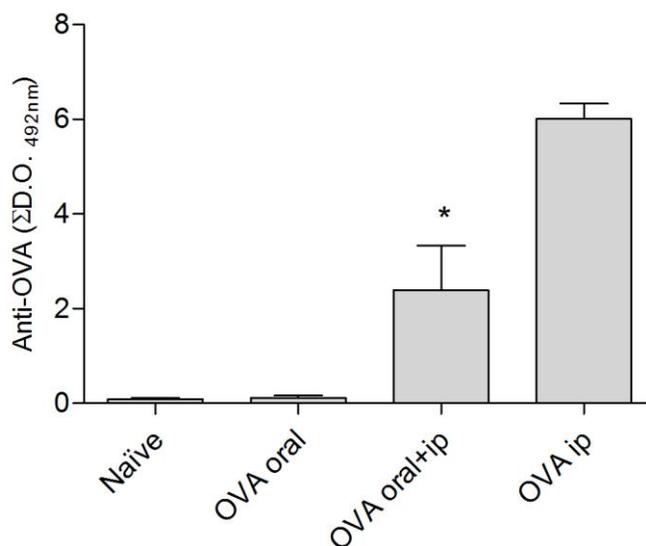
***A administração de CII+OVA induz alterações inflamatórias em articulações de camundongos BALB/c***

Para estabelecer o modelo de artrite induzida por colágeno tipo II de galinha (CII) + OVA em BALB/c, camundongos machos foram imunizados por via subcutânea com três doses de 100µg de cada antígeno, emulsionados em adjuvante completo de Freund (ACF). Com esse protocolo, foi possível observar o estabelecimento de sinais de artrite, representados pelo edema de pata, mensurado pela tomada de espessura das patas (Figura 2), e alterações histológicas do tecido articular dos joelhos (Figura 3).

Como ilustrado na Figura 2, a partir da administração da segunda dose de antígeno, aos 22 dias, já é possível observar aumento significativo na espessura das patas dos animais imunizados em relação à média do grupo controle. O edema de pata nos animais artríticos se mantém de forma significativa durante todo o período de observação, que em alguns experimentos foi medida até o 103º dia.

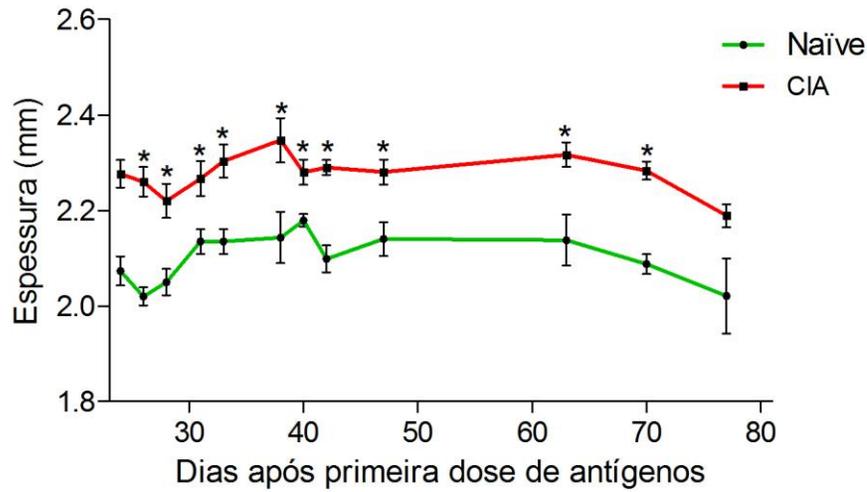
---

As análises histológicas ilustradas na figura 3 também revelam alterações importantes ocorrendo nas articulações sinoviais dos joelhos de camundongos imunizados com CII+OVA. Em contraposição ao aspecto histológico normal encontrado na cartilagem sinovial de animais controles (Naïve), observa-se nos tecidos sinoviais de camundongos imunizados (CIA) uma hiperplasia e hipertrofia de condrócitos na região da cartilagem, bem como sinais de erosão óssea. A presença de condrócitos hipertrofiados, que provavelmente perderam sua função primordial de produzir elementos da matriz extracelular e permitir o crescimento normal da cartilagem, indica a instalação de um quadro de artrite. Não foram encontrados infiltrados de células inflamatórias nas articulações sinoviais avaliadas.

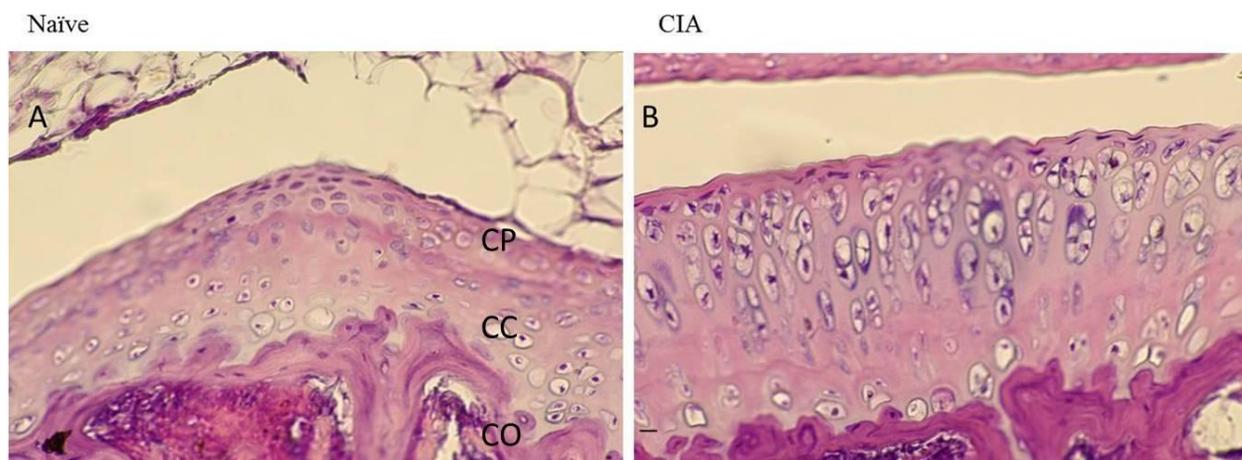


**Figura 1 – Efeito da ingestão de OVA sobre os níveis de anticorpos séricos específicos.**

Camundongos BALB/c foram alimentados com solução de OVA 4mg/mL, por 7 dias consecutivos e a seguir foram desafiados por via intraperitoneal (i.p.) com duas doses de 10 $\mu$ g de OVA administradas em intervalos de 14 dias. Os soros foram coletados 7 dias após a segunda dose parenteral. Como controles negativos foram usados camundongos não imunizados (Naïve) e como controles positivos foram empregados camundongos imunizados apenas por via i.p. (OVA i.p.). Os soros foram coletados 14 dias após última dose de antígeno por via parenteral e ensaiados individualmente nas diluições de 1:100 até 1:12800 para avaliação dos níveis de anticorpos anti-OVA por ELISA. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  SEM da somatória de densidades ópticas obtidas nas diferentes diluições dos soros. Cada grupo foi composto por cinco camundongos e os dados são representativos de dois experimentos distintos (\*P<0.05).



**Figura 2 – Progressão da artrite em camundongos BALB/c.** Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com três doses da mistura de CII e OVA, 100  $\mu$ g de cada antígeno, emulsionados em adjuvante completo de Freund (ACF), administradas em intervalos de 21 dias. Camundongos naïve foram usados como controles. Os resultados representam a espessura média das patas  $\pm$  E.P.M., cuja medição foi iniciada no 22º dia após aplicação da primeira dose de antígenos para indução de CIA. (\*)  $P < 0,05$  no teste de t de Student, na comparação com o grupo controle. Dados representativos de três experimentos distintos.

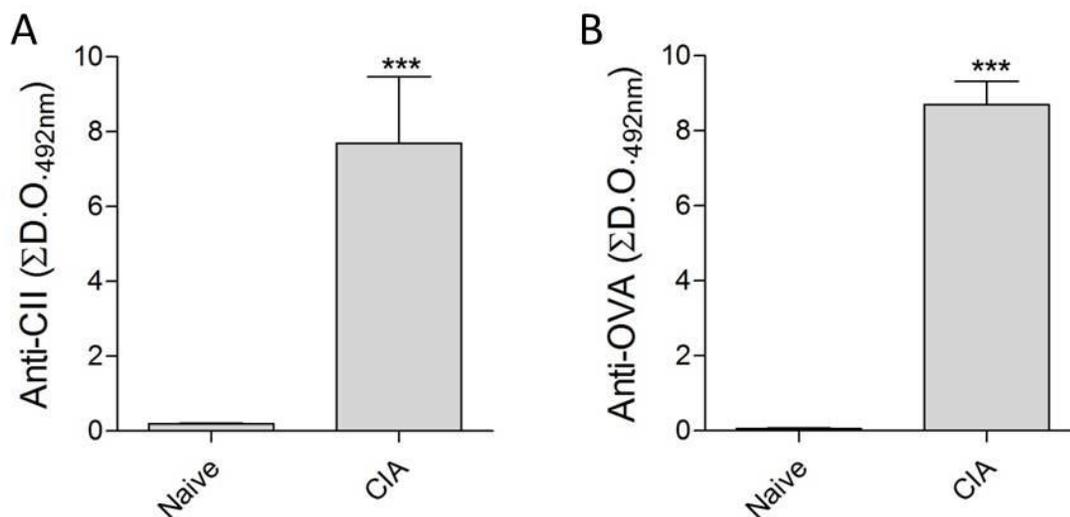


**Figura 3 – Análise histológica das articulações de camundongos imunizados com CII+OVA.** Camundongos da linhagem BALB/c foram imunizados com três doses da mistura de CII e OVA, 100 µg de cada antígeno, emulsionados em adjuvante completo de Freund (ACF), administradas em intervalos de 21 dias. Camundongos naïve foram usados como controles. Aos sessenta dias após a primeira dose da mistura de antígenos CII+OVA, os animais de cada grupo, naïve e CIA, foram sacrificados e tiveram suas patas dissecadas e descalcificadas para processamento histológico. Os cortes de 5µm foram corados com H/E. CP: Camada de Proliferação, CC: Camada de Calcificação, CO: Camada Óssea.

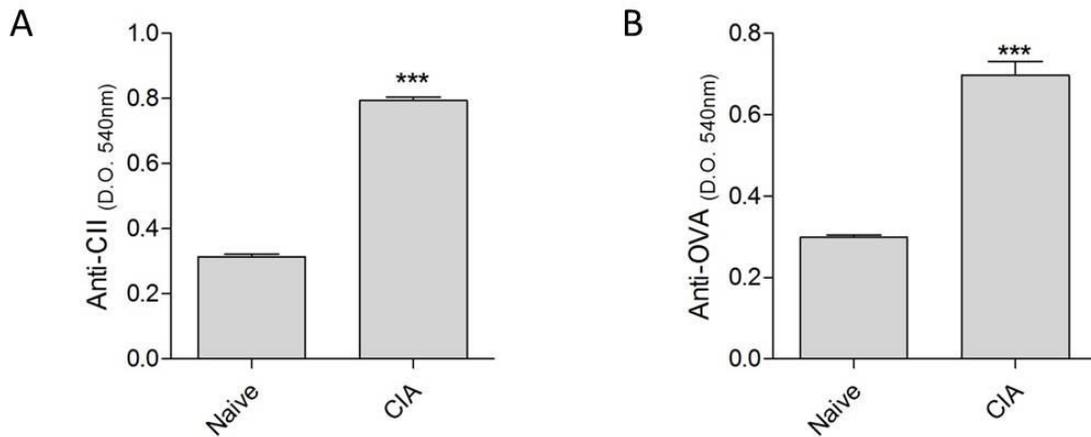
***Camundongos BALB/c artríticos apresentam elevados níveis séricos de anticorpos anti-CII e intensa proliferação celular específica in vitro***

A imunização de camundongos BALB/c com CII+OVA também resultou na elevação significativa dos níveis de anticorpos séricos específicos para ambos os antígenos, conforme ilustrado na Figura 4. Da mesma forma, células esplênicas de camundongos imunizados com CII+OVA proliferaram de modo significativo em culturas conduzidas na presença de CII (Figura 5, Painel A) ou OVA (Figura 5, Painel B).

O status imunológico dos camundongos BALB/c ilustrados nas figuras 4 e 5, juntamente com os sinais clínicos e histopatológicos apresentados nas figuras 2 e 3 nos leva a concluir que a imunização com CII+OVA induziu o conjunto de elementos que devem estar presentes para se considerar o sucesso da instalação do quadro de artrite.



**Figura 4 – Níveis de anticorpos específicos em soros de camundongos imunizados com CII+OVA.** Os níveis de anticorpos específicos para OVA e CII foram medidos por ELISA nos soros de camundongos machos da linhagem BALB/c imunizados com a mistura de CII+OVA (100µg/mL de cada antígeno). Como controles foram usados os soros de camundongos naïve. Todos os soros foram coletados 53 dias após o início da imunização e ensaiados individualmente nas diluições de 1:100 até 1:12800. As barras representam a média  $\pm$  SEM da somatória de densidade óptica obtida nas diferentes das diluições dos soros. Cada grupo consistiu de cinco camundongos e os dados são representativos de quatro experimentos distintos (\*\*\* $p$ <0.005, comparativamente ao naïve).



**Figura 5 – Proliferação específica de células esplênicas de camundongos BALB/c artríticos.**

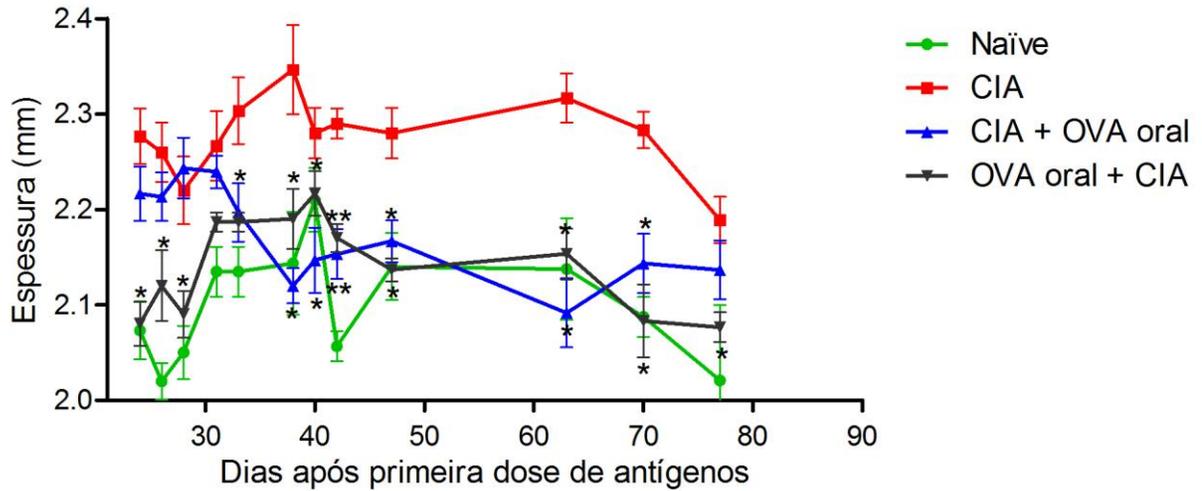
Decorridos 60 dias da inoculação da primeira dose subcutânea da mistura de CII+OVA (100µg/mL de cada antígeno), os animais foram sacrificados e tiveram seus baços retirados assepticamente para o preparo de suspensões celulares individuais, que foram cultivadas em triplicata por 96 horas na presença de 50 µg de CII ou OVA. Ao final do período, as células viáveis foram marcadas com MTT e os cristais de formazan dissolvidos com solução de SDS a 5% acidificado. Cada barra representa a média ± EPM da densidade óptica obtida nas diferentes culturas. Cada grupo foi composto por cinco camundongos e os dados são representativos de quatro experimentos distintos (\*\*P<0.01, comparativamente ao naïve).

### *Alimentação com OVA modula a artrite em camundongos BALB/c*

O conjunto de experimentos descritos a seguir teve por finalidade avaliar o papel desempenhado pelo segundo imunógeno no estabelecimento e na manutenção do quadro de artrite. Para isso, camundongos BALB/c tornados artríticos pela inoculação de CII+OVA, isto é, que exibiam edema de pata, níveis séricos aumentados de anticorpos e resposta linfo-proliferativa específica para CII, foram alimentados com OVA, no intuito de reestabelecer a tolerância à CII. Por outro lado, camundongos naïve foram previamente alimentados com OVA e em seguida desafiados com CII+OVA por via parenteral, para avaliar o efeito protetor da tolerância oral OVA sobre a resposta imune à CII. Os resultados obtidos estão sumarizados nas Figuras 6 a 11.

#### *a- Prevenção do desenvolvimento de edema de pata*

A alimentação de camundongos BALB/c com OVA antes do desafio parenteral com a mistura CII+OVA preveniu o surgimento do edema de pata característico do quadro clínico de artrite nesses animais (Figura 6, Painel A). Da mesma forma, a alimentação com OVA após imunização com CII+OVA reduziu de modo significativo o edema já exibido pelos camundongos artríticos, que voltaram a apresentar espessura de patas comparáveis às de camundongos controles naïve.

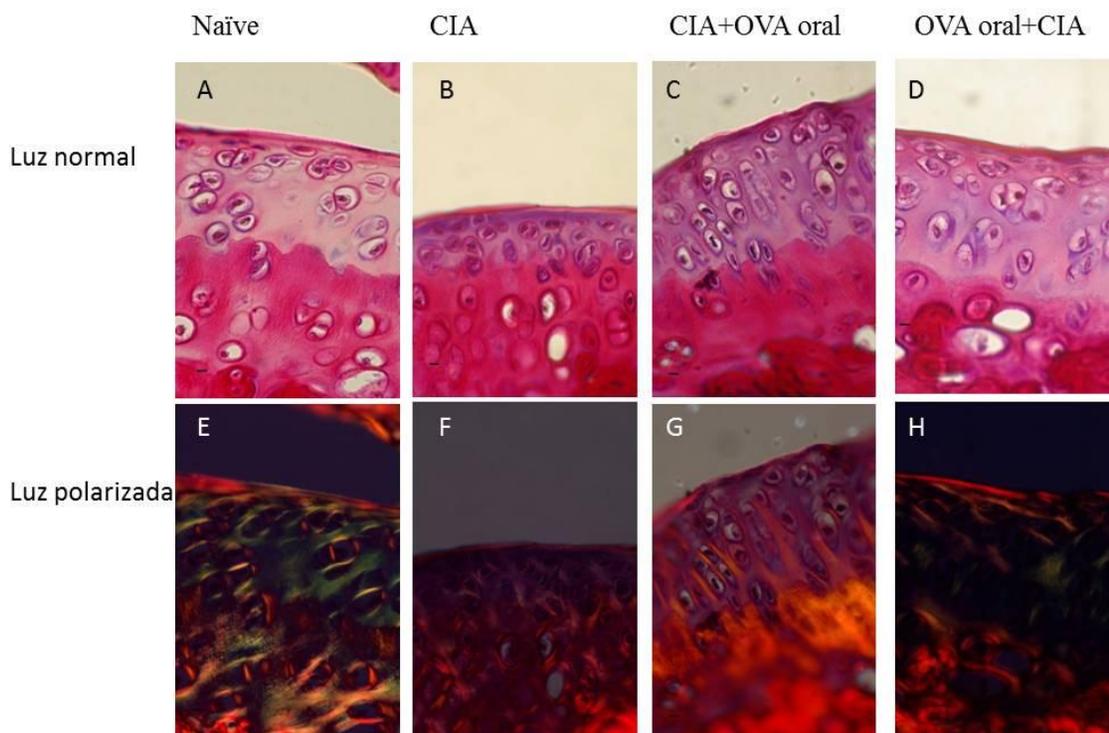


**Figura 6 – Efeitos da administração oral de OVA sobre os sinais clínicos da artrite.** A artrite foi induzida em camundongos BALB/c machos como descrito previamente. Uma parte dos animais foi previamente tratada com OVA por via oral 14 dias antes da indução da artrite (grupo OVA oral + CIA, painel A) ou 28 dias após a primeira dose de antígeno (grupo CIA+OVA, painel B). Os grupos controles foram formados por animais normais (Naïve) e animais artríticos sem tratamento (CIA). A espessura das patas foi medida rotineiramente para acompanhar o edema resultante da inflamação nas articulações após imunização parenteral dos camundongos. Os resultados representam a espessura média +E.P.M. dos grupos avaliados nos respectivos dias. (\*) estatisticamente significativos, com  $P < 0,05$  na comparação pelo teste de t de Student com o grupo CIA.

b- *Restauração da integridade dos tecidos articulares*

Os efeitos da administração de OVA por via oral sobre os processos histológicos típicos da artrite induzida por CII+OVA estão resumidos na Figura 7. Em microscopia óptica convencional, os tecidos articulares dos camundongos naïve (Figura 7, Painel A) e dos previamente tratados com OVA por via oral (Figura 7, Painel D) apresentam a mesma organização, isto é, recobrimo o osso, observam-se cartilagem articular constituída mais externamente por células em multiplicação (condroblastos) seguida de uma camada interna formada por condrócitos, células diferenciadas produtoras de colágeno e proteoglicanos. Nas preparações articulares de camundongos artríticos, a camada externa da cartilagem articular encontra-se bastante reduzida em comparação com o controle naïve (Figura 7, Painel B), enquanto que se observa uma restauração parcial das características histológicas da cartilagem articular, ainda que hipertrófica e hiperplásica, em tecidos articulares de camundongos que ingeriram OVA após a indução do quadro de artrite (Figura 7, Painel C).

Em microscopia de luz polarizada, observa-se nos tecidos afetados pela artrite (Figura 7, Paineis F e G) quantidade elevada de material do tipo colágeno (corado em vermelho pelo Sirius red) infiltrando a área de multiplicação de condrócitos. Essa imagem não é vista nos tecidos de camundongos naïve (Figura 7, Painel E) e nem nos de camundongos que foram alimentados com OVA antes da indução de artrite (Figura 7, Painel H), nos quais a maior concentração de colágeno se localiza próximo ao osso.



**Figura 7 – Análise histológica das patas dos animais artríticos tratados com OVA por via oral.** Aos sessenta dias após a primeira dose parenteral da mistura de CII+OVA (100 $\mu$ g/mL de cada antígeno), os animais foram sacrificados e tiveram suas patas traseiras retiradas, descalcificadas, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo (cortes de 5 $\mu$ m de espessura). Os cortes foram corados com Sirius Red para evidenciar as fibras de colágeno sob luz polarizada. Os painéis são representativos dos resultados obtidos em dois experimentos independentes com os grupos: controle (Naïve), artrítico (CIA), artríticos e posteriormente alimentados com OVA (CIA+OVA oral) e previamente alimentados com OVA e tornados artríticos (OVA oral+CIA).

c- *Queda dos níveis séricos de anticorpos anti-CII*

Conforme ilustrado na Figura 8, tanto o tratamento prévio quanto o pós-tratamento oral com OVA reduziu discreta, mas significativamente, a produção de anticorpos IgG anti-CII em animais desafiados com a mistura de antígenos CII+OVA usada para indução de artrite.

d- *Redução da linfoproliferação antígeno-específica e da produção de citocinas em cultura de células esplênicas e expansão de células T supressoras/reguladoras*

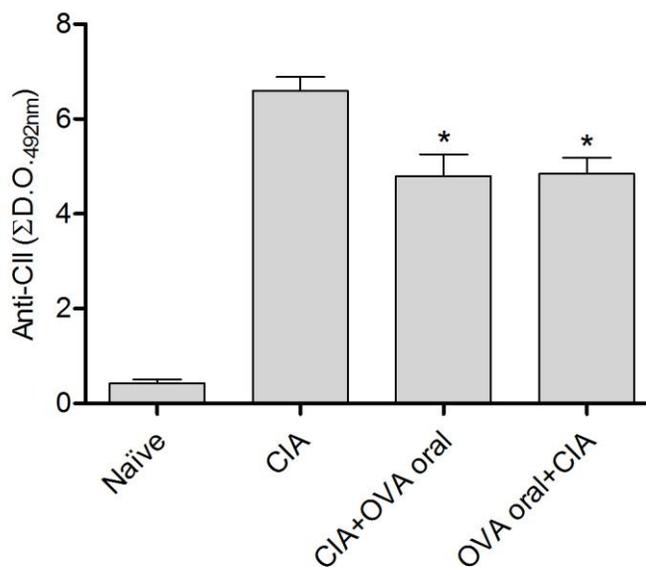
Conforme ilustrado na Figura 9, as respostas *in vitro* de linfócitos T esplênicos cultivados na presença de CII também foram significativamente mais reduzidas em animais que receberam a OVA por via oral, antes e depois da imunização parenteral com CII+OVA para indução de artrite, muito embora a linfoproliferação tenha sido significativamente mais reduzida nas culturas de linfócitos obtidos de camundongos previamente tratados com OVA por via oral.

Entre os linfócitos antígeno-específicos que proliferaram nas culturas, observa-se um aumento significativo na frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e de células TCD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (Figura 10, Painéis A e B, respectivamente), bem como a redução significativa na frequência de células TCD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> e TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> (Figura 10, painéis C e D, respectivamente), em culturas conduzidas com células esplênicas de camundongos tratados com OVA por via oral, antes ou depois da indução de artrite.

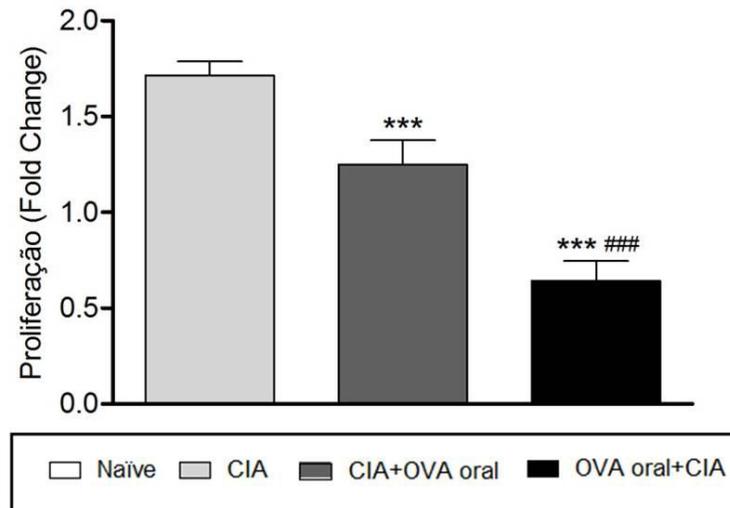
A produção de citocinas pró-inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, bem como de IL-12, nas culturas de células esplênicas obtidas de camundongos tratados com OVA por via oral, antes ou depois da indução de artrite, foi significativamente mais reduzida do que no grupo artrítico, com algumas das citocinas (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-17) chegando aos níveis observados nas

---

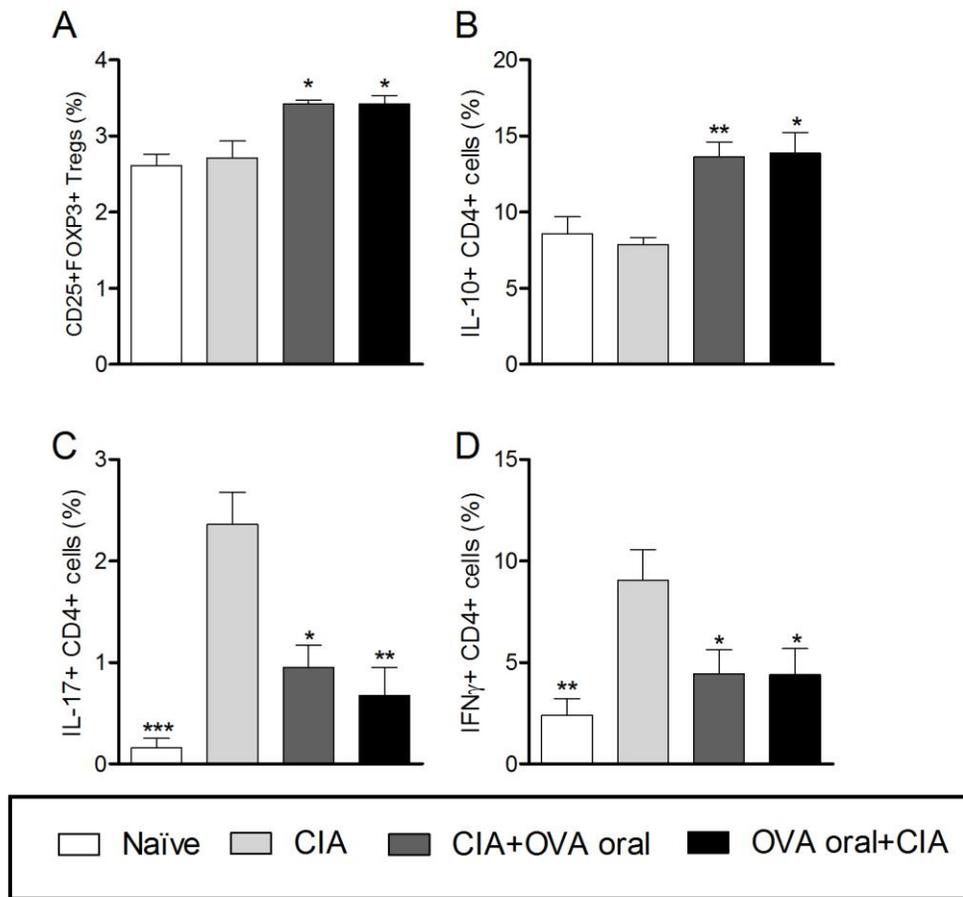
culturas de linfócitos do grupo naïve (Figura 11, Painéis A-E). Em contrapartida, as citocinas anti-inflamatórias como IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$  foram encontradas em níveis mais elevados nos sobrenadantes de culturas de esplenócitos de camundongos alimentados com OVA, antes ou depois da indução de artrite, embora apenas o incremento de IL-10 tenha sido estatisticamente significativo nas culturas dos dois grupos tratados oralmente com OVA (Figura 11, Painel F) e o de IL-4 e TGF- nas culturas de esplenócitos de camundongos que ingeriram OVA depois de induzida a artrite (Figura 11, Painéis Ge H, respectivamente).



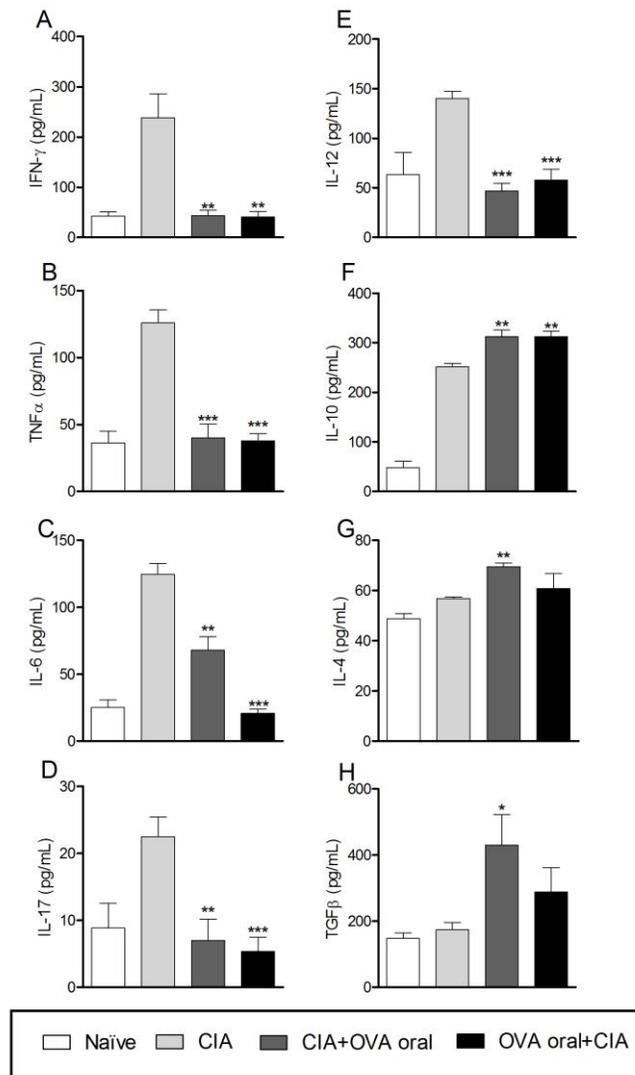
**Figura 8 – Efeitos da administração de OVA por via oral sobre a produção de anticorpos em camundongos BALB/c artríticos.** Camundongos BALB/c foram tratados com OVA por via oral antes ou depois da imunização com CII+OVA por via subcutânea para estabelecimento da CIA. Sessenta dias após primeira dose parenteral de antígenos, os camundongos de cada grupo indicado na figura foram sangrados para a separação de soros, que foram ensaiados individualmente nas diluições de 1:100 até 1:12800 para avaliação dos níveis de anticorpos por ELISA. Os dados representam os níveis séricos de anticorpos anti-CII. Cada barra representa a média  $\pm$  E.P.M. da somatória das densidades ópticas obtidas nas diferentes das diluições dos soros. Cada grupo consistiu de cinco camundongos e os dados são representativos de três experimentos independentes. (\*) estatisticamente significativo com valores de  $P < 0,05$ , na comparação pelo teste t de Student com o grupo CIA.



**Figura 9 – Efeito do tratamento oral com OVA sobre a proliferação específica de linfócitos T esplênicos de animais artríticos.** Camundongos BALB/c foram tratados com OVA por via oral antes ou depois da imunização com CII+OVA por via sc para estabelecimento da CIA. Aos sessenta dias após o desafio antigênico, os baços foram removidos e as células esplênicas marcadas com a sonda CFSE foram cultivadas na presença de CII (50µg/mL). A proliferação foi avaliada pelo decaimento da fluorescência da sonda na gate de células CD3<sup>+</sup>. Barras representam a média + E.P.M. de quantas vezes houve aumento da multiplicação celular com base na proliferação de células de animais naïve. (\*\*\*) valores de P<0,005 na comparação pelo teste t de Student com o grupo CIA. (###) valores de p<0,005 na comparação pelo teste t de Student com o grupo CIA+OVA oral. Dados representativos de três experimentos independentes.



**Figura 10 – Avaliação do perfil das células em proliferação.** Camundongos BALB/c foram tratados com OVA por via oral antes ou depois da imunização com CII+OVA por via sc para estabelecimento da CIA. Aos sessenta dias após o desafio antigênico, os baços foram removidos e as células esplênicas foram cultivadas na presença de CII (50 $\mu$ g/mL) por 96h. As células foram marcadas ao final do período para avaliação da frequência de Tregs (painel A), células TCD4+ produtoras de IL-10 (painel B), IL-17 (painel C) e IFN $\gamma$  (painel D). Barras representam a média + E.P.M. das frequências observadas. Os valores de  $P < 0,05$ ,  $p < 0,01$  e  $P < 0,005$  (\*, \*\*, \*\*\*, respectivamente) foram considerados significativos na comparação pelo teste t de Student com o grupo CIA. Dados representativos de dois experimentos independentes.



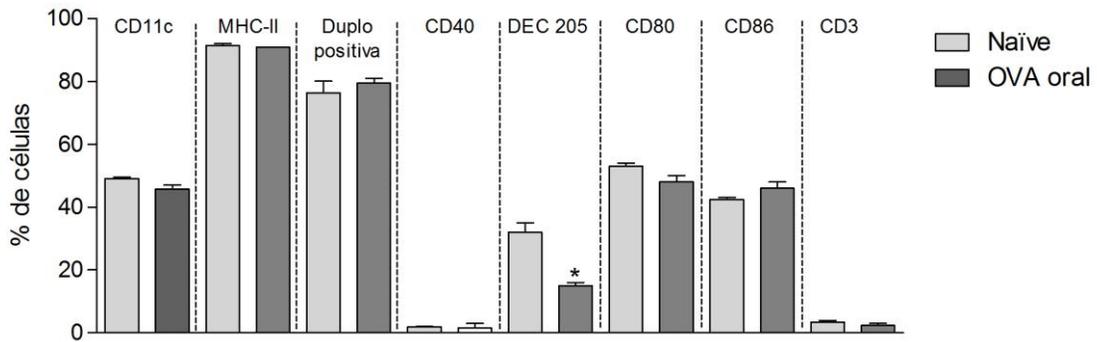
**Figura 11 – Efeito do tratamento oral com OVA sobre a produção de citocinas em culturas de esplenócitos de camundongos artríticos.** Dosagem das citocinas IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-4 e IL-12p40 (painéis A-H, respectivamente) em sobrenadantes de cultura, empregando Kits de ELISA (e-Bioscience). Os valores de P<0,05, P<0,01 e P<0,005 (\*, \*\*, \*\*\*, respectivamente) foram considerados significativos na comparação pelo teste t de Student com o grupo CIA. Dados representativos de dois experimentos independentes.

*Alimentação com OVA induz células dendríticas capazes de modular as respostas imunes in vitro à CII*

Os experimentos de co-culturas de linfócitos T e DCs descritos a seguir tiveram por finalidade avaliar o papel desempenhado por DCs nas alterações das respostas imunes observadas no reestabelecimento de tolerância à CII induzida pela ingestão de OVA. Para isso, camundongas BALB/c foram tornadas tolerantes à OVA, de acordo com o protocolo padrão empregado em nosso laboratório e descrito em Material e Métodos. DCs de animais naïve e tolerantes à OVA foram isoladas por seleção positiva, empregando-se contas magnéticas recobertas com anticorpos anti-CD11c. Por outro lado, o quadro de artrite foi induzido em camundongos BALB/c machos e suspensões enriquecidas em linfócitos T foram preparadas por passagens de suas células esplênicas em coluna de lã de nylon. Células T de camundongos naïve foram usadas como controles.

*a- Caracterização das células dendríticas CD11c<sup>+</sup> isoladas de baço*

Os perfis fenotípicos das DCs esplênicas, levando-se em conta os marcadores MHC classe II, CD40, DEC 205, CD80 e CD86, estão ilustrados na Figura 12. Embora as células CD11c<sup>+</sup> representem apenas cerca de 50% nas preparações de DCs em ambos os grupos, naïve e artrítico, a frequência de células TCD3<sup>+</sup> (linfócitos) foi em torno de 3,5%. Cerca de 100% das DCs isoladas eram MHCII<sup>+</sup> e em torno de 85% eram duplo positivas para CD11c e MHCII. Cerca de 40 a 50% das células expressavam CD80 e CD86, respectivamente.



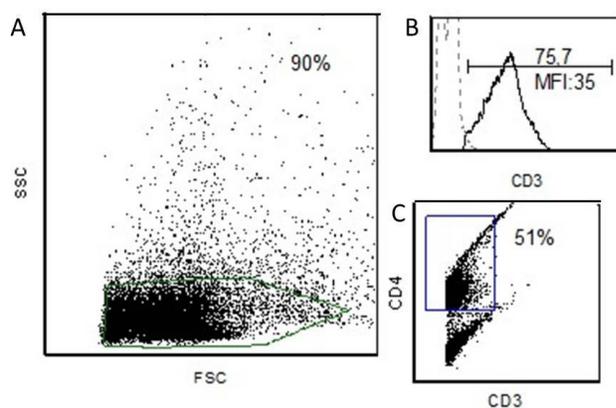
**Figura 12 – Avaliação fenotípica de células dendríticas esplênicas isoladas de camundongos tolerantes a OVA.** Células dendríticas esplênicas foram isoladas por contas magnéticas recobertas com anti-CD11c, de acordo com as recomendações do fabricante (Miltenyi Biotech Inc.). As células foram avaliadas por citometria de fluxo para marcação de proteínas de superfície (FACSARIA). As análises foram realizadas utilizando software FCSEXPRESS (De Novo Software). Os dados são representativos de três experimentos independentes. Foram considerados significativos os valores de  $P < 0,05$  (\*) na comparação pelo teste t de Student em relação ao grupo naïve.

*b- Enriquecimento de linfócitos T esplênicos*

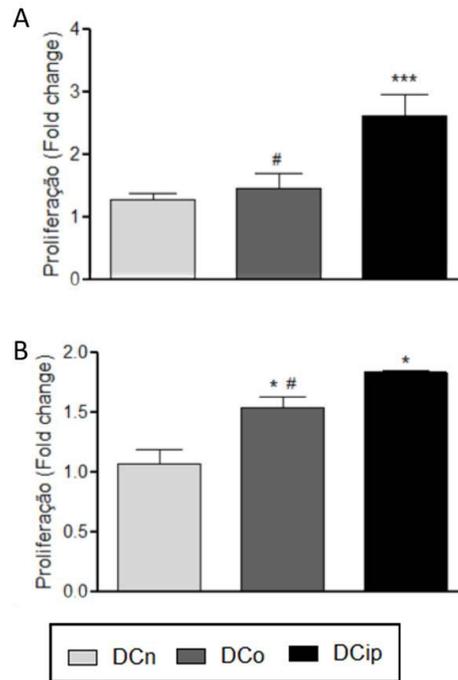
Como é possível observar no Painel A da Figura 13, cerca de 90% das células recuperadas após a passagem das suspensões de células esplênicas em coluna de lã de nylon apresentavam características de tamanho e granulosidade típicas de linfócitos. Cerca de 80% das células dentro desta gate marcaram com o anticorpo anti-CD3 específico para linfócitos T (Figura 13, painel B), dos quais 51% eram CD4<sup>+</sup> (Figura 13, Painel C).

*c- Redução da proliferação de linfócitos TCII-específicos em co-culturas conduzidas na presença de células dendríticas de camundongos tolerantes à OVA*

Linfócitos T esplênicos de camundongos naïve e artríticos foram cultivados na presença de DCs de camundongos naïve, tolerantes ou imunizados com OVA, pulsadas previamente por 18 horas com 50µg/ml de CII de galinha, que também foi incluído durante o cultivo. Os resultados obtidos nesses ensaios estão ilustrados na Figura 14. Não se observou diferença significativa na proliferação de linfócitos T naïve cultivados na presença de DCs isoladas de camundongos tolerantes ou naïve, ao contrário de culturas conduzidas com DCs isoladas de camundongos imunizados com OVA por via parenteral, que foram capazes de induzir crescimento significativo de linfócitos T naïve (Figura 14, Painel A). DCs isoladas tanto de camundongos tolerantes quanto de camundongos imunizados por via i.p. induziram crescimento das células T isoladas de camundongos artríticos, embora as co-culturas conduzidas na presença de DCs de animais tolerantes tivesse sido significativamente menor do que as que continham DCs de camundongos imunizados (Figura 14, Painel B).



**Figura 13 – Enriquecimento de linfócitos T esplênicos.** Brevemente, baços de camundongos naïve e artríticos foram coletados assepticamente e empregados para o isolamento de fração enriquecida em linfócitos T por coluna de lã de nylon. As células marcadas com anticorpos fluorescentes para moléculas de superfície foram analisadas por citometria de fluxo. (A) Delimitação da população de interesse por suas características de tamanho e granulosidade. (B) Células  $CD3^+$  na população total. (C) Células  $CD3^+CD4^+$  presentes na gate de  $CD3^+$ . As avaliações foram realizadas em FACS-Aria, e as análises foram realizadas com o aplicativo FCSExpress (De Novo Software).



**Figura 14 – Avaliação da proliferação de linfócitos T na presença de células dendríticas.**

Linfócitos T esplênicos isolados de camundongos naïve (painel A) ou artrítico (painel B) foram marcados com a sonda CFSE e postos em cultura juntamente com DCs provenientes de camundongos naïve (DCn), tolerantes (DCo) ou imunizados (DCip) com OVA, na presença de CII (50 $\mu$ g/mL). A proliferação foi avaliada pelo decaimento da fluorescência da sonda dentro da gate de células CD3<sup>+</sup> após 96 h de cultivo. Barras representam a média + E.P.M. de quantas vezes houve aumento da multiplicação celular com base na proliferação de células em ausência de DCs. Os valores de P<0,05 (\*) e P<0,005 (\*\*\*) foram considerados significativos na comparação pelo teste t de Student com as culturas conduzidas na presença de DCs naïve. Os valores de P<0,05 (#) foram considerados significativos na comparação pelo teste t de Student com as culturas conduzidas na presença de DCip. Dados representativos de dois experimentos independentes.

*d- Expansão de células T supressoras/reguladoras CII-específicas em co-culturas com células dendríticas de camundongos tolerantes OVA*

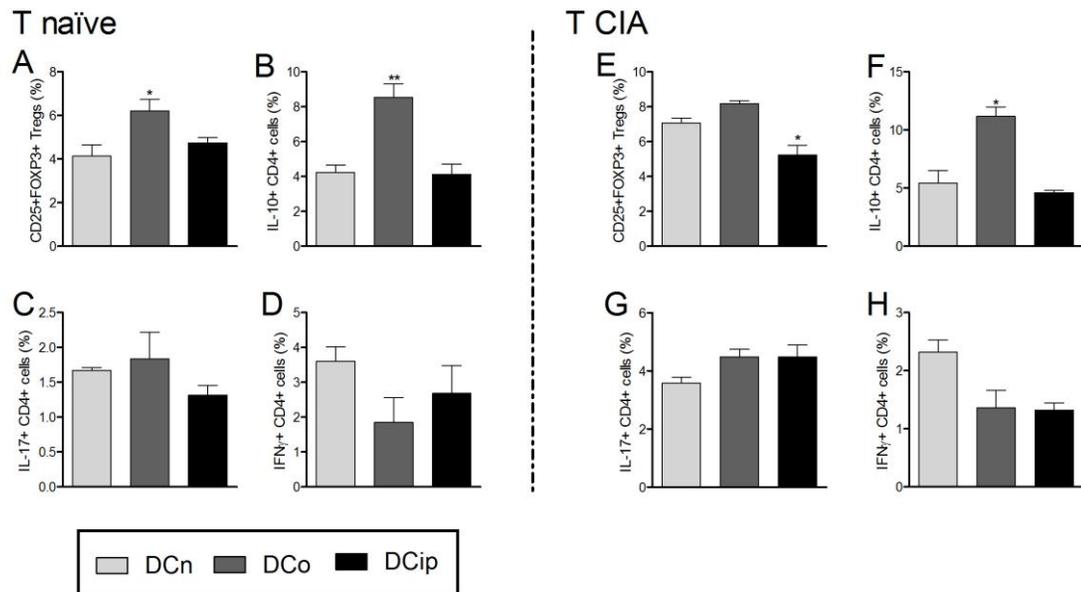
Entre os linfócitos T naïve CII-específicos que proliferaram nas co-culturas conduzidas na presença de DCs de animais tolerantes, observa-se um aumento significativo na frequência de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> e de células TCD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> em comparação com as conduzidas na presença de DCs naïve (Figura 15, Painéis A e B, respectivamente). A mesma tendência foi observada nas culturas conduzidas com linfócitos T de animais artríticos e DCs de camundongos tolerantes à OVA, embora nesse caso só tenha sido estatisticamente significativo o aumento da frequência de TCD4<sup>+</sup>IL-10<sup>+</sup> (Figura 15, Painéis E e F, respectivamente). Embora a frequência de linfócitos TCD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> CII-específicos tenha sido menor em co-culturas conduzidas com linfócitos T de animais naïve ou artríticos com DCs de camundongos tolerantes ou imunes à OVA, esses resultados não foram estatisticamente significativos (Figura 15, Painéis D e H, respectivamente). Também não foram observadas diferenças significativas na frequência de células TCD4<sup>+</sup>IL17<sup>+</sup> CII-específicos em co-culturas conduzidas com linfócitos T de camundongos naïve e artríticos e DCs de camundongos tolerantes ou imunes à OVA (Figura 15, Painéis C e G, respectivamente).

*e- Alterações na produção de citocinas em co-culturas de células T CII-específicas com células dendríticas de camundongos tolerantes OVA*

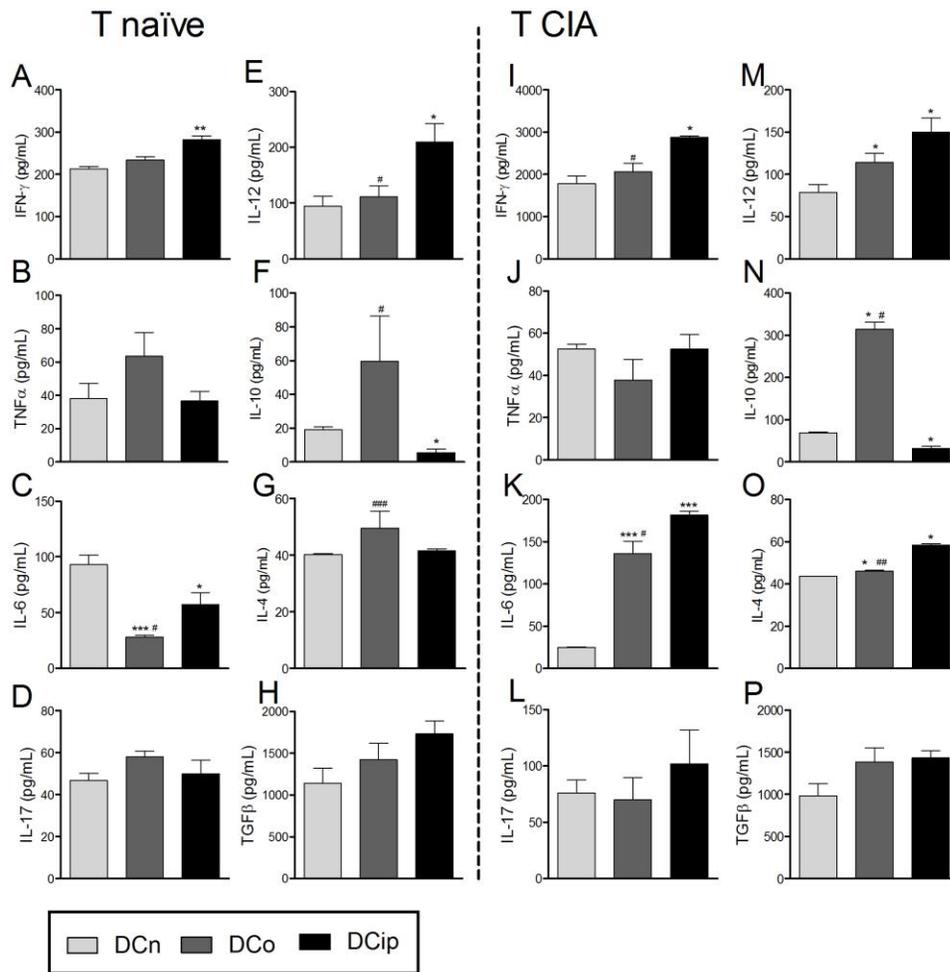
Como é possível observar na Figura 17, o cultivo de células T naïve CII-específicas com DCs de camundongos tolerantes à OVA resultou na redução significativa da produção de IL-6

---

(Figura 16, Painel C) e aumento da produção de IL-10 e IL-4 (Figura 16, Painéis F e G). O mesmo padrão se repetiu no cultivo de células T artríticas CII-específicas com DCs de camundongos tolerantes à OVA, cujos resultados estão ilustrados nos Painéis K (redução de IL-6), N e O (aumento de IL-10 e IL-4, respectivamente) da Figura 17. A IL-12 só foi significativamente mais elevada nas co-culturas entre linfócitos T CII-específicos de camundongos naïve ou artríticos com DCs de camundongos imunizados com OVA por via parenteral.



**Figura 15 – Avaliação do perfil das células em proliferação.** Linfócitos T esplênicos isolados de camundongos naïve ou artrítico foram marcados com a sonda CFSE e postos em cultura juntamente com DCs provenientes de camundongos naïve (DCn), tolerantes (DCo) ou imunizados (DCip) com OVA, na presença de CII (50ug/mL) por 96h. As células foram marcadas ao final do período para avaliação da frequência de TCD4+ produtoras de IL-17 (painéis A, E), IFN $\gamma$  (painéis B, F), IL-10 (painéis D, H) e Tregs Foxp3<sup>+</sup> (painéis C, G). As barras representam a média + E.P.M. das frequências celulares observadas. Os valores de P<0,05, P<0,01 e P<0,005 (\* e \*\*, respectivamente) foram considerados significativos na comparação pelo teste t de Student com as culturas conduzidas na presença de DCn. Os dados ilustrados são representativos de dois experimentos independentes.



**Figura 16 – Dosagens de citocinas em sobrenadantes de cultura de linfócitos T CII-específicos.** Os sobrenadantes das co-culturas de células T esplênicas e DCs de camundongos naïve, tolerantes e imunizados com OVA, conduzidas na presença de na CII, por 96 horas, foram coletados e ensaiados por ELISA de captura para a dosagem das citocinas IFN $\gamma$ , IL-17, IL-6, TNF $\alpha$ , IL-10, IL-4, IL-12p40 e TGF $\beta$ , empregando kit comercial (eBioscience). As análises estatísticas foram realizadas pelo teste não pareado de t de Student onde os valores de P<0,05 (\*), P<0,01 (\*\*) e P<0,005 (\*\*\*) foram considerados significativos na comparação com as culturas conduzidas na presença de DCs provenientes de camundongos naïve, e os valores de P<0,05, P<0,01 e P<0,005 (#, ## e ###, respectivamente) foram considerados significativos na comparação com as culturas conduzidas na presença de DCip. Os dados representativos de dois experimentos independentes.

### ***A transferência adotiva de células dendríticas modula a severidade da artrite experimental***

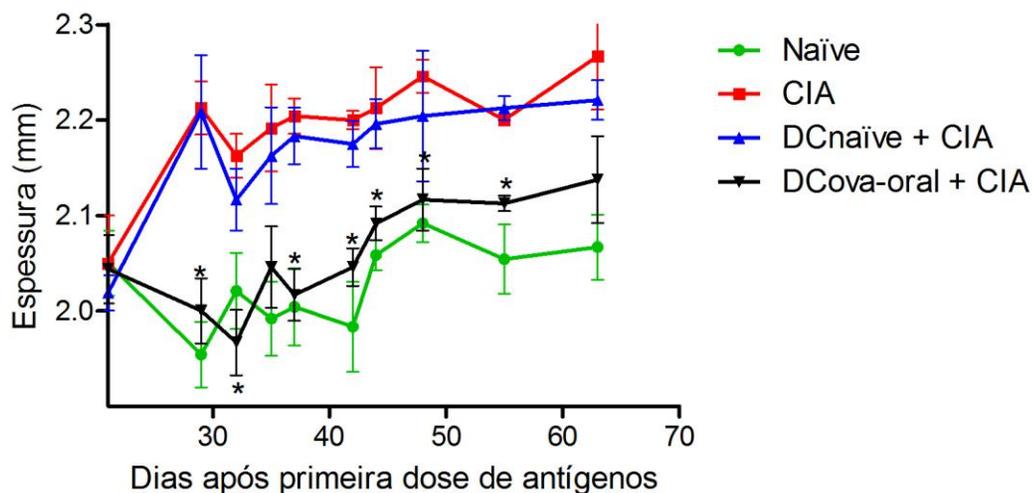
Os experimentos relatados a seguir tiveram por objetivo avaliar o papel de células dendríticas desenvolvidas em resposta imune de tolerância oral a antígeno não próprio (OVA) sobre o curso da artrite induzida em camundongos BALB/c pela administração de CII+OVA. Para isso, células dendríticas de camundongos naïve, imunizados e tolerantes à OVA foram purificadas por seleção positiva, empregando esferas magnéticas ligadas a anticorpos anti-CD11c, e então transferidas adotivamente para camundongos naïve nos dias 6, 4 e 2 antes da inoculação da primeira dose da mistura de antígenos indutores de artrite. Os resultados obtidos estão sumarizados nas Figuras 17 a 21.

#### ***a- Prevenção do desenvolvimento de edema de pata***

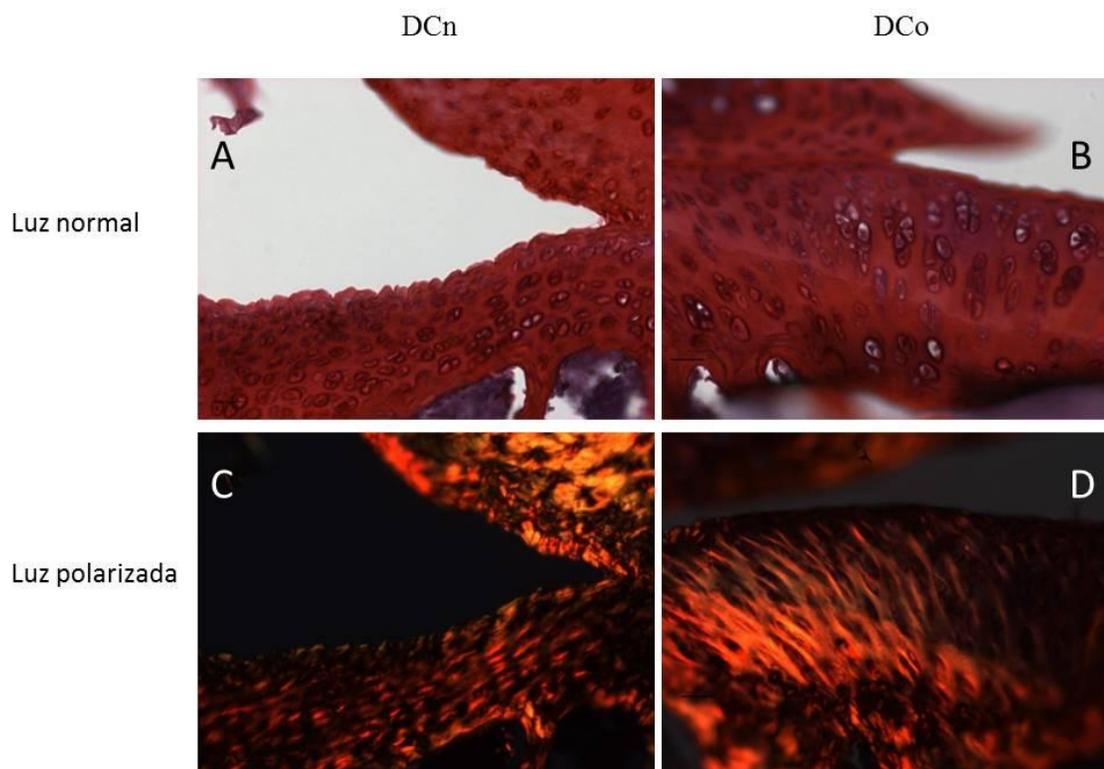
A Figura 17 mostra que a transferência passiva de DCs tolerantes para camundongos naïve preveniu o edema de pata que normalmente se observa no quadro de artrite exibido por esse modelo (Figura 17, painel B). A transferência adotiva de DCs naïve não teve o mesmo efeito protetor (Figura 17, Painel A).

#### ***b- Restauração da integridade dos tecidos articulares***

Da mesma forma, a transferência passiva de DCs tolerantes para camundongos naïve (Figura 18, Painel B e D) preveniu a instalação das alterações histológicas que se observa nas cartilagens articulares de camundongos BALB/c artríticos que receberam as DCs naïve (Figura 18, Painel A e C).



**Figura 17 – Progressão da artrite em camundongos BALB/c recipientes de células dendríticas.** Células dendríticas esplênicas de camundongas BALB/c naïve ou tolerantes a OVA foram isoladas por seleção positiva, usando esferas magnéticas recobertas com anti-CD11c, e a seguir transferidas adotivamente aos 6, 4 e 2 dias antes da aplicação da primeira dose de CII+OVA para indução de artrite em camundongos BALB/c (N=6). Os grupos controles foram formados por camundongos normais (Naïve) e camundongos artríticos sem qualquer outro tratamento (N=6). A espessura das patas foi medida rotineiramente para acompanhar o edema resultante da inflamação nas articulações após imunização parenteral. Os resultados representam a espessura média +E.P.M. dos grupos avaliados nos respectivos dias. (\*) estatisticamente significativos, com  $P < 0,05$  na comparação com o controle artrítico, pelo teste de t de Student.



**Figura 18 – Análise histológica das patas dos animais artríticos recipientes de células dendríticas.** Células dendríticas esplênicas de camundongas BALB/c naïve ou tolerantes a OVA foram transferidas adotivamente aos 6, 4 e 2 dias antes da aplicação da primeira dose de CII+OVA para indução de artrite em camundongos BALB/c (N=6). Os grupos controles foram formados por camundongos normais (Naïve) e camundongos artríticos sem qualquer outro tratamento (N=6). Aos sessenta dias após a primeira dose parenteral dos antígenos empregados na indução de artrite, os camundongos foram sacrificados e tiveram suas patas traseiras retiradas, descalcificadas, incluídas em parafina e cortadas em micrótomo (cortes de 5 $\mu$ m de espessura). Os cortes foram corados com Sirius Red para evidenciar as fibras de colágeno sob luz polarizada. Os painéis são representativos dos resultados obtidos em dois experimentos independentes com os grupos: controle (Naïve), artrítico (CIA), artríticos e posteriormente alimentados com OVA (CIA+OVA oral) e previamente alimentados com OVA e tornados artríticos (OVA oral+CIA).

c- *Níveis séricos de anticorpos anti-CII*

Não se observou diferenças significativas na produção de anticorpos séricos específicos anti-CII nos camundongos recipientes de DCs de camundongos naïve ou tolerantes à OVA, em comparação com os camundongos artríticos sem outro tratamento (Figura 19).

d- *Redução da linfoproliferação antígeno-específica, expansão de células T supressoras/reguladoras e produção de citocinas inflamatórias em cultura de células esplênicas de animais recipientes de células dendríticas tolerogênicas*

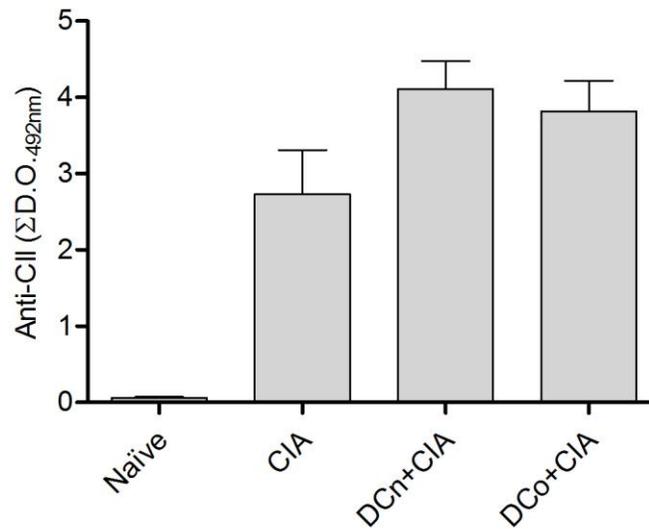
Como ilustrado na Figura 20, a transferência adotiva de DCs de camundongos tolerantes à OVA promoveu redução significativa da proliferação antígeno específica de células T esplênicas anti-CII em camundongos BALB/c imunizados com CII+OVA.

Entre as células que proliferaram na cultura, observa-se aumento significativo da frequência de linfócitos Treg Foxp3+ em recipientes de DCs tolerogênicas (Figura 21, Painel A) e de linfócitos TCD4+IL-10+ nas culturas de células esplênicas de camundongos recipientes de DCs naïve e tolerogênicas (Figura 21, Painel B).

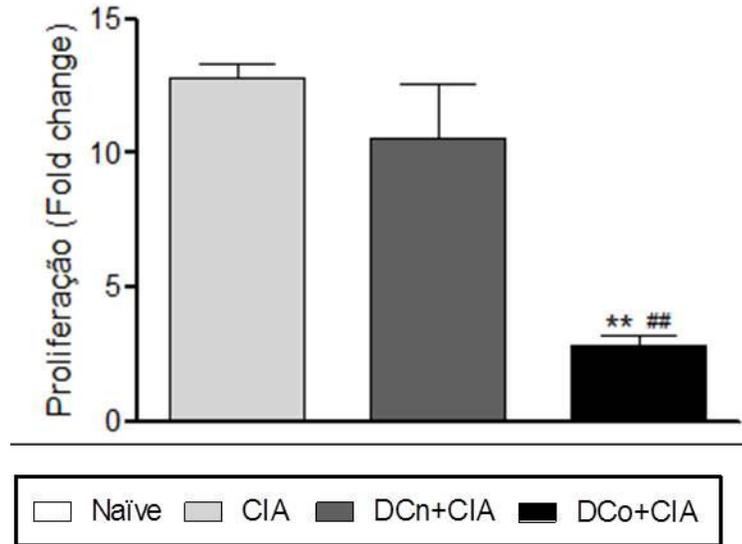
Os níveis de citocinas inflamatórias IFN- $\gamma$ , TNF-, IL-6 e IL-17 estavam mais reduzidos nas culturas de células esplênicas de camundongos recipientes de DCs tolerogênicas, embora as diferenças não tenham sido significativa para a citocina IL-17 (Figura 22, Painéis A a D, respectivamente). Por outro lado, observou-se elevação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias IL-10, IL-4, e TGF- $\beta$  nas culturas de células esplênicas de camundongos recipientes de DCs tolerogênicas e de IL-10 e IL-4 nas culturas de células esplênicas de camundongos recipientes de DCs naïve (Figura 22, Painéis F a H, respectivamente). A produção de IL-12 foi significativamente mais elevada nas culturas de células esplênicas de camundongos recipientes de

---

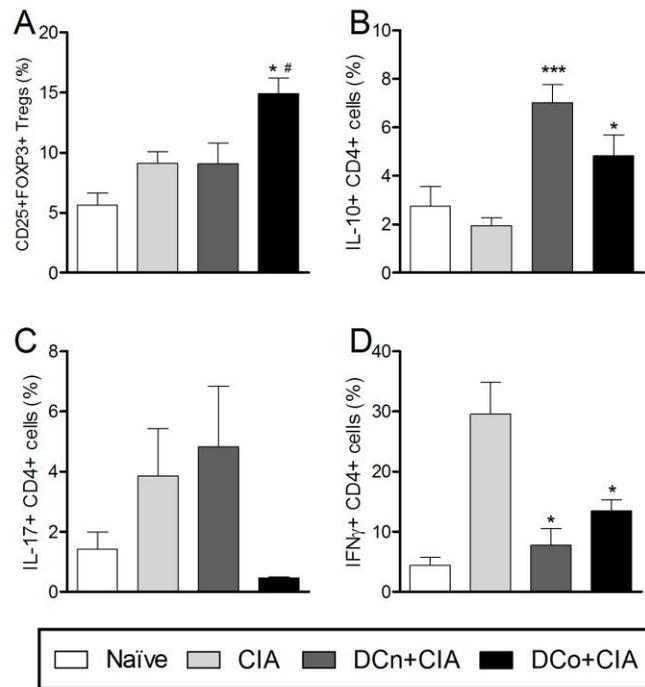
DCs naïve e tolerogênicas em comparação aos controles naïve e artríticos sem outros tratamentos  
(Figura 22, Painel E).



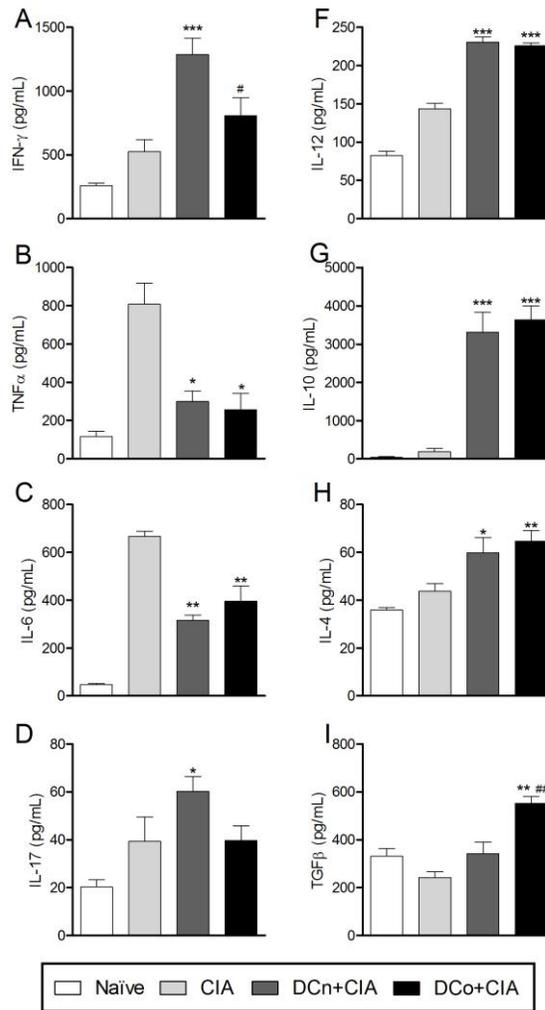
**Figura 19 – Efeito da transferência de células dendríticas sobre os níveis séricos de anticorpos anti-CII em camundongos artríticos.** Células dendríticas esplênicas de camundongas BALB/c naïve ou tolerantes a OVA foram transferidas adotivamente aos 6, 4 e 2 dias antes da aplicação da primeira dose de CII+OVA para indução de artrite em camundongos BALB/c (N=6). Os grupos controles foram formados por camundongos normais (Naïve) e camundongos artríticos sem qualquer outro tratamento (N=6). Sessenta dias após primeira dose parenteral dos antígenos empregados para a indução de artrite, os animais de cada grupo indicado na figura foram sangrados para a separação de soros, que foram ensaiados individualmente nas diluições de 1:100 até 1:12800 para avaliação dos níveis de anticorpos anti-CII por ELISA. As barras representam a média  $\pm$  E.P.M. da somatória das densidades ópticas obtidas nas diferentes das diluições dos soros. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.



**Figura 20 – Efeito da transferência de células dendríticas sobre a proliferação específica de células esplênicas de animais artríticos.** Células dendríticas de camundongos naïve (DCn) ou tolerantes a OVA (DCo) foram transferidas adotivamente 6, 4 e 2 dias antes da imunização com CII+OVA por via s.c. para estabelecimento da CIA (N=6). Os grupos controles foram formados por camundongos normais (Naïve) e camundongos artríticos sem qualquer outro tratamento (N=6). Aos sessenta dias após o desafio antigênico, os baços foram removidos e as células esplênicas marcadas com a sonda CFSE foram cultivadas na presença de CII (50µg/mL). A proliferação foi avaliada pelo decaimento da fluorescência da sonda na gate de células CD3<sup>+</sup>. Barras representam a média + E.P.M. de quantas vezes houve aumento da multiplicação celular com base na proliferação de células de animais naïve. (\*\*) valores de P<0,01 na comparação pelo teste t de Student com o grupo CIA. (##) valores de P<0,01 na comparação pelo teste t de Student com o grupo DCn+CIA. Dados representativos de dois experimentos independentes.



**Figura 21 – Avaliação do perfil de células em proliferação.** Células dendríticas de camundongos naïve (DCn) ou tolerantes a OVA (DCo) foram transferidas adotivamente aos 6, 4 e 2 dias antes da imunização com CII+OVA por via s.c. para estabelecimento da CIA (N=6). Os grupos controles foram formados por camundongos normais (Naïve) e camundongos artríticos sem qualquer outro tratamento (N=6). Aos sessenta dias após o desafio antigênico, os baços foram removidos e as células esplênicas cultivadas na presença de CII (50ug/mL) por 96h. As células foram marcadas ao final do período para avaliação da frequência de Tregs (painel A), células TCD4+ produtoras de IL-10 (painel B), IL-17 (painel C) e IFN $\gamma$  (painel D). Barras representam a média + E.P.M. das frequências observadas. Os valores de  $P < 0,05$  e  $P < 0,005$  (\* e \*\*\*, respectivamente) foram considerados significativos na comparação com o grupo CIA pelo teste t de Student. Os valores de  $P < 0,05$  (#) foram considerados significativos na comparação com o grupo DCn+CIA pelo teste t de Student. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.



**Figura 22 – Dosagens de citocinas em sobrenadantes de cultura de linfócitos T CII-específicos.** Dosagem das citocinas IFN $\gamma$ , IL-6, IL-10, TGF $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-17, IL-4 e IL-12p40 nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos naïve, artríticos e recipientes de DCs naïve ou tolerogênicas conduzidas na presença de CII (50 $\mu$ g/mL), por 96 horas; nos ensaios foram empregados Kits de ELISA (e-Bioscience). Os valores de P<0,05, P<0,01 e P<0,005 (\*, \*\*, \*\*\*, respectivamente) foram considerados significativos na comparação com o grupo CIA pelo teste t de Student. Os valores de P<0,05 (#) e P<0,01 (##) foram considerados significativos na comparação com o grupo DCn+CIA. Os dados são representativos de dois experimentos independentes.

DISCUSSÃO

Neste trabalho mostramos que o quadro clínico de artrite desenvolvido por camundongos BALB/c imunizados com CII+OVA pode ser modulado pela tolerância oral à OVA, induzida tanto de forma ativa, por ingestão do antígeno, quanto passiva, através da transferência adotiva de células dendríticas tolerogênicas. Embora o camundongo BALB/c seja resistente à indução de artrite pela administração de CII bovino emulsionado com ACF, recentemente foi descrito o estabelecimento de CIA nesta linhagem murina quando uma proteína exógena não relacionada ao CII, como KLH ou OVA, é adicionada à preparação de imunógeno (BÄCKSTRÖM e DAHLGREN, 2007). Os autores desse estudo demonstraram que a artrite em BALB/c se caracterizava por inflamação articular menos severa do que a induzida em linhagens susceptíveis, mas nela estavam presentes a vermelhidão (eritema) e o inchaço (edema), típicos da doença.

Por apresentar-se como um quadro brando, logo nas primeiras tentativas de estabelecer o modelo de artrite em camundongos BALB/c em nosso laboratório, mudamos o método de avaliação da severidade da doença de escore clínico para mensuração do edema de pata, medindo-se a espessura das patas com o auxílio de paquímetro analógico. Isso nos permitiu acompanhar o desenvolvimento do quadro inflamatório em camundongos BALB/c, a partir da aplicação da segunda dose de antígenos no vigésimo primeiro dia, o qual se manteve presente durante todo o período de observação (60 dias) e prosseguiu até o centésimo terceiro dia depois do primeiro desafio (*dados não mostrados*).

O exame de cortes histológicos da região do joelho de camundongos BALB/c desafiados com CII+OVA confirmaram o desenvolvimento de um processo inflamatório articular típico da artrite experimental. Em preparações histológicas de tecido de joelhos de camundongos sadios é possível delimitar três regiões distintas a partir da luz sinovial: zona de cartilagem germinativa ou em crescimento (CP), zona de cartilagem hipertrófica ou de calcificação (CC) e zona óssea ou de

ossificação (CO). As células da zona de cartilagem germinativa são principalmente condroblastos, em pares ou isolados, em proliferação. Na camada de calcificação se localizam células hipertróficas volumosas, com retículo endoplasmático rugoso e complexo de Golgi desenvolvidos, refletindo a intensa produção e secreção de componentes da matriz extracelular. Nessa região há aumento da deposição de colágeno, característico do processo de calcificação. A ossificação observada na zona óssea é acompanhada da morte das células hipertróficas por apoptose (WOLFF, 2007). Em cortes histológicos de tecidos de joelhos de camundongos BALB/c artríticos, contudo, observamos que a delimitação dessas zonas não estava preservada. Ao contrário, observou-se alteração na posição das células hipertróficas, que invadiam a camada proliferativa. Além das alterações estruturais, também observamos hiperplasia das células presentes nas cartilagens. Dados similares aos nossos, referentes a alterações ósseas e cartilaginosas em articulações de animais artríticos, encontram-se descritos na literatura (OESTERGAARD *et al.*, 2008).

Corroborando os dados de BÄCKSTRÖM e colaboradores (2007), também observamos que os camundongos BALB/c inoculados com CII+OVA apresentaram níveis elevados de anticorpos séricos e proliferação *in vitro* de linfócitos T CII-específicos, indicando a participação de respostas imunes humoral e celular contra antígenos da cartilagem articular no desenvolvimento na artrite em camundongos BALB/c, como ocorre em outros modelos experimentais da doença (HOLMDAHL *et al.*, 2002; TANAKA-WATANABE *et al.*, 2009).

A tolerância oral se caracteriza pela supressão ativa de resposta imune específica após contato prévio com mesmo antígeno introduzido pela via oral (WEINER *et al.*, 1994). No presente trabalho, mostramos que a tolerância oral à OVA foi capaz de reduzir profilática e terapêuticamente a severidade do quadro clínico de artrite induzida em camundongos BALB/c

pela imunização com CII+OVA. Nossos resultados mostraram que a ingestão de OVA antes da aplicação da primeira dose da mistura de antígenos preveniu o aparecimento do edema de pata que se observa no camundongo artrítico. De forma similar, os camundongos BALB/c artríticos que ingeriram OVA por uma semana entre a segunda e a terceira dose de imunógenos apresentaram redução significativa do edema de patas. Enquanto o tratamento profilático com OVA por via oral preveniu o aparecimento das alterações articulares observadas em preparações de joelhos de camundongos naïve subsequentemente desafiados com CII+OVA, camundongos artríticos tratados com OVA após o estabelecimento do quadro mostraram recuperação parcial da organização dos tecidos articulares. Observamos ainda redução da produção de anticorpos séricos anti-CII, bem como da proliferação de linfócitos T CD4+ CII-específicos nas culturas de células esplênicas de camundongos tratados oralmente com OVA, na comparação com animais artríticos sem tratamento oral. Entre os linfócitos TCD4+ CII-específicos presentes nas culturas de células esplênicas de camundongos alimentados com OVA observou-se a expansão de T reguladoras (CD4+CD25+FOXP3+) e de linfócitos T CD4+ produtores de IL-10, bem como a redução das populações produtoras de IL-17 e IFN $\gamma$ . De forma semelhante, evidenciou-se aumento significativo dos níveis de citocinas com papel anti-inflamatório (IL-10, TGF $\beta$ , IL-4) nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos de animais tratados oralmente com OVA em detrimento da secreção de citocinas pró-inflamatórias (IFN $\gamma$ , IL-17, TNF $\alpha$ , IL-6, IL-12). Neste sentido, encontra-se relatado na literatura o papel essencial desempenhado por IL-17 e IFN $\gamma$  na manutenção do quadro inflamatório e dano tecidual observados em doenças autoimunes humanas e experimentais, bem como sua redução se associando à melhoria dos quadros clínicos (KOTAKE *et al.*, 1999a; KOTAKE *et al.*, 1999b; BENNETT *et al.*, 2003; LUBBERTS *et al.*, 2004; ROARK *et al.*, 2007). A literatura mostra redução do quadro de artrite em camundongos

tornados tolerantes à CII pela ingestão prévia da proteína encapsulada em nanopartículas biodegradáveis (KIM et al., 2002) ou na forma nativa (MIN et al., 2004). Da mesma forma, a ingestão de OVA também foi capaz de reduzir os parâmetros imunológicos da artrite induzida em camundongos DBA/1, embora os sinais clínicos não tenham sido significativamente reduzidos (BÄCKSTRÖM e DAHLGEN, 2004). Nossos resultados, contudo, mostraram que a tolerância oral à OVA é capaz de modular de modo profilático e terapêutico a inflamação observada em cartilagens sinoviais de camundongos BALB/c artríticos, provavelmente por mecanismos envolvendo a redução dos níveis de anticorpos séricos anti-CII e expansão de células Tregs, secretoras de citocinas anti-inflamatórias. Infelizmente, não pudemos determinar a(s) sub-classe(s) de IgG que contribuíram para a redução dos níveis de anticorpos anti-CII nos soros dos animais tolerantes, mas é possível que sejam da subclasse IgG2 uma vez que observamos redução de citocinas do perfil TH1 associada ao quadro de melhora da artrite induzida pela tolerância oral à OVA. Corroborando esta hipótese, tem-se a redução de IgG2a observada por Bäckström e Dahlgren (2003) em camundongos DBA/1 alimentados com OVA antes da coimunização com CII bovino e OVA.

Sabe-se que o estabelecimento da tolerância depende da atuação de diversas células com potencial regulador, dentre as quais se destacam as células dendríticas (STEINMAN e NUSSENZWEIG, 2002; STEINMAN *et al.*, 2003). Há relatos indicando que as células dendríticas também desempenham um papel importante na indução e manutenção da tolerância oral (WORBS *et al.*, 2006; SHIOKAWA *et al.*, 2009). Com base nesse pressuposto, buscamos avaliar se DCs de animais tolerantes a OVA participavam da modulação da resposta específica de linfócitos T CII-específicos. Nossos resultados mostraram que, embora o cultivo de linfócitos T de animais artríticos com células dendríticas esplênicas isoladas de camundongos tolerantes à

OVA tenha resultado em aumento da proliferação de linfócitos T CII-específicos na comparação com DCs naïve, essa proliferação foi menor do que a observada nos cultivos conduzidos na presença de DCs de camundongos imunizados com OVA por via i.p. A avaliação fenotípica mostrou, contudo, maior expansão de Treg e células produtoras de IL-10 nas culturas de linfócitos T naïve e artríticos co-cultivados com DCs de animais tolerantes, embora não tenham sido observadas diferenças significativas na frequência de células produtoras de IL-17 e IFN $\gamma$  nessas culturas. As culturas conduzidas na presença de DC tolerogênicas mostraram níveis mais elevados das citocinas IL-4 e IL-10 e mais reduzidos de IL-6 e IL-12 do que as culturas realizadas na presença de DCs provenientes de animais naïve e imunizados por via i.p., respectivamente. Contudo, os níveis de citocinas IL-17, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e TGF $\beta$  permaneceram inalterados nas culturas, qualquer que fosse a origem das DCs. De modo geral, os resultados obtidos nos ensaios de apresentação antigênica conduzidos na presença de DCs tolerogênicas se assemelham aos observados nas culturas conduzidas com células esplênicas de camundongos artríticos tornados tolerantes à OVA, particularmente aqueles relacionados à expansão de Treg Foxp3<sup>+</sup> e alteração do padrão de citocinas secretadas, e indicam que células dendríticas podem desempenhar um papel importante na modulação das respostas observadas nos animais que receberam OVA por via oral. Por essa razão, a próxima etapa do nosso estudo foi avaliar se transferência de DCs provenientes de camundongos tolerantes a OVA era capaz de modular a artrite experimental de forma similar ao observado quando a tolerância é induzida de forma ativa.

A transferência de DCs com perfil tolerogênico vem sendo utilizada em modelos experimentais para avaliar seu papel em autoimunidades e alergias (KO *et al.*, 2009; LU *et al.*, 2011). Contudo, as DCs empregadas na modulação da artrite induzida por colágeno (KO *et al.*, 2009) e na alergia experimental (LU *et al.*, 2011) foram isoladas de animais desafiados ou eram

células pulsadas com o antígeno próprio desencadeador das respostas inflamatórias. Em nossos estudos, as DCs tolerogênicas foram obtidas de camundongos isogênicos tolerantes à OVA, uma proteína não relacionada quimicamente ao colágeno tipo II. Nossos resultados mostraram que a transferência de DCs tolerogênicas produzidas em resposta à OVA, mas não de DCs naïve, preveniu o edema de patas em camundongos imunizados subsequentemente com a mistura de antígenos CII+OVA, e que as estruturas de suas cartilagens sinoviais encontravam-se bem preservadas. A transferência de DCs tolerogênicas, no entanto, não afetou de modo significativo os níveis séricos de anticorpos anti-CII entre os grupos. Resta-nos, contudo, avaliar a eventual mudança de isotipo dos anticorpos anti-CII após a transferência adotiva das DCs tolerogênicas.

Por outro lado, a proliferação de linfócitos T esplênicos de camundongos artríticos recipientes de DCs tolerogênicas em resposta ao CII, foi menor do que a de linfócitos T de animais artríticos, mas com expansão significativa de linfócitos Treg Foxp3+ e células TCD4+ produtoras de IL-10 em detrimento de células produtoras de IFN $\gamma$  e IL-17, na comparação com as culturas de células de animais artríticos não tratados com DCs. De forma semelhante, as citocinas liberadas evidenciam mudança no perfil de secreção, tendo havido aumento predominante de citocinas anti-inflamatórias e redução das pró-inflamatórias nas culturas de células esplênicas de camundongos artríticos recipientes de DCs tolerogênicas.

Tomados em conjunto, nossos dados mostram que a artrite experimental pode ser modulada pela tolerância oral a uma proteína não relacionada, como a OVA, induzida tanto de forma ativa (ingestão voluntária) quanto de forma passiva (transferência adotiva de células dendríticas). O desencadeamento de artrite em animais geneticamente resistentes abriu novas perspectivas para o entendimento de casos humanos de artrite reumatoide em indivíduos

portadores de HLA de classe II considerados não susceptíveis. Do mesmo modo, a modulação da CIA pelo encontro com o antígeno não próprio por via oral reforça a importância da manutenção de ambiente tolerogênico nas mucosas, como um meio de prevenção às respostas autoimunes. Apesar dos nossos achados confirmarem um papel para a tolerância oral não específica na artrite, os possíveis mecanismos subjacentes ao fenômeno ainda precisam ser mais bem estudados.

CONCLUSÃO

Nossos resultados indicam que a indução de tolerância a uma proteína não relacionada ao CII próprio é capaz de modular a resposta inflamatória da artrite experimental, e que células dendríticas desempenham papel importante nos fenômenos observados.

*REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ABRAMS, J. R., M. G. LEBWOHL, *et al.* CTLA4Ig-mediated blockade of T-cell costimulation in patients with psoriasis vulgaris. J Clin Invest, v.103, n.9, May, p.1243-52. 1999.

ALVAREZ-QUIROGA, C., C. ABUD-MENDOZA, *et al.* CTLA-4-Ig Therapy Diminishes the Frequency but Enhances the Function of Treg Cells in Patients with Rheumatoid Arthritis. J Clin Immunol, Apr 13. 2011.

ANDRIOPOULOS, N. A., J. MESTECKY, *et al.* Antibodies to human native and denatured collagens in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis. Clin Immunol Immunopathol, v.6, n.2, Sep, p.209-12. 1976a.

\_\_\_\_\_. Antibodies to native and denatured collagens in sera of patients with rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, v.19, n.3, May-Jun, p.613-7. 1976b.

APOSTOLIDIS, S. A., J. C. CRISPIN, *et al.* IL-17-producing T cells in lupus nephritis. Lupus, v.20, n.2, Feb, p.120-4. 2011.

ARNETT, F. C., S. M. EDWORTHY, *et al.* The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, v.31, n.3, Mar, p.315-24. 1988.

BÄCKSTRÖM, N. F. e V. I. H. DAHLGEN. Bystander suppression of collagen-induced arthritis in mice fed ovalbumin. Arthritis Research Ther., v.6, n.2, p.R151-R160. 2004.

BÄCKSTRÖM, N. F. e V. I. H. DAHLGREN. Induction of experimental arthritis in Balb/c mice by inclusion of a foreign protein in the collagen inoculum. Scandinavian Journal of Immunology. 2007.

BAHRI, R., A. NAJI, *et al.* Dendritic cells secrete the immunosuppressive HLA-G molecule upon CTLA4-Ig treatment: implication in human renal transplant acceptance. J Immunol, v.183, n.11, Dec 1, p.7054-62. 2009.

BANCHEREAU, J., F. BRIERE, *et al.* Immunobiology of dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.18, p.767-811. 2000.

BARDOS, T., M. CZIPRI, *et al.* CD4+CD25+ immunoregulatory T cells may not be involved in controlling autoimmune arthritis. Arthritis Res Ther, v.5, n.2, p.R106-13. 2003.

BENNETT, L., A. K. PALUCKA, *et al.* Interferon and granulopoiesis signatures in systemic lupus erythematosus blood. J Exp Med, v.197, n.6, Mar 17, p.711-23. 2003.

BOWERS, W. E. e M. R. BERKOWITZ. Differentiation of dendritic cells in cultures of rat bone marrow cells. J Exp Med, v.163, n.4, Apr 1, p.872-83. 1986.

BRAND, D. D., A. H. KANG, *et al.* Immunopathogenesis of collagen arthritis. Springer Semin Immunopathol, v.25, n.1, Aug, p.3-18. 2003.

BRENNAN, T. V., Q. TANG, *et al.* Requirements for Prolongation of Allograft Survival with Regulatory T Cell Infusion in Lymphosufficient Hosts. J Surg Res, Apr 5. 2011.

BRENOL, C. V., O. A. MONTICIELO, *et al.* Artrite reumatóide e aterosclerose. Rev Assoc Med Bras, v.53, n.5, p.165-170. 2007.

BUDHU, A., M. FORGUES, *et al.* Prediction of venous metastases, recurrence, and prognosis in hepatocellular carcinoma based on a unique immune response signature of the liver microenvironment. Cancer Cell, v.10, n.2, Aug, p.99-111. 2006.

CAMPBELL, I. K., J. A. HAMILTON, *et al.* Collagen-induced arthritis in C57BL/6 (H-2b) mice: new insights into an important disease model of rheumatoid arthritis. European Journal of Immunology, v.30, p.1568-1575. 2000.

CHO, Y. G., M. L. CHO, *et al.* Type II collagen autoimmunity in a mouse model of human rheumatoid arthritis. Autoimmunity Reviews. 2007.

CHU, C. Q., Z. SONG, *et al.* IFN deficient C57BL/6 (H-2b) mice develop collagen-induced arthritis with predominant usage of T cell receptor VB6 and VB8 in arthritic joints. Ann. Rheum. Dis., v.62, p.983-990. 2003.

CHU, C. Q., D. SWART, *et al.* Interferon-gamma regulates susceptibility to collagen-induced arthritis through suppression of interleukin-17. Arthritis Rheum, v.56, n.4, Apr, p.1145-51. 2007.

COBELENS, P. M., A. KAVELAARS, *et al.* The B<sub>2</sub>-Adrenergic agonist salbutamol potentiates oral induction of tolerance, suppressing adjuvant arthritis and antigen-specific immunity. The Journal of Immunology, v.169, p.5028-5035. 2002.

COQUERELLE, C., G. OLDENHOVE, *et al.* Anti-CTLA-4 treatment induces IL-10-producing ICOS<sup>+</sup> regulatory T cells displaying IDO-dependent anti-inflammatory properties in a mouse model of colitis. Gut, v.58, n.10, Oct, p.1363-73. 2009.

COURTENAY, J. S., M. J. DALLMAN, *et al.* Immunisation against heterologous type II collagen induces arthritis in mice. Nature, v.283, n.5748, Feb 14, p.666-8. 1980.

CURIEL, T. J. Tregs and rethinking cancer immunotherapy. J Clin Invest, v.117, n.5, May, p.1167-74. 2007.

DAI, G. e D. N. MCMURRAY. Effects of modulating TGF- $\beta$ 1 on immune responses to mycobacterial infection in guinea pigs. Tubercle and Lung Diseases, v.79, n.4, p.207-214. 1999.

DANNULL, J., Z. SU, *et al.* Enhancement of vaccine-mediated antitumor immunity in cancer patients after depletion of regulatory T cells. J Clin Invest, v.115, n.12, Dec, p.3623-33. 2005.

DI IANNI, M., F. FALZETTI, *et al.* Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. Blood, v.117, n.14, Apr 7, p.3921-8. 2011.

DITTEL, B. N., I. VISINTIN, *et al.* Presentation of the self antigen myelin basic protein by dendritic cells leads to experimental autoimmune encephalomyelitis. J Immunol, v.163, n.1, Jul 1, p.32-9. 1999.

DOODES, P. D., Y. CAO, *et al.* IFN-gamma regulates the requirement for IL-17 in proteoglycan-induced arthritis. J Immunol, v.184, n.3, Feb 1, p.1552-9. 2010.

ENK, A. H., H. JONULEIT, *et al.* Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma. Int J Cancer, v.73, n.3, Nov 4, p.309-16. 1997.

FARIA, A. M. e H. L. WEINER. Oral tolerance: therapeutic implications for autoimmune diseases. Clin Dev Immunol, v.13, n.2-4, Jun-Dec, p.143-57. 2006.

FELDMANN, M., F. M. BRENNAN, *et al.* Role of cytokines in rheumatoid arthritis. Annu. Rev Immunol, v.14, p.397-440. 1996.

FILIPPIN, L. I., R. VERCELINO, *et al.* Influência de processos redox na resposta inflamatória da Artrite Reumatóide. Rev Bras Reumatol, v.48, n.1, p.17-24. 2008.

FRANCESCHI, C., M. BONAFE, *et al.* Inflamm-aging. An evolutionary perspective on immunosenescence. Ann N Y Acad Sci, v.908, Jun, p.244-54. 2000.

FRIEDMAN, A. e H. L. WEINER. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. Proc Natl Acad Sci U S A, v.91, n.14, Jul 5, p.6688-92. 1994.

GANESAN, K., C. BALACHANDRAN, *et al.* Comparative studies on the interplay of testosterone, estrogen and progesterone in collagen induced arthritis in rats. Bone, v.43, n.4, Oct, p.758-65. 2008.

GAO, Q., S. J. QIU, *et al.* Intratumoral balance of regulatory and cytotoxic T cells is associated with prognosis of hepatocellular carcinoma after resection. J Clin Oncol, v.25, n.18, Jun 20, p.2586-93. 2007.

GERLI, R., O. BISTONI, *et al.* In vivo activated T cells in rheumatoid synovitis. Analysis of Th1- and Th2-type cytokine production at clonal level in different stages of disease. Clin Exp Immunol, v.129, n.3, Sep, p.549-55. 2002.

GHIRINGHELLI, F., P. E. PUIG, *et al.* Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation. J Exp Med, v.202, n.7, Oct 3, p.919-29. 2005.

GLANT, T. T., M. RADACS, *et al.* Proteoglycan-induced arthritis and recombinant human proteoglycan aggrecan G1 domain-induced arthritis in BALB/c mice resembling two subtypes of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum, v.63, n.5, May, p.1312-21. 2011.

GUERMONPREZ, P., J. VALLADEAU, *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.20, p.621-67. 2002.

HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. Anal Biochem, v.48, n.2, Aug, p.422-7. 1972.

HASHIMOTO, M., K. HIROTA, *et al.* Complement drives Th17 cell differentiation and triggers autoimmune arthritis. J Exp Med, v.207, n.6, Jun 7, p.1135-43. 2009.

HAYDEN, M. S. e S. GHOSH. Signaling to NF-kappaB. Genes Dev, v.18, n.18, Sep 15, p.2195-224. 2004.

HOLMDAHL, R., R. BOCKERMANN, *et al.* The molecular pathogenesis of collagen-induced arthritis in mice - a model for rheumatoid arthritis. Ageing Research Reviews, v.1, p.135-147. 2002.

HOSHINO, K. e T. KAISHO. Nucleic acid sensing Toll-like receptors in dendritic cells. Curr Opin Immunol, v.20, n.4, Aug, p.408-13. 2008.

ILAN, Y. Oral tolerance: can we make it work? Hum Immunol, v.70, n.10, Oct, p.768-76. 2009.

INGLIS, J. J., G. CRIADO, *et al.* Collagen-induced arthritis in C57BL/6 mice is associated with a robust and sustained T-cell response to type II collagen. Arthritis Research Ther., v.9, p.R113. 2007.

IWASAKI, A. Mucosal dendritic cells. Annu. Rev Immunol, v.25, n.1, p.381-418. 2007.

JAWAHEER, D., J. OLSEN, *et al.* Gender, body mass index and rheumatoid arthritis disease activity: results from the QUEST-RA Study. Clin Exp Rheumatol, v.28, n.4, Jul-Aug, p.454-61. 2010.

JOHANSSON, A. C. M., M. SUNDLER, *et al.* Genetic control of collagen-induced arthritis in a cross with NOD and C57BL/10 mice is dependent on gene regions encoding complement factor 5

and FcγRIIb and is not associated with loci controlling diabetes. European Journal of Immunology, v.31, p.1847-1856. 2001.

JUNG, Y. O., S. Y. MIN, *et al.* CD8α<sup>+</sup> dendritic cells enhance the antigen-specific CD4<sup>+</sup> T cell response and accelerate development of collagen-induced arthritis. Immunology Letters, v.111, p.76-83. 2007.

KAI, H., K. SHIBUYA, *et al.* Critical role for *M.tuberculosis* for dendritic cell maturation to induce collagen-induced arthritis in H-2b background of C57BL/6 mice. Immunology, v.118, p.233-239. 2006.

KAPPLER, J. W., N. ROEHM, *et al.* T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. Cell, v.49, n.2, Apr 24, p.273-80. 1987.

KELCHTERMANS, H., A. BILLIAU, *et al.* How interferon-gamma keeps autoimmune diseases in check. Trends Immunol, v.29, n.10, Oct, p.479-86. 2008.

KELCHTERMANS, H., E. SCHURGERS, *et al.* Effector mechanisms of interleukin-17 in collagen-induced arthritis in the absence of interferon-gamma and counteraction by interferon-gamma. Arthritis Res Ther, v.11, n.4, p.R122. 2009.

KIM, W. U., W. K. LEE, *et al.* Suppression of collagen-induced arthritis by single administration of poly(lactic-co-glycolic acid) nanoparticles entrapping type II collagen: a novel treatment strategy for induction of oral tolerance. Arthritis Rheum, v.46, n.4, Apr, p.1109-20. 2002.

KO, H. J., M. L. CHO, *et al.* CTLA4-Ig modifies dendritic cells from mice with collagen-induced arthritis to increase the CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cell population. J Autoimmun, Aug 7. 2009.

KORN, T., E. BETTELLI, *et al.* IL-17 and Th17 Cells. Annu Rev Immunol, v.27, p.485-517. 2009.

KOSCIELNY, A., T. BOERNER, *et al.* The role of dendritic cells in the gastrointestinal field effect. Transplantation proceedings, v.38, n.1, p.1815-1817. 2006.

KOTAKE, S., H. R. SCHUMACHER, JR., *et al.* Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in synovial tissues from patients with early stages of Chlamydia-associated arthritis and undifferentiated oligoarthritis and from healthy volunteers. Infect Immun, v.67, n.5, May, p.2682-6. 1999a.

KOTAKE, S., N. UDAGAWA, *et al.* IL-17 in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis is a potent stimulator of osteoclastogenesis. J Clin Invest, v.103, n.9, May, p.1345-52. 1999b.

KUANG, D. M., Q. ZHAO, *et al.* Activated monocytes in peritumoral stroma of hepatocellular carcinoma foster immune privilege and disease progression through PD-L1. J Exp Med, v.206, n.6, Jun 8, p.1327-37. 2009.

LASKARIN, G., U. KÄMMERER, *et al.* Antigen-presenting cells and materno-fetal tolerance: an emerging role for dendritic cells. American Journal of Reproductive Immunology, v.58, p.255-267. 2007.

LEFFERS, H. C., M. OSTERGAARD, *et al.* Efficacy of abatacept and tocilizumab in patients with rheumatoid arthritis treated in clinical practice: results from the nationwide Danish DANBIO registry. Ann Rheum Dis, v.70, n.7, Jul, p.1216-1222. 2011.

LEUNG, B. P., M. CONACHER, *et al.* A novel dendritic cell-induced model of erosive inflammatory arthritis: distinct roles for dendritic cells in T cell activation and induction of local inflammation. J Immunol, v.169, n.12, Dec 15, p.7071-7. 2002.

LEVIN, D., S. CONSTANT, *et al.* Role of dendritic cells in the priming of CD4+ T lymphocytes to peptide antigen in vivo. J Immunol, v.151, n.12, Dec 15, p.6742-50. 1993.

LO, D., C. R. REILLY, *et al.* Antigen-presenting cells in adoptively transferred and spontaneous autoimmune diabetes. Eur J Immunol, v.23, n.7, Jul, p.1693-8. 1993.

LOCK, C., G. HERMANS, *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. Nat Med, v.8, n.5, May, p.500-8. 2002.

LOUZADA-JUNIOR, P., M. V. FREITAS, *et al.* A majority of Brazilian patients with rheumatoid arthritis HLA-DRB1 alleles carry both the HLA-DRB1 shared epitope and anti-citrullinated peptide antibodies. Braz J Med Biol Res, v.41, n.6, Jun, p.493-9. 2008.

LOYOLA, A. J. C., L. C. M. DE CASTRO, *et al.* Infliximab no tratamento da artrite psoriásica grave. An Bras Dermatol., v.80, n.5, p.535-537. 2005.

LU, M., W. DAWICKI, *et al.* Therapeutic induction of tolerance by IL-10-differentiated dendritic cells in a mouse model of house dust mite-asthma. Allergy, v.66, n.5, May, p.612-20. 2011.

LUBBERTS, E., M. I. KOENDERS, *et al.* Treatment with a neutralizing anti-murine interleukin-17 antibody after the onset of collagen-induced arthritis reduces joint inflammation, cartilage destruction, and bone erosion. Arthritis Rheum, v.50, n.2, Feb, p.650-9. 2004.

LUTZ, M. B., N. A. KUKUTSCH, *et al.* Culture of bone marrow cells in GM-CSF plus high doses of lipopolysaccharide generates exclusively immature dendritic cells which induce alloantigen-specific CD4 T cell anergy in vitro. Eur J Immunol, v.30, n.4, Apr, p.1048-52. 2000.

LUTZ, M. B. e G. SCHULER. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? Trends Immunol, v.23, n.9, Sep, p.445-9. 2002.

MA, A., S. QI, *et al.* Adoptive transfer of CD4(+)CD25(+) regulatory cells combined with low-dose sirolimus and anti-thymocyte globulin delays acute rejection of renal allografts in Cynomolgus monkeys. Int Immunopharmacol, v.11, n.5, May, p.618-29. 2011.

MAFFIA, P., J. M. BREWER, *et al.* Inducing experimental arthritis and breaking self-tolerance to joint-specific antigens with trackable, ovalbumin-specific T cells. J Immunol, v.173, n.1, Jul 1, p.151-6. 2004.

MAHNKE, K., T. S. JOHNSON, *et al.* Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. Journal of Dermatological Science, v.46, p.159-167. 2007.

MANCINI, S., E. AMOROTTI, *et al.* Infliximab-related hepatitis: discussion of a case and review of the literature. Intern Emerg Med, v.5, n.3, Jun, p.193-200. 2010.

MAROTTE, H. e P. MIOSSEC. Prevention of bone mineral density loss in patients with rheumatoid arthritis treated with anti-TNFalpha therapy. Biologics, v.2, n.4, Dec, p.663-9. 2008.

MATSUSHITA, S., R. TAKAGI, *et al.* Qualitative evaluation of adjuvant activities and its application to Th2/17 diseases. Int Arch Allergy Immunol, v.155 Suppl 1, p.2-5. 2011.

MCINNES, I. B., B. P. LEUNG, *et al.* Cell-cell interactions in synovitis. Interactions between T lymphocytes and synovial cells. Arthritis Res, v.2, n.5, p.374-8. 2000.

MCKENZIE, B. S., R. A. KASTELEIN, *et al.* Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. TRENDS in Immunology, v.27, n.1, p.17-23. 2006.

MELLOR, A. L., P. CHANDLER, *et al.* Specific subsets of murine dendritic cells acquire potent T cell regulatory functions following CTLA4-mediated induction of indoleamine 2,3 dioxygenase. Int Immunol, v.16, n.10, Oct, p.1391-401. 2004.

MIKECZ, K., T. T. GLANT, *et al.* Proteoglycan-induced polyarthritis and spondylitis adoptively transferred to naive (nonimmunized) BALB/c mice. Arthritis Rheum, v.33, n.6, Jun, p.866-76. 1990.

MIN, S. Y., S. Y. HWANG, *et al.* Induction of IL-10-producing CD4+CD25+ T cells in animal model of collagen-induced arthritis by oral administration of type II collagen. Arthritis Res Ther, v.6, n.3, p.R213-9. 2004.

MIN, S. Y., K. S. PARK, *et al.* Antigen-induced, tolerogenic CD11c+, CD11b+ dendritic cells are abundant in Peyer's Patches during the induction of oral tolerance to type II collagen and suppress experimental collagen-induced arthritis. Arthritis & Rheumatism, v.54, n.3, p.887-898. 2006.

MODY, G. M. e M. H. CARDIEL. Challenges in the management of rheumatoid arthritis in developing countries. Best Pract Res Clin Rheumatol, v.22, n.4, Aug, p.621-41. 2008.

MONTEIRO, R. D. C. e A. C. ZANINI. Análise de custo do tratamento medicamentoso da artrite reumatóide. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.44, n.1, p.25-33. 2008.

MOSER, M., T. DE SMEDT, *et al.* Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. Eur J Immunol, v.25, n.10, Oct, p.2818-24. 1995.

MULLER, G., A. MULLER, *et al.* Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. J Invest Dermatol, v.119, n.4, Oct, p.836-41. 2002.

NUNEZ, R. Revision of the functional analysis and structural features of immortalized dendritic cell lines derived from mice lacking both type I and type II interferon receptors. Immunol Lett, v.68, n.1, May 3, p.173-86. 1999.

O'DOHERTY, U., R. M. STEINMAN, *et al.* Dendritic cells freshly isolated from human blood express CD4 and mature into typical immunostimulatory dendritic cells after culture in monocyte-conditioned medium. J Exp Med, v.178, n.3, Sep 1, p.1067-76. 1993.

OCHANDO, J. C., C. HOMMA, *et al.* Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. Nat Immunol, v.7, n.6, Jun, p.652-62. 2006.

OESTERGAARD, S., K. E. RASMUSSEN, *et al.* Evaluation of cartilage and bone degradation in a murine collagen antibody-induced arthritis model. Scand J Immunol, v.67, n.3, Mar, p.304-12. 2008.

OJEDA, G., E. PINI, *et al.* Complement regulatory protein Crry/p65 costimulation expands natural treg cells with enhanced suppressive properties in proteoglycan-induced arthritis. Arthritis Rheum, v.63, n.6, Jun, p.1562-72. 2011.

OLIVER, J. E. e A. J. SILMAN. Why are women predisposed to autoimmune rheumatic diseases? Arthritis Res Ther, v.11, n.5, p.252. 2009.

PAGE, G., S. LEBECQUE, *et al.* Anatomic localization of immature and mature dendritic cells in an ectopic lymphoid organ: correlation with selective chemokine expression in rheumatoid synovium. J Immunol, v.168, n.10, May 15, p.5333-41. 2002.

PALAFOX, D., L. LLORENTE, *et al.* The role of indoleamine 2,3 dioxygenase in the induction of immune tolerance in organ transplantation. Transplant Rev (Orlando), v.24, n.3, Jul, p.160-5. 2010.

PARK, M.-J., S. Y. MIN, *et al.* Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells are involved in the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells in Peyer's patches in an orally tolerized, collagen-induced arthritis mouse model. Arthritis Research & Therapy, v.10, p.R11. 2008.

PERON, J. P., K. YANG, *et al.* Oral tolerance reduces Th17 cells as well as the overall inflammation in the central nervous system of EAE mice. J Neuroimmunol, v.227, n.1-2, Oct 8, p.10-7. 2010.

PERRICONE, C., F. CECCARELLI, *et al.* An overview on the genetic of rheumatoid arthritis: A never-ending story. Autoimmun Rev, Apr 22. 2011.

PETERMANN, F. e T. KORN. Cytokines and effector T cell subsets causing autoimmune CNS disease. FEBS Lett, Apr 6. 2011.

PRAKKEN, B. J., S. ROORD, *et al.* Heat shock protein 60 and adjuvant arthritis: a model for T cell regulation in human arthritis. Springer Semin Immunopathol, v.25, n.1, Aug, p.47-63. 2003.

ROARK, C. L., J. D. FRENCH, *et al.* Exacerbation of collagen-induced arthritis by oligoclonal, IL-17-producing gamma/delta T cells. The Journal of Immunology, v.179, p.5576-5583. 2007.

ROJAS-VILLARRAGA, A., O. D. O. HERNANDEZ, *et al.* Risk Factors Associated with Different Stages of Atherosclerosis in Colombian Patients with Rheumatoid Arthritis. Semin Arthritis Rheum, v.38, p.71-82. 2008.

ROSA, D. J. D. F., E. A. DE PAULA, *et al.* Nodulose Acelerada na Artrite Reumatóide durante Terapia com Leflunomida. Rev Bras Reumatol, v.47, n.3, p.228-231. 2007.

RUPERTO, N., D. J. LOVELL, *et al.* Abatacept in children with juvenile idiopathic arthritis: a randomised, double-blind, placebo-controlled withdrawal trial. Lancet, v.372, n.9636, Aug 2, p.383-91. 2008.

SAAG, K. G., J. R. CERHAN, *et al.* Cigarette smoking and rheumatoid arthritis severity. Ann Rheum Dis, v.56, n.8, Aug, p.463-9. 1997.

SAKAGUCHI, N., T. TAKAHASHI, *et al.* Altered thymic T-cell selection due to a mutation of the ZAP-70 gene causes autoimmune arthritis in mice. Nature, v.426, n.6965, Nov 27, p.454-60. 2003.

SAKAGUCHI, S., T. YAMAGUCHI, *et al.* Regulatory T cells and immune tolerance. Cell, v.133, n.5, May 30, p.775-87. 2008.

SANCHEZ-GUERRERO, J., E. W. KARLSON, *et al.* Hair dye use and the risk of developing systemic lupus erythematosus. Arthritis Rheum, v.39, n.4, Apr, p.657-62. 1996.

SCHWARTZ, R. e W. DAMESHEK. Drug-induced immunological tolerance. Nature, v.183, n.4676, Jun 13, p.1682-3. 1959.

SHEIBANIE, A. F., T. KHAYRULLINA, *et al.* Prostaglandin E2 exacerbates collagen-induced arthritis in mice through the inflammatory interleukin-23/interleukin-17 axis. Arthritis & Rheumatism, v.56, n.8, p.2608-2619. 2007.

SHIOKAWA, A., K. TANABE, *et al.* IL-10 and IL-27 producing dendritic cells capable of enhancing IL-10 production of T cells are induced in oral tolerance. Immunol Lett, v.125, n.1, Jun 30, p.7-14. 2009.

SILVA, M. A., M. PORRAS, *et al.* Characterization of ileal dendritic cell distribution in a rat model fo acute and chronic inflamation. Inflamm Bowel Dis, v.12, n.6, p.457-470. 2006.

SILVA, R. G. D., M. G. B. PIPPA, *et al.* Avaliação da composição corpórea e densidade mineral óssea em mulheres portadoras de artrite reumatóide. Rev Assoc Med Bras, v.53, n.2, p.135-141. 2007.

SIMIONI, P. U., E. H. COSTA, *et al.* Aging reduces the primary humoral response and the in vitro cytokine production in mice. Braz J Med Biol Res, v.40, n.8, Aug, p.1111-20. 2007.

SIMIONI, P. U., L. G. R. FERNANDES, *et al.* Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin. Scandinavian Journal of Immunology, v.60, p.257-266. 2004.

STARR, T. K., S. C. JAMESON, *et al.* Positive and negative selection of T cells. Annu Rev Immunol, v.21, p.139-76. 2003.

STASTNY, P. Association of the B-cell alloantigen DRw4 with rheumatoid arthritis. N Engl J Med, v.298, n.16, Apr 20, p.869-71. 1978.

STEINMAN, R. M., B. GUTCHINOV, *et al.* Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. J Exp Med, v.157, n.2, Feb 1, p.613-27. 1983.

STEINMAN, R. M., D. HAWIGER, *et al.* Tolerogenic dendritic cells. Annu Rev Immunol, v.21, p.685-711. 2003.

STEINMAN, R. M. e M. C. NUSSENZWEIG. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. Proc Natl Acad Sci U S A, v.99, n.1, Jan 8, p.351-8. 2002.

STELL, D., H. MARSHALL, *et al.* CTLA4-Ig abrogates the anti-globulin response and prolongs cardiac allograft survival after anti-CD2 treatment. Transpl Immunol, v.12, n.1, Oct-Nov, p.1-7. 2003.

- STROBEL, S. e A. M. MOWAT. Immune responses to dietary antigens: oral tolerance. Immunology Today, v.19, n.4, p.173-181. 1998.
- TAKAYANAGI, H. Inflammatory bone destruction and osteoimmunology. J Periodontal Res, v.40, n.4, Aug, p.287-93. 2005.
- TAKAYANAGI, H., H. ODA, *et al.* A new mechanism of bone destruction in rheumatoid arthritis: synovial fibroblasts induce osteoclastogenesis. Biochem Biophys Res Commun, v.240, n.2, Nov 17, p.279-86. 1997.
- TANAKA-WATANABE, Y., I. MATSUMOTO, *et al.* B cells play a crucial role as antigen-presenting cells and collaborate with inflammatory cytokines in glucose-6-phosphate isomerase-induced arthritis. Clin Exp Immunol, v.155, n.2, Feb, p.285-94. 2009.
- TANG, Q., K. J. HENRIKSEN, *et al.* In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes. J Exp Med, v.199, n.11, Jun 7, p.1455-65. 2004.
- TEIXEIRA, R. C. D. A., A. G. JÚNIOR, *et al.* Marcadores de ativação endotelial e auto-anticorpos na artrite reumatóide. Rev Bras Reumatol, v.47, n.6, p.411-417. 2007.
- TODD, J. A., H. ACHA-ORBEA, *et al.* A molecular basis for MHC class II--associated autoimmunity. Science, v.240, n.4855, May 20, p.1003-9. 1988.
- TORIGOE, D. Y. e I. M. M. LAURINDO. Artrite reumatóide e doenças cardiovasculares. Rev Bras Reumatol, v.46, p.60-66. 2006.
- TRENTHAM, D. E., R. A. DYNESIUS-TRENTHAM, *et al.* Effects of oral administration of type II collagen on rheumatoid arthritis. Science, v.261, n.5129, Sep 24, p.1727-30. 1993.
- TRENTHAM, D. E., A. S. TOWNES, *et al.* Humoral and cellular sensitivity to collagen in type II collagen-induced arthritis in rats. J Clin Invest, v.61, n.1, Jan, p.89-96. 1978.
- VINEY, J. L., A. M. MOWAT, *et al.* Expanding dendritic cells in vivo enhances the induction of oral tolerance. J Immunol, v.160, n.12, Jun 15, p.5815-25. 1998.
- WAGNER, U., S. KALTENHAUSER, *et al.* Prospective analysis of the impact of HLA-DR and -DQ on joint destruction in recent-onset rheumatoid arthritis. Rheumatology (Oxford), v.42, n.4, Apr, p.553-62. 2003.
- WAKASA-MORIMOTO, C., T. TOYOSAKI-MAEDA, *et al.* Arthritis and pneumonitis produced by the same T cell clones from mice with spontaneous autoimmune arthritis. Int Immunol, v.20, n.10, Oct, p.1331-42. 2008.
- WANG, J., A. B. KAY, *et al.* Is lipstick associated with the development of systemic lupus erythematosus (SLE)? Clin Rheumatol, v.27, n.9, Sep, p.1183-7. 2008.

WEINER, H. L. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. Immunol Rev, v.182, Aug, p.207-14. 2001.

WEINER, H. L., A. FRIEDMAN, *et al.* Oral tolerance: immunologic mechanisms and treatment of animal and human organ-specific autoimmune diseases by oral administration of autoantigens. Annu Rev Immunol, v.12, p.809-37. 1994.

WILLIAMS, R. O., M. FELDMANN, *et al.* Anti-tumor necrosis factor ameliorates joint disease in murine collagen-induced arthritis. Proc Natl Acad Sci U S A, v.89, n.20, Oct 15, p.9784-8. 1992.

WOLF, A. M., D. WOLF, *et al.* Increase of regulatory T cells in the peripheral blood of cancer patients. Clin Cancer Res, v.9, n.2, Feb, p.606-12. 2003.

WOLFF, R. B. Estudo morfológico, morfométrico e histoquímico do disco epifisário da tíbia de ratas ooforectomizadas tratadas com glicosamina e condroitim sulfato. Departamento de Morfologia e Genética, UNIFESP, São Paulo, 2007. 85 p.

WORBS, T., U. BODE, *et al.* Oral tolerance originates in the intestinal immune system and relies on antigen carriage by dendritic cells. J Exp Med, v.203, n.3, Mar 20, p.519-27. 2006.

YAGO, T., Y. NANKE, *et al.* IL23 induces human osteoclastogenesis via IL17 in vitro, and anti-IL23 antibody attenuates collagen-induced arthritis in rats. Arthritis Research & Rheumatism, v.9, p.R96. 2007.

YAMADA, H., Y. NAKASHIMA, *et al.* Th1 but not Th17 cells predominate in the joints of patients with rheumatoid arthritis. Ann Rheum Dis, v.67, n.9, Sep, p.1299-304. 2008.

YING, L., Z. FU, *et al.* Cytotoxic T lymphocyte antigen 4 immunoglobulin modified dendritic cells attenuate allergic airway inflammation and hyperresponsiveness by regulating the development of T helper type 1 (Th1)/Th2 and Th2/regulatory T cell subsets in a murine model of asthma. Clin Exp Immunol, May 5. 2011.

YOSHIHARA, K., H. YAMADA, *et al.* IL-15 exacerbates collagen-induced arthritis with an enhance CD4+ T cell response to produce IL-17. European Journal of Immunology, v.37, p.2744-2752. 2007.

ZEPP, J., L. WU, *et al.* IL-17 receptor signaling and T helper 17-mediated autoimmune demyelinating disease. Trends Immunol, v.32, n.5, May, p.232-9. 2011.

ZHU, P., X. Y. LI, *et al.* Oral administration of type-II collagen peptide 250-270 suppresses specific cellular and humoral immune response in collagen-induced arthritis. Clin Immunol, v.122, n.1, Jan, p.75-84. 2007.

ANEXOS



CEEA/Unicamp

Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp

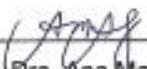
CERTIFICADO

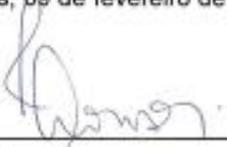
Certificamos que o Protocolo nº 1759-1, sobre "Modulação da artrite experimental induzida pela associação de colágeno tipo II e ovalbumina", sob a responsabilidade de Profa. Dra. Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro / Rodolfo Thomé, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em 09 de fevereiro de 2009.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 1759-1, entitled "Modulation of experimental arthritis induced by association of type II collagen and ovalbumin", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on February 9, 2009.

Campinas, 09 de fevereiro de 2009.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva

**DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado/tese de Doutorado intitulada "Modulação da artrite experimental induzida pela associação de colágeno tipo II e ovalbumina":

( ) não se enquadra no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

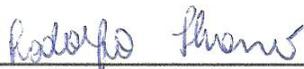
Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

( ) CIBio – Comissão Interna de Biossegurança , projeto No. \_\_\_\_\_, Instituição:

( X ) CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais , projeto No. 1759-1, Instituição: UNICAMP.

( ) CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. \_\_\_\_\_, Instituição:

*\* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.*



Aluno: Rodolfo Thomé



Orientador: Profa Dra Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(/ ) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

  
Profa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO  
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido ( ) Indeferido

Carimbo e assinatura

---

Os resultados expostos foram utilizados para a confecção do artigo científico intitulado:

**Oral tolerance to ovalbumin reduces the severity of collagen-induced arthritis in BALB/c mice**

Rodolfo Thomé, Luis Gustavo Romani Fernandes, Marcela Franco Mineiro, Patricia Ucelli Simioni, Paulo Pinto Joazeiro, Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.

Department of Genetic, Evolution and Bioagents, Institute of Biology, University of Campinas.  
CP 6109, University of Campinas – UNICAMP  
13083-970, Campinas, SP, Brazil.

Running title: Oral tolerance reduces the severity of CIA

Enviado a revista: The Journal of Immunology em 27/06/2011.