

ELOISA LEITE DOMENICI

**MODULAÇÃO DA ENCEFALOMIELEITE EXPERIMENTAL**

**AUTOIMUNE PELOS LINFÓCITOS T  $\gamma\delta$ .**

Dissertação apresentada ao Instituto de  
Biologia da Universidade Estadual de  
Campinas, para obtenção do título de  
Mestre em Ciências Biológicas na Área de  
Imunologia.

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
Eloisa Leite  
Domenici  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

14/10/97

ORIENTADOR: PROFa. Dra. LEONILDA MARIA BARBOSA DOS SANTOS

Departamento de Microbiologia e Imunologia  
Instituto de Biologia  
Universidade Estadual de Campinas  
Campinas - São Paulo  
- 1997 -

D712m

33522/BC

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Unicamp
V.	D712m
V.	Es.
TOMNO	33.522
PROB.	395/98
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	17/04/98
N.º CPD	

CM-00109413-9

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP**

**Domenici, Eloisa Leite**

D712m Modulação da encefalomielite experimental auto-imune pelos  
linfócitos T  $\gamma\delta$  / Eloisa Leite Domenici. - Campinas, SP: [s.n.], 1997.  
71f. ilus.

Orientadora: Leonilda Maria Barbosa Santos  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Biologia.

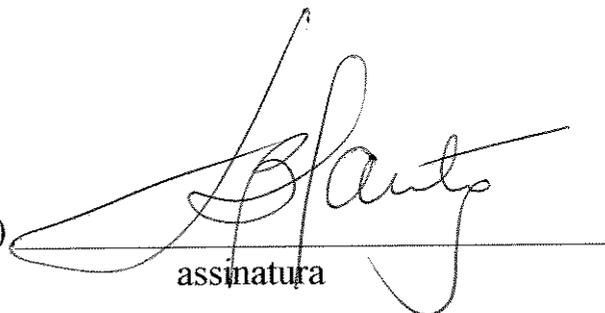
1. Linfócitos. 2. Auto-imune. I. Santos, Leonilda Maria Barbosa.  
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 14 de outubro de 1997.

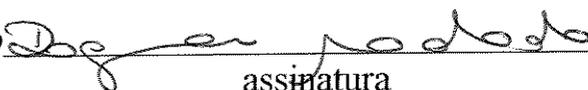
**BANCA EXAMINADORA:**

**TITULARES:**

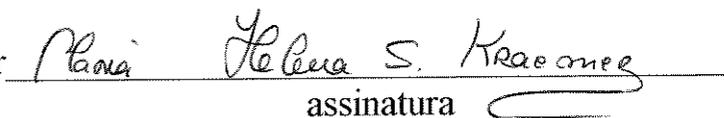
Profa. Dra. Leonilda M.B. Santos (orientador)

  
assinatura

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

  
assinatura

Profa. Dra. Maria Helena S. Kraemer

  
assinatura

**SUPLENTES:**

Prof. Dr. Irineu José Barsanti Camargo

\_\_\_\_\_  
assinatura

## **AGRADECIMIENTOS**

A Yon Berry, pela dedicada compreensão e paciência;

A Elaine e Célia, pela amizade e colaboração durante toda esta jornada;

Às colegas do laboratório: Blanca, Silvia, Anália e Patrícia, e em especial a  
Luciana, pela amizade e colaboração;

A Dona Ignês a todos os funcionários do Departamento, especialmente a Dirce,  
pela colaboração em diversos momentos;

A Patrícia Ucelli e a Profa. Wirla C. Tamashiro, pela preciosa ajuda;

À Profa. Leonilda M.B.Santos, pela orientação;

A meus pais e a Deus.

Este trabalho recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do  
Estado de São Paulo - FAPESP.

## ABREVIACOES

CFA -	Adjuvante completo de Freund
Con A -	Concanavalina A
EAE -	Encefalomielite Experimental Autoimune
IL-2 -	Interleucina 2
IL-4 -	Interleucina 4
IL-10 -	Interleucina 10
IFN- $\gamma$ -	Interferon Gama
MBP -	Proteína básica de mielina
PBS -	Solução salina tamponada
PLP -	Proteo-lipoproteína
TGF- $\beta$ -	Fator Transformador do Crescimento - $\beta$
TNF- $\alpha$ -	Fator de Necrose Tumoral - $\alpha$

## ÍNDICE

I - INTRODUÇÃO.....	1
II - OBJETIVOS.....	12
III - MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1 - Animais de Experimentação.....	13
3.2 - Neuro-antígenos.....	13
3.3 - Reagentes	
3.3.1 - Anticorpos.....	13
3.3.2 - Citocinas.....	14
3.4 - Expansão do clone celular 3A10.....	14
3.5 - Produção do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ .....	14
3.6 - Indução ativa de EAE.....	15
3.7 - Indução de tolerância oral a MBP.....	15
3.8 - Depleção <i>in vivo</i> das células T $\gamma\delta$ .....	16
3.9 - Avaliação clínica.....	16
3.10 - Obtenção de células mononucleares de baço e linfonodo.	17
3.11 - Ensaio de proliferação celular.....	17
3.12 - Dosagem de anticorpos anti-MBP no soro.....	18
3.13 - Produção de citocinas.....	19
3.14 - Determinação dos níveis de citocinas no sobrenadante de cultura.....	20
3.14.1 - Determinação dos níveis de TGF- $\beta$ .....	20
3.14.2 - Determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ .....	22
3.15 - Análise estatística.....	22
IV - RESULTADOS.....	23

4.1 - Depleção dos linfócitos T $\gamma\delta$ pelo tratamento <i>in vivo</i> com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ 3A10.....	23
4.2 - Modulação da EAE pelos linfócitos T $\gamma\delta$ .....	23
4.2.1 - Evolução clínica da EAE.....	26
4.2.2 - Concentração de anticorpos anti-MBP no soro.....	27
4.2.3 - Resposta linfoproliferativa a Con A .....	30
4.2.4 - Efeito do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ <i>in vitro</i> sobre a resposta linfoproliferativa a Concanavalina A.....	30
4.2.5 - Resposta linfoproliferativa específica para MBP....	33
4.2.6 - Níveis de citocinas no sobrenadante de cultura.....	35
4.2.6.1 - Níveis de TGF $\beta$ .....	35
4.2.6.2 - Níveis de TNF $\alpha$ .....	37
4.3 - Modulação da tolerância oral a PLP pelos linfócitos T $\gamma\delta$ ....	39
V - DISCUSSÃO.....	42
VI - CONCLUSÕES.....	50
VII - RESUMO.....	51
VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53
IX - ANEXOS.....	61

## **INTRODUÇÃO**

## I - INTRODUÇÃO

A Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE) é uma doença autoimune que apresenta muitos aspectos clínicos e histológicos em comum com a Esclerose Múltipla humana, e por isso vem sendo utilizada como modelo experimental para o estudo da mesma (ALVORD et al., 1984).

Existem diversas maneiras de se induzir a EAE, sendo as mais comuns a inoculação de antígenos presentes no Sistema Nervoso Central, tais como a mielina e seus componentes, e a inoculação de clones auto-reativos a esses antígenos (HOLOSHITZ et al, 1983). Os neuro-antígenos componentes da mielina mais utilizados para a indução de EAE são a proteína básica de mielina (MBP) e a proteolipoproteína (PLP).

Estudos mostram que nem todas as regiões das moléculas de MBP e PLP são capazes de induzir a EAE. Criou-se, então, a distinção entre *epítomos encefalitogênicos* e *epítomos não-encefalitogênicos*. Por exemplo, para o rato Lewis o fragmento 71-90 da molécula de MBP é um epítopo encefalitogênico, enquanto o fragmento 21-40 é não-encefalitogênico (MILLER et al., 1993). Os epítomos encefalitogênicos variam de espécie para espécie. Assim, uma terceira maneira de se induzir a EAE é através da inoculação de *epítomos encefalitogênicos*.

A EAE é mediada por células T e consiste na destruição de componentes do Sistema Nervoso Central, devido a uma reação inflamatória produzida por T CD4+ e macrófagos que reagem especificamente contra a mielina, sendo esta ação decorrente da reversão da tolerância aos neuro-antígenos.

Sabe-se que as células T CD4+ secretam certos tipos de citocinas durante a resposta imune, as quais exercem funções efetoras e regulatórias que influenciam a natureza e o tipo de resposta no local da inflamação. Subpopulações de células T-*helper*, identificadas no camundongo, no rato e também no homem, são definidas de acordo com o padrão de citocinas que produzem. A subpopulação Th1 está relacionada

à produção de citocinas pró-inflamatórias - IL-2 e IFN- $\gamma$  – as quais mediam reações de hipersensibilidade tardia (DTH) e induzem a síntese de imunoglobulinas da subclasse IgG2a. A sub-população Th2 secreta preferencialmente citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13 e estão associadas com aumento de imunoglobulinas dos tipos IgG1 e IgE, e da eosinofilia (DRUET et al., 1996)

As células Th0 produzem um padrão misto de citocinas e são provavelmente as precursoras das outras subpopulações. Diferenciam-se em Th1 ou Th2 dependendo da natureza do antígeno, dose, tipo de células apresentadoras de antígeno (APCs), a presença de moléculas co-estimuladoras e, o mais importante, as citocinas presentes no micro-ambiente celular. IL-12 e IFN  $\gamma$  induzem a diferenciação em Th1, enquanto que a IL-4 é essencial para a diferenciação em Th2. (KAPLAN et al., 1996; SHIMODA et al., 1996)

As sub-populações Th1 e Th2 regulam-se mutuamente; o balanço entre elas determina a natureza da resposta imune nas infecções, e fortes evidências mostram que desempenham um papel crucial em termos da suscetibilidade ou resistência ao desenvolvimento das doenças auto-imunes. (DRUET et al., 1996)

Recentemente se mostrou que a EAE pode ser transferida passivamente por clones auto-reativos do tipo Th1, mas não do tipo Th2. (NICHOLSON & KUCHROO, 1996). Mostrou-se também que a indução da EAE está relacionada com um perfil de citocinas do tipo Th1, as citocinas pró-inflamatórias - IL2, IFN $\gamma$  e TNF $\alpha$ . Estas citocinas, entre outras do tipo Th1, foram detectadas no SNC durante a fase aguda da doença. O tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais anti-TNF $\alpha$  e anti-IL12, quando administrados na fase aguda da EAE, reduzem a sua severidade. Também na Esclerose Múltipla, experimentos com indivíduos portadores da doença sugerem que a mesma possivelmente é mediada por células Th1. Sabe-se que o tratamento com IFN $\gamma$  causa sério agravamento da doença.

As células Th1 têm sido relacionadas com a patogenia de várias outras doenças auto-imunes em modelo experimental, tais como a Uveíte Experimental

Autoimune (EAU), a Diabetes Autoimune e a Artrite induzida por Colágeno do tipo II (CIA) e também em humanos (DRUET et al., 1996).

Em relação aos estímulos necessários para que células Th1 sejam geradas, sabe-se que a ativação da célula T precursora e sua posterior proliferação e diferenciação ocorrem mediante dois sinais: o acoplamento do receptor da célula T (TCR) ao antígeno específico apresentado pelas moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e um segundo sinal co-estimulatório que é antígeno inespecífico.

A presença de clones de células Th1 auto-reativos a neuroantígenos não é suficiente para gerar a doença auto-imune. Uma vez diferenciados em células Th1, os clones auto-reativos continuam na dependência dos mesmos fatores acima apresentados para produzirem ou não a EAE, dentre eles as citocinas presentes no parênquima dos tecidos do hospedeiro, e também a presença de adressinas adequadas na sua superfície celular, as quais capacitam a célula a migrar até os sítios inflamatórios dentro do SNC.

KHOURY et al., (1992) evidenciaram a redução da expressão de moléculas ICAM entre as células do endotélio perivascular de animais oralmente tolerizados com MBP, correlacionada com a regulação negativa da secreção de citocinas pro-inflamatórias no SNC. Esses achados reforçam a hipótese de que as células T auto-reativas são parte do repertório normal e são tolerantes aos antígenos periféricos graças a fatores tais como a presença de citocinas imuno-supressoras, a ausência da expressão de moléculas co-estimulatórias entre as células do parênquima e a ausência de adressinas na superfície dos endotélios . Portanto, a análise das moléculas co-estimulatórias, e também das citocinas secretadas pelas células apresentadoras de antígeno (num primeiro momento) e pelas células T (num segundo momento), é fundamental para definir a natureza da resposta imune na Esclerose Múltipla e na EAE.

Uma vez que as doenças auto-imunes são o resultado, em vias gerais, da reversão de tolerância a auto-antígenos, torna-se necessário compreender a tolerância para se compreender as doenças e também para se chegar a terapêutica das mesmas.

A tolerância imunológica pode ocorrer através de mecanismos centrais e/ou periféricos. A deleção de clones auto-reativos que ocorre no timo quando da maturação das células T é um mecanismo central de grande importância. Porém, no caso dos neuro-antígenos, sabe-se que este mecanismo não garante totalmente a tolerância, uma vez que existem clones auto-reativos aos neuro-antígenos circulando normalmente na maioria dos indivíduos sãos. Então, mecanismos que atuam periféricamente, estariam colaborando para garantir a tolerância. (VACCHIO & ASHWELL, 1994).

Dentre os mecanismos periféricos já conhecidos, como anergia, supressão ativa e apoptose, sabe-se que a ativação preferencial de um ou de outro mecanismo ocorre na dependência de fatores tais como o dosagem do antígeno e a forma como ele é apresentado. CHEN et al. (1996) mostraram que altas doses do antígeno ativam preferencialmente a anergia e a apoptose, enquanto que FRIEDMAN et al., (1994) mostraram que baixas doses do antígeno favorecem a supressão ativa.

A supressão da EAE obtida através da administração oral de MBP e PLP foi inicialmente mostrada por HIGGINS & WEINER, (1988). Desde então, muito esforço tem sido feito para compreender melhor os mecanismos envolvidos na supressão da EAE. CHEN et al., (1994) mostraram que administração oral de MBP e PLP suprime a EAE através da indução de tolerância periférica. Anteriormente havia sido mostrado que a supressão é mediada por linfócitos T CD8+, os quais transferem adotivamente a proteção contra a EAE e suprimem também a resposta auto-imune *in vitro* (HIGGINS & WEINER, 1988; LIDER et al., 1989).

Nesse modelo ou na indução de tolerância oral, está bem estabelecido que a *supressão ativa* é o principal mecanismo modulador (LIDER et al, 1989)

O estudo das citocinas secretadas durante a supressão da EAE revelou um quadro interessante e, via de regra, bastante coerente com o que se conhece sobre a

regulação da resposta imune. CHEN et al., (1994) mostraram que a maioria dos clones derivados de linfócitos estimulados na mucosa após administração oral da MBP, secretava predominantemente altos níveis de IL-4 e IL-10 e níveis variáveis de TGF- $\beta$ . Sabia-se que a transferência adotiva de células Th2 é incapaz de induzir a EAE; no entanto, evidências diretas de que células T CD4<sup>+</sup> Th 2 podem reduzir a severidade da EAE foram apresentadas recentemente. Clones de células Th2 específicos para PLP foram gerados e se mostraram efetivos na inibição da EAE; tanto os clones produtores de TGF- $\beta$  quanto os de IL-4 e IL-10 eram capazes de proteger da EAE animais imunizados ativamente, quando transferidos juntamente com a imunização ou no aparecimento dos primeiros sinais clínicos da doença.(CHEN et al., 1994). Portanto, a supressão da EAE parece estar relacionada a um perfil de citocinas do tipo Th2.

Da mesma forma que a supressão da EAE obtida pela administração oral do antígeno, a supressão observada durante a fase remissiva da doença vem fornecendo dados importantes para elucidar os mecanismos envolvidos. Diversos trabalhos mostram que a fase remissiva da doença é controlada por células do tipo Th2; constatou-se que ocorre predominância de IL-4, IL-10 e TGF $\beta$  no SNC, enquanto que a presença de mRNA para IFN $\gamma$  não foi detectada. (KENNEDY et al., 1992).

Teoricamente, a remissão pode ser antígeno-específica, antígeno-inespecífica, ou ambas (WINDHAJEN et al., 1995). A presença de citocinas do tipo Th2 no SNC de animais durante a fase de remissão da EAE tem reforçado a hipótese de que a mesma está relacionada à ação de células Th2 antígeno-específicas, as quais secretariam as citocinas anti-inflamatórias. Estas citocinas teriam um efeito inibidor antígeno-inespecífico, provocando também a diferenciação de células antígeno-específicas em clones do tipo Th2.

Camundongos "knockout" para citocinas anti-inflamatórias, tais como TGF $\beta$  ou IL-10, desenvolvem doenças auto-imunes, o que, de acordo com DRUET et al.,(1996) sugere que o bloqueio da produção de citocinas com atividade regulatória provoca a expressão de células auto-reativas que estariam normalmente controladas.

Está claro que, no modelo de EAE, o perfil de citocinas presentes no ambiente determina o tipo de resposta obtida. A indução da EAE pressupõe um determinado *ambiente* do tipo Th1, com citocinas pró-inflamatórias estimulando e amplificando a resposta auto-imune, enquanto que a sua supressão envolve um *ambiente* tipo Th2, com citocinas anti-inflamatórias freando a resposta auto-imune.

O envolvimento de uma citocina em particular - no caso o TGF $\beta$  - também está bem estabelecido. Sabe-se que a administração de TGF $\beta$  exógeno é capaz de suprimir a EAE e outras doenças auto-imunes (KHOURY et al., 1992). MILLER et al. (1992) mostram que a administração de anti-TGF $\beta$  *in vivo* exacerba a EAE e também reverte a tolerância obtida pela administração oral do antígeno, evidenciando a supressão da resposta imune *in vitro* e *in vivo* através da secreção de TGF $\beta$ . KHOURY et al., (1992) observam o aumento da expressão de TGF $\beta$  no cérebro de animais oralmente tolerizados com MBP e também de animais com EAE na fase remissiva. SANTOS et al (1994) mostraram que, as células secretoras de TGF $\beta$  são geradas ainda ao nível da mucosa do trato intestinal e já estão presentes nas Placas de Peyer 24 horas após a administração oral de MBP; esta secreção de TGF $\beta$  mostrou ser dose-dependente, diminuindo conforme o aumento da dose de MBP administrada. Estes trabalhos mostram que, tanto a supressão da EAE provocada pela administração oral de MBP quanto os mecanismos naturais de recuperação da doença (observados na sua fase remissiva), utilizam uma via imunomodulatória comum que é dependente de TGF $\beta$ .

MILLER et al. (1992) mostraram que, na indução de tolerância oral, o tolerógeno estimula os linfócitos de maneira específica, mas a supressão é mediada pela liberação de citocinas imuno-supressoras antígeno-inespecíficas, no caso o TGF $\beta$ ; estas observações levaram-no a propor um mecanismo denominado *bystander suppression*. Esses achados além de reforçarem a idéia de “ambiente” e a importância

do mesmo na determinação do tipo de resposta que é ativada, apontam mais uma vez o TGF $\beta$  como citocina chave na supressão da EAE.

KHOURY et al., (1992) evidenciam a secreção de uma citocina imunossupressora não produzida por linfócitos Th2- a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)- associada ao TGF $\beta$  em animais que receberam oralmente MBP juntamente com LPS. Estes achados sugerem que não somente as células Th2 estariam envolvidas diretamente na manutenção do ambiente tipo Th2, mas que outras populações celulares estariam possivelmente envolvidas

Resumindo, temos que as citocinas tipo Th1 estão associadas com a patogênese das doenças auto-imunes. Em contrapartida, as citocinas tipo Th2 vêm sendo associadas com a prevenção de auto-imunidade (através da indução do padrão de resposta tipo Th2), com a fase remissiva das doenças auto-imunes e também com a indução e manutenção da tolerância oral. Esses estudos mostrando que as citocinas do tipo Th1 ou Th2 definem o rumo da resposta imune não elucidam, no entanto, a fonte das citocinas detectadas, ou seja, quais são as populações celulares responsáveis pela secreção dessas citocinas.

Em relação à tolerância oral, pergunta-se que população celular, além das populações de linfócitos TCR- $\alpha\beta$  já descritos, seria responsável por tal atividade imunossupressora?

As células TCR- $\gamma\delta$  vêm sendo alvo de extensas investigações e as conclusões a respeito de sua função parecem ainda bastante controversas. Menos abundantes nos tecidos linfóides em geral, as células T- $\gamma\delta$  são particularmente abundantes nas mucosas, compondo o chamado "sistema imune das mucosas".

Em relação à ontogenia das células T- $\gamma\delta$ , sabe-se que nem todas as suas sub-populações maturam dentro do timo, sendo que as células T- $\gamma\delta$  timo-independentes são Thy1- e CD8 $\alpha\alpha$  homodímeros. As sub-populações timo-dependentes completam sua maturação dentro do timo e deixam o órgão em ondas

subseqüentes. Quando comparado com a linhagem germinativa das células T- $\alpha\beta$ , o repertório da linhagem germinativa  $\gamma$  e  $\delta$  é muito limitado, consistindo de um pequeno número de segmentos V. Este fato, aliado à baixa diversidade dos pareamentos que as cadeias  $\gamma$  e  $\delta$  fazem entre si para formar os dímeros  $\gamma\delta$ , resulta na formação de um repertório bastante limitado de células T  $\gamma\delta$  formando as chamadas “sequências canônicas”, cada uma correspondendo a uma sub-linhagem (ALLISON, 1993; HAAS et al., 1993).

Sabe-se que cada sub-linhagem migra preferencialmente para determinado tecido, em função do que se acredita que cada sub-linhagem deva apresentar distintas proteínas de adesão, as quais seriam responsáveis pelas diferenças observadas nos padrões de migração (HAAS et al., 1993). As células T  $\gamma\delta$  que migram para a epiderme, a vagina, o útero e a língua parecem requerer o timo na sua ontogenia. Enquanto isso, há evidências mostrando que as células T  $\gamma\delta$  dos órgãos linfóides e do intestino podem maturar extratimicamente, sugerindo um local de origem fora do timo para estas células.

A despeito do grande número de publicações enfocando as células T  $\gamma\delta$ , a sua função não está bem entendida. Os primeiros estudos mostraram que as células T  $\gamma\delta$  estão frequentemente associadas *in vivo* com várias lesões infecciosas, e *in vitro* com a resposta a antígenos bacterianos, incluindo a HSP 60. Em função disto passou a ser aceito genericamente que as células T  $\gamma\delta$  participem da primeira linha de defesa contra patógenos infecciosos. No entanto, mais e mais autores vêm atribuindo outras funções a estas células, dentre as quais tem se destacado a de regulação da resposta imune.

A interação das células TCR $\gamma\delta$  com outras células do sistema imune e a sua importância para a modulação da resposta vem sendo constatada por diversos autores. PTAK & ASKENASE, (1992), mostram que as células T  $\alpha\beta$  precisam da colaboração das células T  $\gamma\delta$  para transferir hipersensibilidade de contato. KAUFMANN et al.

(1993) mostram um aumento na ativação das células TCR  $\alpha\beta$  após o tratamento *in vivo* com um anticorpo monoclonal anti-TCR  $\gamma\delta$ , o GL3, sugerindo um importante ação moduladora dos linfócitos T  $\gamma\delta$  sobre os linfócitos T  $\alpha\beta$ . HÄCKER et al., 1995, destacam a ação dos linfócitos T  $\gamma\delta$  sobre células B no sentido de inibir a produção de IgG. FU et al. (1994) mostram que as células T  $\gamma\delta$  atuam na imunomodulação da inflamação, no sentido de prevenir dano excessivo ao fígado durante a resposta imune a *Listeria monocitogenes*.

Tem sido também proposto que as células T  $\gamma\delta$  participam ativamente dos processos autoimunes. YUUKI et al. (1990) mostram que as células T  $\gamma\delta$  revertem a anergia de clones de células T  $\alpha\beta$  auto-reativos em animais atímicos de idade avançada. O envolvimento das células T  $\gamma\delta$  diretamente na patogênica de doenças autoimunes tem sido sugerido, principalmente naquelas que possuem um componente inflamatório crônico, como é o caso da Artrite Reumatóide e da Esclerose Múltipla. No entanto, cabe ressaltar que, de acordo com os dados publicados até o momento, este envolvimento é restrito a certos fenótipos de células T  $\gamma\delta$  (WUCHERPFENNIG et al., 1992; PETERMAN et al., 1993; STINISSEN et al., 1995). No caso da Esclerose Múltipla, a presença de linfócitos TCR $\gamma\delta$ + ao redor dos oligodendrócitos, em pacientes com a doença ativa, foi detectada (SELMAJ et al., 1991). Porém, WUCHERPFENNIG et al. (1992) mostram que essas células são predominantemente TCRV $\delta$ 1 ou TCRV $\delta$ 2.

HÄCKER et al (1995) mostram que células T $\gamma\delta$  antígeno-específicas regulam negativamente a produção de IgG. Com essas evidências, os autores propõem um modelo de função para as células T $\gamma\delta$  as quais, enfronhadas na rede com outras células do sistema imunológico, atuam como reguladores negativos da resposta imune. Em relação à presença das células TCR $\gamma\delta$  nos sítios inflamatórios, nas doenças auto-imunes ou na resposta imune a microorganismos, os autores sugerem que a atividade dessas células não está dirigida para os microorganismos invasores ou aos

auto-antígenos, mas para células que reagem especificamente com os mesmos. Sugerem também que esta ação moduladora possivelmente se efetiva através de mecanismos tais como a produção de citocinas que regulam a atividade de outras células.

A participação das células T  $\gamma\delta$  na tolerância imunológica vem sendo também paulatinamente sugerida.

SUZUKI et al., (1995), estudando os linfócitos intraepiteliais TCR  $\gamma\delta+$  (IEL T $\gamma\delta$ ) da mucosa uterina, sugerem que estas células desempenham uma função fisiológica ao invés de defensiva durante a gravidez. Ao evidenciar que os IEL T  $\gamma\delta$  da mucosa uterina, durante a gravidez, suprimem *in vitro* a resposta de células estimuladas por antígenos paternos, os autores mostram que tais células T  $\gamma\delta$  têm um papel fundamental na manutenção da gravidez, no sentido de suprimir a resposta imune materno-antifetal na interface mãe-feto.

McMENAMIN et al., (1995), em modelo de inalação de antígenos proteicos, mostram que a tolerância obtida após a inalação de OVA (supressão da hipersensibilidade imediata) pode ser transferida para animal recipiente “naive” através de  $10^3$  células T CD8 +  $\gamma\delta+$  esplênicas. Uma hipótese importante apontada por este trabalho é a de que as células TCR  $\gamma\delta$  transferem a tolerância através do recrutamento de outras células efectoras.

CARDILLO et al., (1993), mostraram que animais infectados experimentalmente com *Trypanosoma cruzi* vão perdendo a função supressora das células T  $\gamma\delta$  com o avanço da idade, sendo esta perda de função associada ao aparecimento de autoimunidade, sugerindo uma importante participação dessas células no controle da autoimunidade.

Concluindo, a associação da tolerância oral e da remissão da EAE com a atividade de uma ou mais sub-população(ões) de células reguladoras está bem estabelecido. Paralelamente, vem sendo sugerido o envolvimento das células TCR  $\gamma\delta+$

na tolerância imunológica e na regulação da resposta imune, e também a sua participação como células supressoras nos processos auto-ímmunes.

## II - OBJETIVOS

Este trabalho visa testar a hipótese de que as células TCR  $\gamma\delta^+$  estão envolvidas, direta ou indiretamente, com a modulação da EAE.

Desta hipótese, decorrem as seguintes perguntas:

- 1) A depleção dos linfócitos T  $\gamma\delta$  provoca alterações na evolução clínica da EAE?
- 2) Ocorrem alterações na resposta linfoproliferativa a proteína básica de mielina (MBP) e a Concanavalina A, e na concentração de anticorpos anti-MBP no soro após a depleção dos linfócitos T  $\gamma\delta$ ?
- 3) Em relação a citocinas pró e anti-inflamatórias, ocorrem modificações no perfil de citocinas secretadas por células esplênicas após a depleção dos linfócitos T  $\gamma\delta$ ?

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **III - MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 - Animais de experimentação**

Camundongos da linhagem SJL/J , fêmeas de 8 semanas de idade, foram obtidos do Harlan Sprage Dawley (MA-USA) e mantidos, durante a fase de experimentação, no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, sob condições convencionais.

#### **3.2 - Neuro-antígenos**

Foram utilizados a proteolipo-proteína (PLP) e a proteína básica de mielina (MBP), ambas purificadas de cérebro bovino. A MBP foi preparada segundo o método de DEIBLER, 1972 ; os níveis proteicos das preparações de MBP foram quantificados pelo método de Lowry, com leituras a 650nm. A proteolipoproteína foi preparada de acordo com método descrito por LEES, 1978.

#### **3.3 - Reagentes**

##### **3.3.1 -Anticorpos**

Para a depleção dos linfócitos  $T\gamma\delta$  foi utilizado o anticorpo monoclonal 3A10, obtido como descrito no item 2.5. Como anticorpo controle para os experimentos, foi utilizado IgG de hamster (normal hamster IgG - NHIgG - Accurate Chemicals, Westbury, NY).

### **Anticorpos marcados**

Para o ensaio de citometria de fluxo foram utilizados os seguintes anticorpos: Anticorpo monoclonal Anti-TCR $\gamma\delta$  marcado com fluoresceína (FITC Anti-TCR $\gamma\delta$ ); Anticorpo monoclonal anti TNP marcado com fluoresceína (FITC anti-TNP).

Para a determinação dos níveis das citocinas, foram utilizados os seguintes anticorpos:

**Anticorpos purificados:** anticorpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  (purificado de ascite de células XT22.11); anticorpo policlonal anti-TNF $\alpha$  obtido em coelho ; conjugado anti-IgG de coelho-HRPO, todos gentilmente cedidos pela Profa. Wirla Tamashiro.

**Anticorpos biotinilados:** anticorpo monoclonal biotinilado anti-TNF $\alpha$  de camundongo, obtido em coelho, gentilmente cedido pela Profa. Wirla Tamashiro).

Para a quantificação dos níveis de anticorpos anti-MBP utilizou-se anti-IgG de camundongo obtido em hamster, marcado com peroxidase ( Genzyme, MA-USA).

### **3.3.2 - Citocinas**

Para o estabelecimento das curvas-padrão referentes aos níveis das citocinas estudadas, foram utilizados os seguintes antígenos recombinantes : TGF $\beta$ 1 recombinante humano, TNF $\alpha$  recombinante de camundongo, todos produzidos pela Genzyme, MA-USA .

### **3.4 - Expansão do clone celular 3A10, produtor do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$**

O clone celular 3A10, (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. José Mengel ), foi cultivado em 5 ml de meio RPMI 1640 ( Sigma Co, USA ) enriquecido com 10% de Soro Fetal Bovino ( Microbiológica, RJ ) e 4,25 mg/ml de gentamicina, em garrafas para cultura de células de 50 ml ( Costar, MA -USA ), com repiques a cada 48 horas.

### **3.5 - Produção do Anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ .**

Foram utilizados camundongos imunodeficientes (“nude mice”) de diversas linhagens, machos e fêmeas com idade de 8 a 12 semanas, obtidos junto ao Centro de Bioterismo da Unicamp. Os animais foram inoculados com  $1 \times 10^6$  células/ml de meio RPMI (Sigma Co.) por via intraperitoneal. Após 10 a 15 dias, recolheu-se o líquido ascítico e procedeu-se a precipitação dos anticorpos com solução saturada de sulfato de amônio. As amostras do precipitado foram diluídas 10 vezes e dialisadas em água destilada e tampão PBS até que o excesso de sal fosse completamente removido. Após a diálise procedeu-se a filtração da amostra em membrana Millipore e a dosagem das proteínas através do método de Lowry, com leituras em espectrofotômetro, a 650 nm. As amostras de concentração conhecida foram separadas em alíquotas de 1ml e estocadas em freezer a  $-80^{\circ}$  C ou liofilizadas e estocadas a  $-80^{\circ}$  C.

### **3.6 -Indução ativa de EAE**

Os animais foram imunizados com uma preparação contendo 100  $\mu$ g de PLP em 0,1 ml de PBS, emulsionados com igual volume de adjuvante completo de Freund (CFA-Sigma Co., USA ). Cada animal recebeu duas doses em um intervalo de sete dias ( dia 0 e dia 7 ), por via sub-cutânea, na região do flanco. Para os experimentos que visavam

apenas o estudo dos mecanismos de autoimunidade, devido aos inconvenientes de se utilizar o PLP nos experimentos *in vitro* (baixa solubilidade, baixa aderência em microplacas para ELISA) a imunização foi realizada utilizando-se a MBP como neuroantígeno. Para tais experimentos os animais foram inoculados com uma dose única de 400µg / 1 ml de MBP em PBS emulsionados em 0,1ml de CFA.

### **3.7 - Indução de Tolerância Oral a MBP**

A tolerância a MBP foi induzida de acordo com protocolos previamente descritos (MILLER et al.,1991; MILLER et al., 1991; MILLER et al., 1993; SANTOS et al., 1994 ). Utilizou-se um esquema de múltiplas doses do antígeno. Foram administradas 5 doses de 250µg de PLP em 0,25 ml de PBS. As doses foram administradas em dias alternados, por entubação gástrica, utilizando-se o método de *cavage*, com o auxílio de uma agulha apropriada para estes fins. Guardou-se um período de 24 horas da última dose oral do neuroantígeno para a imunização.

### **3.8 - Depleção *in vivo* das células TCRγδ**

A depleção *in vivo* das células T TCRγδ foi realizada de acordo com método previamente descrito por CARDILLO et al., 1993. Cada animal recebeu três doses contendo 0,5 mg do anticorpo monoclonal anti-TCRγδ ( preparado como descrito anteriormente ) em 0,25 ml de PBS, administradas por via intra-peritoneal, sendo a última dose administrada 24 horas antes de quaisquer outras manipulações. Doses adicionais idênticas às iniciais foram administradas em intervalos regulares de 7 dias, com o objetivo de evitar a repopulação celular. Dados da literatura sugerem que as células TCRγδ repopulam dentro de 20 dias após o tratamento com anticorpo monoclonal anti-TCRγδ (KAUFMANN et al., 1993). Desta forma, nos experimentos

de indução de E.A.E., onde o tempo total do experimento era igual a 40 dias, cada animal recebeu um total adicional de 5 doses, enquanto que no experimento de indução de tolerância oral, onde o tempo total de duração do experimento era igual a 50 dias, foram administradas 7 doses adicionais do anticorpo. Os grupos controle receberam igual quantidade de IgG de hamster (normal hamster IgG - NHIgG - Accurate Chemicals, Westbury, NY).

### **3.9 - Avaliação Clínica**

Os camundongos foram observados diariamente, a partir do nono dia após a imunização, para os sinais clínicos da E.A.E. A avaliação foi feita atribuindo-se graus de 0 a 5 de acordo com os seguintes critérios: grau 0 = não doente; grau 1 = perda do tônus da cauda; grau 2 = fraqueza parcial dos membros posteriores e dificuldade de voltar a posição inicial quando colocados em decúbito dorsal; grau 3 = paralisia severa dos membros posteriores; grau 4 = paralisia severa dos membros anteriores e posteriores; grau 5 = morte. As observações seguiram-se por 35 dias após a imunização.

### **3.10 - Obtenção de células mononucleares de baço e linfonodo**

Baço e linfonodos axilares foram removidos assepticamente e colocados em placa de Petri contendo meio RPMI (Sigma Co., USA), e suspensões simples de células foram preparadas usando uma malha de inox. No caso de células esplênicas, após a primeira centrifugação tratou-se o botão celular com solução de cloreto de amônio a 0,82% para lise das hemáceas. As células foram lavadas por três vezes com solução balanceada de Hanks e ressuspendidas em meio RPMI 1640 enriquecido com Soro Fetal Bovino a 5% (Microbiológica-RJ), 4,25mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina

a 0,2M e 2-Mercaptoetanol a 1: 5000. Para determinação da viabilidade celular, usou-se o método de exclusão com Azul de Trypan.

### **3.11 - Ensaio de proliferação celular**

As suspensões celulares obtidas de linfonodo ou baço como descrito no item anterior, foram ajustadas para a concentração de  $4 \times 10^5$  células /poço ( para o caso de estimulação com MBP ) ou para  $2 \times 10^5$  células/poço ( para o caso de estimulação com Concanavalina A ) e colocadas em microplaca para cultura de células de 96 poços ( Costar, USA ). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 ( Sigma,USA ) enriquecido com Soro Fetal Bovino a 5% (Microbiológica-RJ) e 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina 0,2M e 2-Mercaptoetanol a 1: 5000. Os ensaios foram realizados em triplicata. Avaliou-se a transformação blástica dos linfócitos estimulados por várias concentrações de MBP, sendo que as concentrações ótimas variaram de 2,5 µg/ml a 10 µg/ml. Para a Con A usaram-se as concentrações de 0,625 mg/ml a 2,5 µg/ml. As células foram incubadas em estufa com sistema de CO<sub>2</sub> a uma tensão constante de 5% e temperatura de 37° C; os tempos de incubação foram de 48 horas para a Con A e 144 horas para a MBP. Aproximadamente 18 horas antes do término da incubação, cada poço recebeu 1 µCi de Timidina Triaçada (New England Nuclear- MA, USA). Após este período o excesso do material radioativo foi retirado lavando-se as células em um coletor (Cell Harvester - modelo 200 A - Cambridge Technology Inc., USA) e as células foram recuperadas em papel filtro de fibra de vidro ( Cambridge Technology Inc., USA ) e colocadas em tubos padronizados na presença de 2 ml de líquido de cintilação ( 3,0 g/l de PPO em Toluol ). O conteúdo radioativo foi determinado em Cintilador Beta (Beckman LS 6000 Series Scintillation System). Os resultados estão expressos em contagens por minuto (CPM), sendo considerada a média das triplicatas.

Para o experimento sobre o efeito do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  *in vitro*, as células de baço foram colocadas em placas de 96 poços (2x10<sup>5</sup> células/poço) na presença de 2,5  $\mu\text{g/ml}$  de ConA e de diferentes concentrações do anticorpo (2 a 36 $\mu\text{g}/200\mu\text{l}$ ). Após um período de incubação de 30 horas nas mesmas condições utilizadas para os outros ensaios de proliferação, procedeu-se a incubação com Timidina tritiada ( 1  $\mu\text{Ci/poço}$  ), e a lavagem das células, seguida de embebição com líquido de cintilação e contagem do material radioativo, como descrito.

### **3.12 - Dosagem de Anticorpos anti-MBP**

Foi usada a técnica de ELISA, previamente empregada para dosagem de anticorpos anti-MBP em trabalhos anteriores (LIDER et al, 1989). Microplacas para ensaios enzimáticos (Costar, MA-USA) foram incubadas com 25  $\mu\text{g/ml}$  de MBP (100  $\mu\text{l/poço}$ ) por um período de 18 horas e em seguidas lavadas com PBS-Tween 20 a 0,05% por três vezes. Como solução bloqueio utilizou-se leite-em-pó desnatado (caseína) a 5% em PBS (200  $\mu\text{l/poço}$ ), incubando-se por 2 horas e lavando com PBS Tween20. Foram adicionadas as amostras de soro (100  $\mu\text{l/poço}$ ), sendo que para cada grupo testado utilizou-se um “pool” de soros, em diluições de 1/100 até 1/1600, sendo cada uma delas testadas em duplicata. Após uma hora de incubação a temperatura ambiente, lavou-se novamente a placa com PBS-Tween e adicionou-se o anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com peroxidase (Sigma,USA), diluído a 1:40000 em leite a 2% em PBS ( 100  $\mu\text{l}$  / poço ) e incubou-se por uma hora. Após nova lavagem da placa, adicionou-se o substrato da enzima ( 10 ml de tampão citrato - pH 5,6 + 10  $\mu\text{l}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 10 mg de OPD) (OPD, Sigma Co.,USA) e incubou-se a placa por 20 minutos, após o que se adicionou a solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 4N, 20 ml / poço, com o objetivo de interromper o desenvolvimento de cor. As densidades ópticas das amostras foram determinadas em leitor Multiskan Bichromatic ( Labsystems ), utilizando-se um filtro

de 492 nm. Os resultados estão expressos em densidade ótica, sendo consideradas as médias das duplicatas.

### **3.13 - Produção de citocinas**

Para a produção de TGF $\beta$ , suspensões de células esplênicas dos animais, obtidas de acordo com o item 10, foram ajustadas para a concentração de  $2 \times 10^6$  células/ml e cultivadas em placas para cultura de células de 24 poços (Costar, USA), em meio RPMI 1640 (Sigma Co., USA) enriquecido com 5% de soro bovino fetal (Microbiológica, RJ) e 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina 0,2M e 2-ME 1:5000. Cada poço contendo 1 ml da suspensão celular recebeu ainda 2,5  $\mu$ g de Con A ou 25  $\mu$ g/ml de MBP, ou somente meio de cultura. Após 72 horas para a produção de TGF $\beta$ , retirou-se os sobrenadantes e centrifugou-se os mesmos a 1200 rpm por 10 minutos.

Para produção de TNF $\alpha$  foi utilizada uma suspensão celular de  $3 \times 10^6$  células/ml. Depois de colocadas na microplaca de cultura, as células foram incubadas em estufa com sistema de CO<sub>2</sub> a 37°C por duas horas, após o que retirou-se cuidadosamente o meio de cultura e acrescentou-se igual volume de meio contendo LPS na concentração de 5  $\mu$ g/ml. Este procedimento visa obter uma cultura predominantemente de macrófagos. Após 12 horas de incubação em estufa com sistema de CO<sub>2</sub> a 37°C, coletou-se o sobrenadante centrifugou-se a 1200 rpm por 10 minutos.

Os sobrenadantes foram estocados em freezer a -80°C, no caso de TGF $\beta$  ou utilizados a fresco, no caso do TNF $\alpha$

### **3.14 - Determinação dos níveis de citocinas**

#### **3.14.1 - Determinação dos níveis de TGF $\beta$**

Os níveis de TGF $\beta$  no sobrenadante de cultura foram determinados através de ensaio biológico. Células da linhagem CCL-64 foram colocadas em meio de cultura a uma concentração de  $1 \times 10^6$  células/ml. Colocou-se 200 $\mu$ l da suspensão por poço em uma microplaca para cultura de células de 96 poços, a qual permaneceu *overnight* em estufa com sistema de CO<sub>2</sub> a 37° C. Após isso, retirou-se cuidadosamente 100 $\mu$ l de cada poço e adicionou-se igual volume de cada amostra de sobrenadante de cultura. Para a determinação da curva-padrão de TGF $\beta$ , utilizou-se o TGF $\beta$ 1 recombinante humano, nas concentrações de 10ng/ml a 0,005ng/ml. Incubou-se a microplaca por 24 horas em estufa com sistema de CO<sub>2</sub> a 37° C. Após isso, adicionou-se a cada poço Timidina tritiada ( 1  $\mu$ Ci/poço ), incubando-se a placa *overnight*. Para a lavagem das células, adicionou-se 200 $\mu$ l/poço de tripsina, com o objetivo romper a aderência das células; o excesso do material radioativo foi retirado lavando-se as células em um coletor (Cell Harvester - modelo 200 A - Cambridge Technology Inc., USA) e as células foram recuperadas em papel filtro de fibra de vidro ( Cambridge Technology Inc., USA ) e colocadas em tubos padronizados na presença de 2 ml de líquido de cintilação (3,0 g/l de PPO em Toluol ). O conteúdo radioativo foi determinado em Cintilador Beta (Beckman LS 6000 Series Scintillation System).

Para determinar os níveis de TGF $\beta$  presentes nas amostras, comparou-se a contagem de trício incorporado nas mesmas com as obtidas na curva-padrão. A curva padrão obtida encontra-se no Anexo.

### **3.14.2 - Determinação dos níveis de TNF $\alpha$**

Placas de poliestireno (Costar, USA) foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-TNF $\alpha$  (purificado de ascite de células XT22.11) a 10  $\mu$ g/ml em tampão bicarbonato de sódio 0,05M pH9,2 (50  $\mu$ l/poço) e incubadas durante 1 hora a 37° C, em câmara úmida, e a seguir a 4° C *overnight*. Como solução bloqueio utilizou-se leite-em-pó desnatado (Molico/Nestlé) a 5% em PBS pH7,2 (100  $\mu$ l/poço) ,

incubando-se por 1 hora a 37° C em câmara úmida. Lavou-se a placa com PBS-Tween 20 a 0,05%, por três vezes. Foram adicionadas as amostras de sobrenadante (50 µl/poço). Para determinação da curva-padrão utilizou-se TNF $\alpha$  recombinante nas concentrações de 50 ng/ml, 25 ng/ml, 12,5 ng/ml, 6,25 ng/ml, 3,125 ng/ml, 1,78125 ng/ml e 0 ng/ml em PBS pH 7,2 contendo Molico a 2% (50 µl/poço), com incubação *overnight* em câmara úmida a 37° C.

Após lavagem da placa com PBS-Tween 20, adicionou-se o soro anti-TNF $\alpha$  (soro policlonal anti-TNF $\alpha$  produzido em coelho diluído a 1:200 em PBS-Molico 2% (50 µl/poço), sendo a placa incubada por 1 hora a 37° C, em câmara úmida e em seguida lavada com PBS-Tween. Adicionou-se o conjugado anti-IgG de coelho-HRPO (gentilmente cedido pela Profa. Wirla Tamashiro), diluído 1:2000 em PBS-Mo 2% (50 µl/poço), com incubação por 1 hora a 37° C, em câmara úmida e lavagem com PBS-Tween. Para revelação da reação, utilizou-se 50 µl de substrato cromogênio (0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 2 mg de OPD-Sigma por ml de tampão citrato/fosfato de sódio 0,05M, pH5,0), incubando-se a placa por 30 minutos, no escuro e a temperatura ambiente. Para interromper o desenvolvimento de cor, foi adicionado 25 µl de ácido sulfúrico 4N em cada poço. Procedeu-se a leitura colorimétrica a 492nm, em leitor de ELISA (MULTISKAN, Flow Laboratories, Inc, USA).

### **3.15 - Análise Estatística**

As amostras paramétricas foram analisadas pelo método t de Student. As amostras não paramétricas foram analisadas pelo método de Wilcoxon.

**RESULTADOS**

#### 4.1 DEPLEÇÃO DOS LINFÓCITOS TCR $\gamma\delta$ PELO TRATAMENTO *IN VIVO* COM O ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-LINFÓCITOS TCR $\gamma\delta$ (3A10).

Com o objetivo de evidenciar a modulação da subpopulação de linfócitos T  $\gamma\delta$  pelo anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  3A10, células esplênicas de animais tratados *in vivo* com anti-TCR $\gamma\delta$  ou PBS foram submetidas a coloração *in vitro* com anticorpos anti-TCR  $\gamma\delta$  marcados com fluoresceína e posteriormente analisadas por citometria de fluxo.

Para os animais tratados com PBS a população de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> alcançou um valor de 5,2%, como mostra a figura 1A. Os animais que receberam *in vivo* o anticorpo monoclonal 3A10 apresentaram uma população de 0,7% de células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>, como mostra a figura 1B. Houve, portanto, uma redução de 86,4% no percentual de células TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup>.

A mesma análise foi feita para células esplênicas de animais tratados *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  e em seguida imunizados com MBP/CFA. (para indução da EAE) e mostrou um percentual de 1,0% da população de células T TCR $\gamma\delta$ <sup>+</sup> (figura 1C).

Estes resultados confirmam que o tratamento *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  3A10 modula a subpopulação de células T  $\gamma\delta$ . A figura 1C mostra que essa modulação persiste após o tratamento para indução da EAE.

Em conjunto, os resultados mostram que o tratamento *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  é um artifício adequado aos propósitos deste estudo, já que a depleção das células T  $\gamma\delta$  é uma etapa fundamental para atingirmos os objetivos a que nos propusemos.

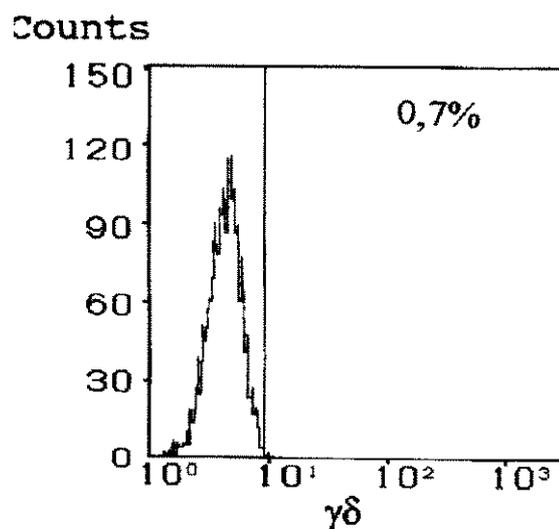
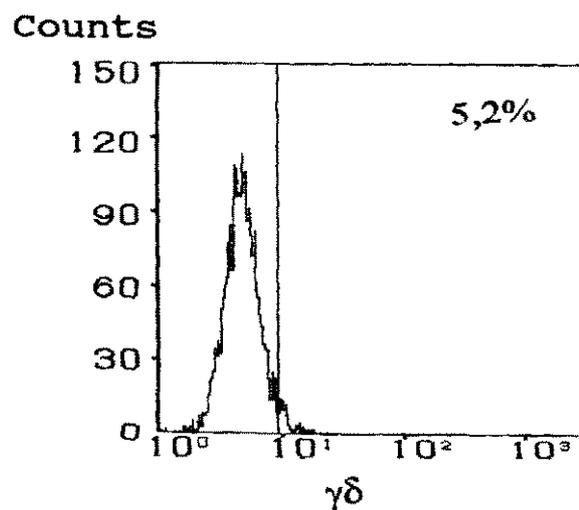


Figura 1 - Citometria de fluxo de células esplênicas submetidas ao tratamento com anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  marcado com fluoresceína. Em cima (fig1A) animais tratados *in vivo* com PBS; em baixo (fig1B), animais tratados *in vivo* com anticorpo monoclonal 3A10.

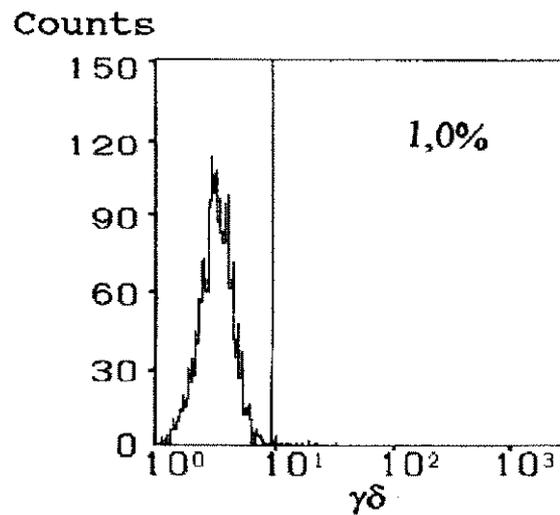


Figura 1C - Citometria de fluxo de células esplênicas submetidas ao tratamento com anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  marcado com fluoresceína. Animais tratados *in vivo* com anticorpo monoclonal 3A10 e posteriormente imunizados com MBP/CFA.

## 4.2 MODULAÇÃO DA EAE PELOS LINFÓCITOS T $\gamma\delta$

### 4.2.1 Evolução Clínica da EAE

Com o objetivo de estudar o papel das células T  $\gamma\delta$  na indução de EAE, camundongos tratados *in vivo* com anticorpo monoclonal anti-TCR  $\gamma\delta$  ou PBS foram em seguida imunizados com MBP/CFA. A evolução clínica da EAE foi feita de acordo com critérios utilizados em trabalhos anteriores (AL-SABBAGH et al, 1994; SANTOS et al, 1994) (ver materiais e métodos, ítem.2.9).

Para a avaliação dos resultados, utilizamos os valores de média diária do score clínico do grupo (S.C.M.= Score Clínico Médio) e média do número de dias até o aparecimento da doença (M.D.A.D.).

A figura 2 mostra a evolução clínica da EAE para os dois grupos. Os animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-TCR  $\gamma\delta$  anteriormente a imunização com MBP/CFA apresentaram uma doença mais severa em relação aos animais tratados com PBS+MBP/CFA. Além do aumento da severidade da doença houve também antecipação no aparecimento dos primeiros sinais clínicos da mesma (tabela1).

A incidência da E.A.E. também foi superior para o grupo tratado ( 100% contra 60% do grupo controle) (tabela 1).

Os valores de Score clínico médio entre os dois grupos são significativamente diferentes ( $p=0,0247$ ) (ver tabela no ANEXO1).

Todos esses dados mostram uma exacerbação da EAE quando esta é induzida após a depleção dos linfócitos T  $\gamma\delta$ .

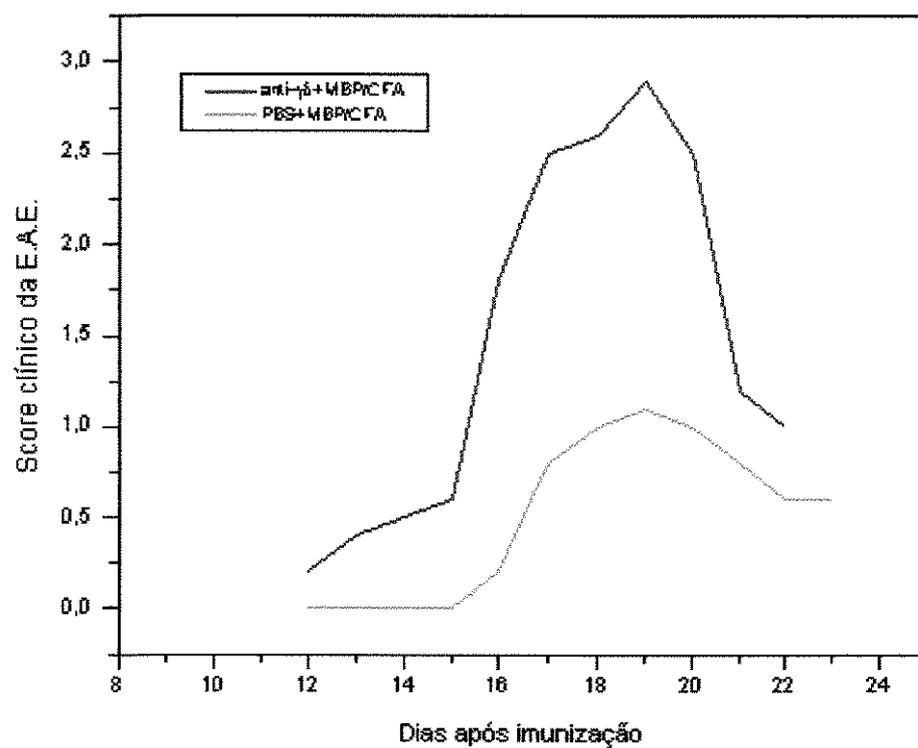


Figura 2 - Evolução clínica da EAE para animais tratados com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$  ou PBS previamente à imunização com MBP/CFA. Os dados representam a média diária dos scores clínicos entre os indivíduos de cada grupo (S.C.M.).

Tabela I - Efeito do tratamento *in vivo* com anti-TCR $\gamma/\delta$  na modulação da E.A.E. Os animais foram imunizados com 400  $\mu\text{g}$  de MBP e 400  $\mu\text{g}$  de M.T. e 0.2ml de IFA, no dia 0 e dia 7. O tratamento com anti  $\gamma/\delta$  *in vivo* foi feito nos dias -5, -3 e -1., com doses adicionais nos dias +10 e + 20.

GRUPO	PBS i.p.	Anti- $\gamma/\delta$ i.p.	MBP s.c.	M.D.A.D.*	% EAE
A	0.5 ml	-----	d 0 / d 7	18.0 $\pm$ 1.5	60
B	-----	500 $\mu\text{g}$	d 0 / d 7	15.2 $\pm$ 0.8	100

\*MDAD = Média do número de dias até o aparecimento da doença.

#### 4.2.2 Concentração de anticorpos anti-MBP no soro

A concentração de anticorpos específicos anti-MBP no soro dos animais tratados *in vivo* com o anti-TCR  $\gamma\delta$  previamente a imunização com MBP/CFA se mostrou significativamente superior em relação aos animais tratados com IgG de hamster ou PBS (figura 3). As diferenças observadas são significativas ( $p=0,01052$ ). Os resultados dos experimentos encontram-se no ANEXO 2.

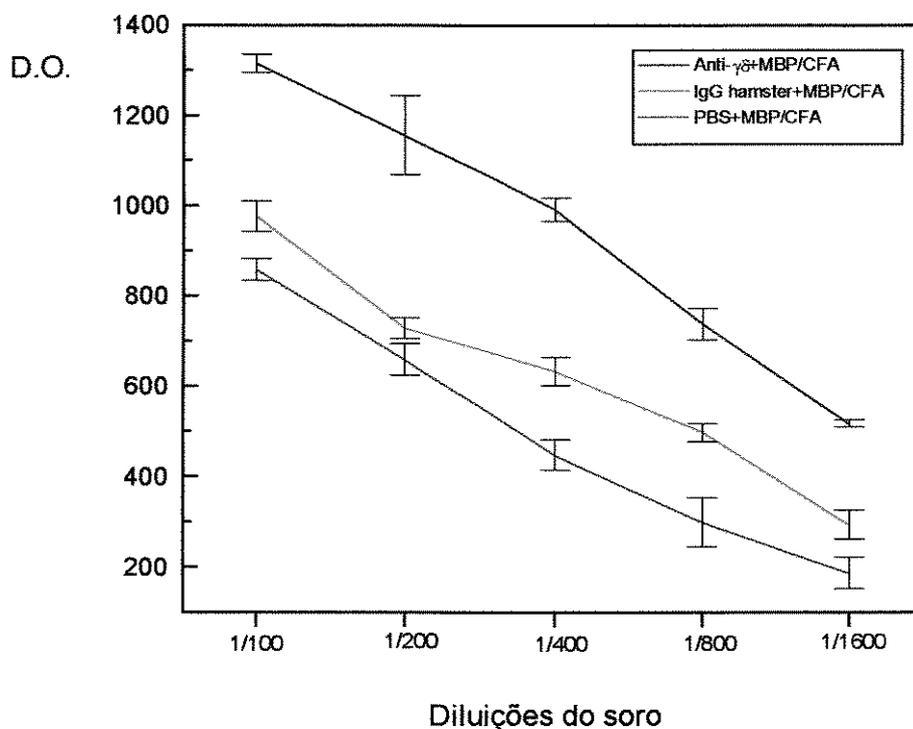


Figura 3 - Anticorpos anti-MBP (IgG totais) no soro de animais tratados *in vivo* com o mAb anti-TCR  $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA. Os resultados, expressos em densidade ótica (D.O.), representam médias e desvio padrão de vários experimentos.

### **4.2.3 Resposta Linfoproliferativa a ConA**

Com o objetivo de avaliar a resposta celular inespecífica, células esplênicas dos animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-TCR  $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA foram estimuladas *in vitro* com 2,5  $\mu\text{g/ml}$  ou 1,25  $\mu\text{g/ml}$  de ConA. A resposta linfoproliferativa a Con A dos animais tratados com mAB anti-TCR $\gamma\delta$  foi significativamente superior aos outros dois grupos, como mostra a figura 4. As diferenças são significativas ( $p=0,0068$ ). Os resultados dos experimentos encontram-se no ANEXO 3A.

### **4.2.4 Efeito do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ *in vitro* sobre a resposta linfoproliferativa a Concanavalina A.**

Com o objetivo de obter mais informações sobre a ação dos linfócitos TCR $\gamma\delta$ , células esplênicas de animais não submetidos a tratamento *in vivo* foram estimuladas *in vitro* com Concanavalina A (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) na presença de diferentes concentrações do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  (técnica do anticorpo imobilizado na microplaca de cultura - ver materiais e métodos ítem 2.11)

A figura 5 mostra a média de vários experimentos. A resposta linfoproliferativa a ConA na presença do anti-TCR $\gamma\delta$  mostrou-se superior em relação à situação em que o anticorpo estava ausente. Esse efeito intensificou-se conforme o aumento da concentração do anticorpo, atingindo um pico na concentração de 24  $\mu\text{g/ml}$ . Os resultados encontram-se no ANEXO 3B.

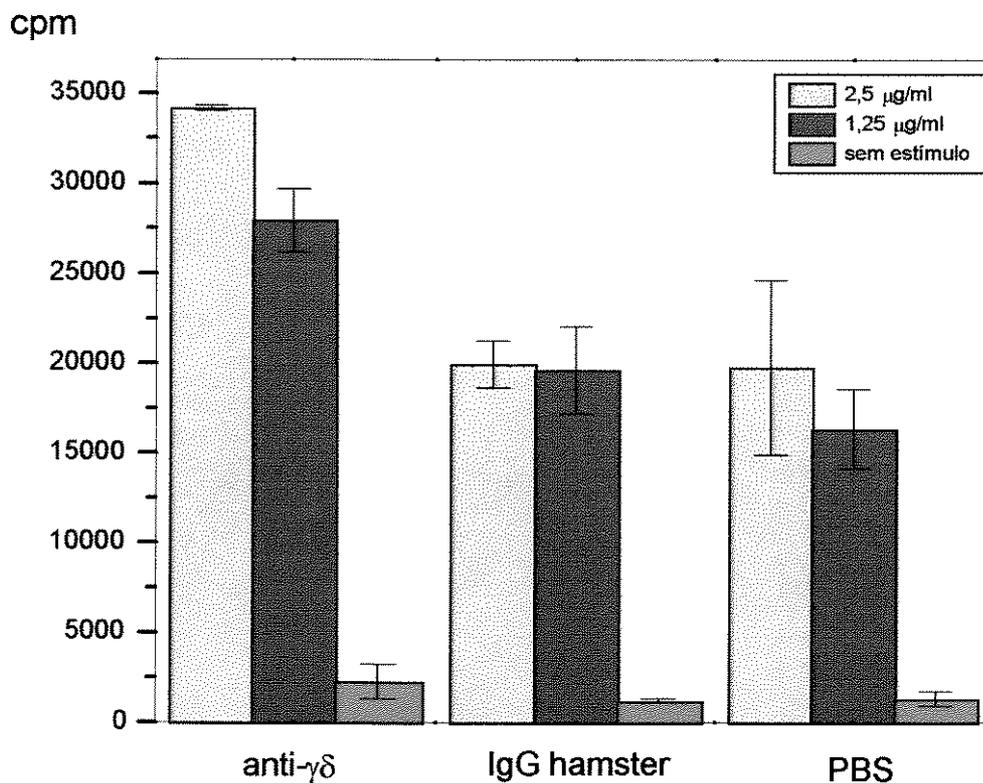


Figura 4 - Resposta linfoproliferativa a Con A em células esplênicas de animais tratados in vivo com mAb- anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou com PBS, previamente a imunização com MBP/CFA. Os resultados representam média e desvio padrão de uma série de experimentos e estão expressos em contagens por minuto (cpm).

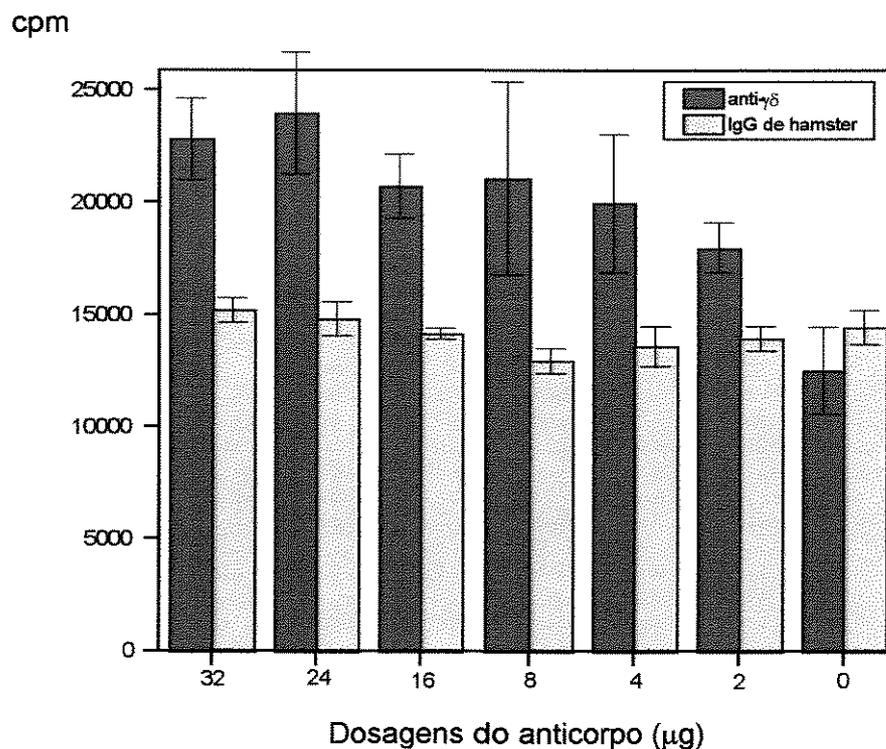


Figura 5 - Efeito de diferentes concentrações do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  *in vitro* na resposta proliferativa a Con A em células esplênicas de animais não submetidos a tratamento *in vivo*. (técnica do anticorpo imobilizado na microplaca de cultura - ver materiais e métodos). Células esplênicas foram estimuladas *in vitro* com 2,5 $\mu$ g/ml de Con A.

#### 4.2.5 Resposta Linfoproliferativa Específica para MBP.

Com o objetivo de avaliar a resposta proliferativa específica para MBP para os animais tratados *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ , células de linfonodo foram cultivadas com estímulo *in vitro* de diferentes dosagens de MBP.

A resposta linfoproliferativa específica para MBP para os animais tratados com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  foi superior em relação aos animais tratados com PBS ou com IgG de hamster, como mostra a figura 6. As diferenças são significativas ( $p=0,00212$ ). Os resultados encontram-se no ANEXO 4.

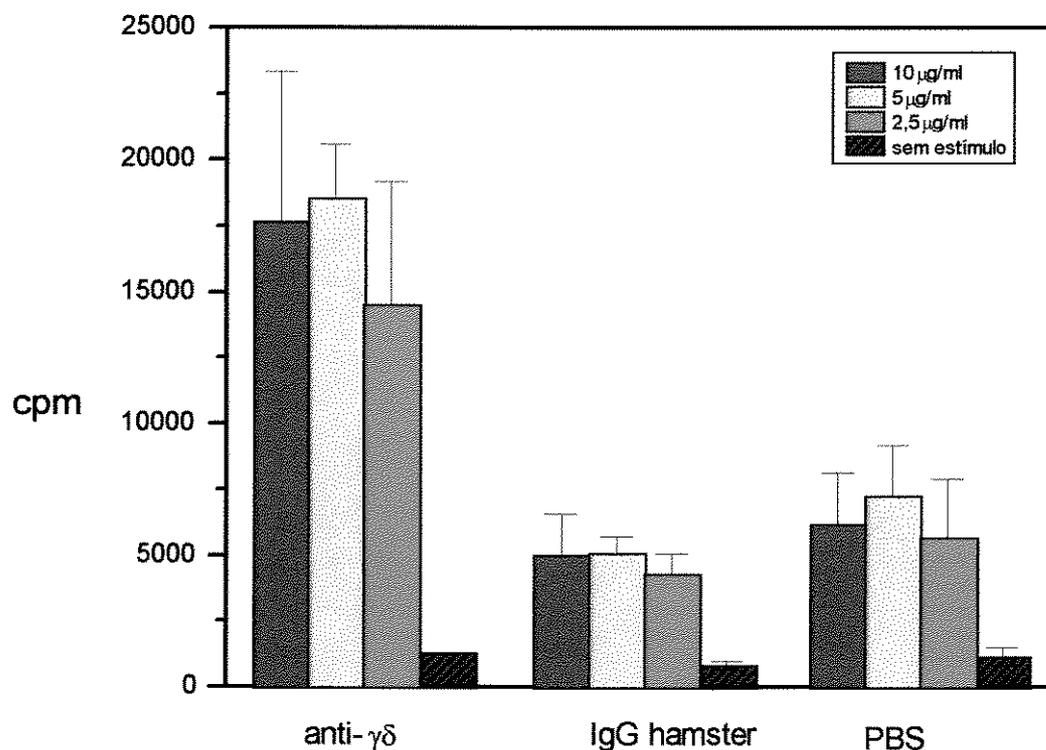


Figura 6 - Resposta linfoproliferativa específica para MBP: células de linfonodo de animais tratados *in vivo* com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA foram cultivadas em presença de diferentes dosagens de MBP. Os resultados representam a média e desvio padrão de uma série de experimentos e estão expressos em contagens por minuto (cpm).

## **4.2.6 Presença de TGF $\beta$ e TNF $\alpha$ do sobrenadante de cultura.**

### **4.2.6.1 Níveis de TGF $\beta$**

Células esplênicas de animais tratados *in vivo* com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA, foram cultivadas na presença de ConA (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) ou MBP (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Amostras do sobrenadante de cultura foram adicionadas a uma cultura de células da linhagem CCL-64, sensível a TGF $\beta$ . Como padrão utilizou-se uma curva de crescimento das células CCL-64 na presença de diferentes concentrações de TGF $\beta$  recombinante.

A quantidade de TGF $\beta$  detectada no sobrenadante de cultura foi inferior para os animais tratados *in vivo* com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , em comparação com os animais tratados com PBS ou IgG de hamster, como mostra a figura 7. Os resultados representam a média de uma série de experimentos e estão expressos em pg/ml. As diferenças são significativas ( $p=0,02045$ ). Os dados experimentais encontram-se no ANEXO 5.

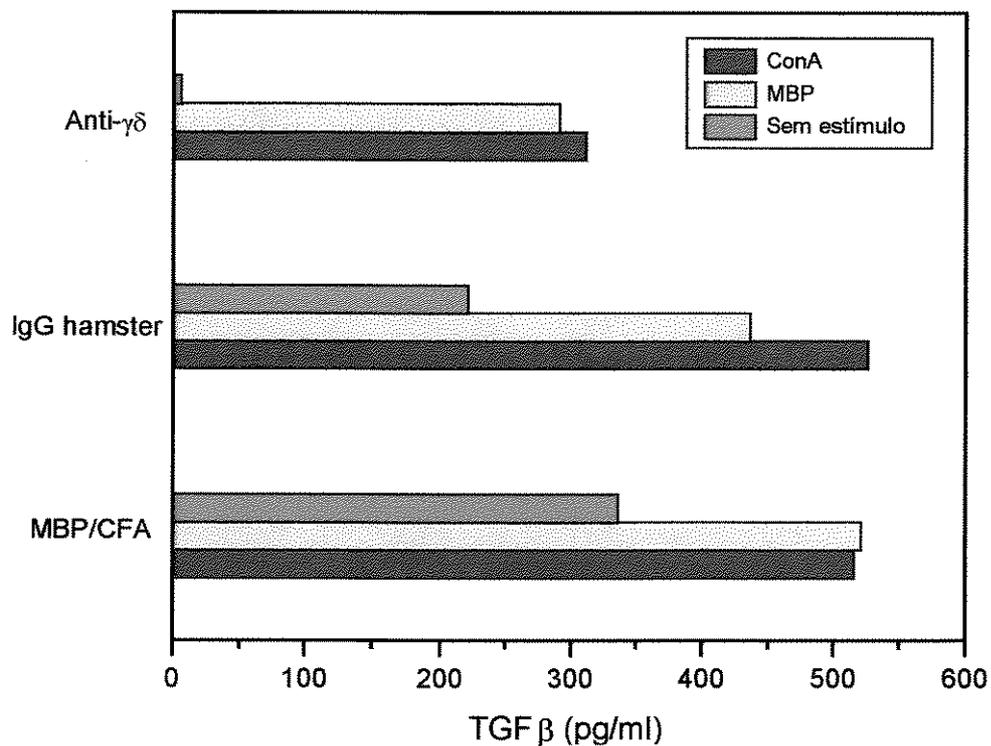


Figura 7- Concentrações de TGFβ no sobrenadante de cultura. Células esplênicas de animais tratados in vivo com o m Ab anti-TCRγδ, IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA, foram cultivadas na presença de Con A (2,5 μg/ml) ou MBP (10 μg/ml). Os resultados estão expressos em pg/ml e representam a média de uma série de experimentos.

#### 4.2.5.2 Níveis de TNF $\alpha$

Células esplênicas de animais tratados *in vivo* com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA, foram cultivadas na presença de LPS (5,0  $\mu\text{g/ml}$ ) para a produção de TNF $\alpha$ . Amostras do sobrenadante de cultura foram submetidas a um teste de ELISA de captura para detecção de TNF $\alpha$ . Os resultados dos experimentos estão colocados no ANEXO 6

Foi detectada uma quantidade maior de TNF $\alpha$  no sobrenadante de cultura dos animais tratados *in vivo* com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , em comparação com os animais tratados com PBS ou IgG de hamster, como mostra a figura 8. As diferenças são significativas ( $p=0,04722$ ).

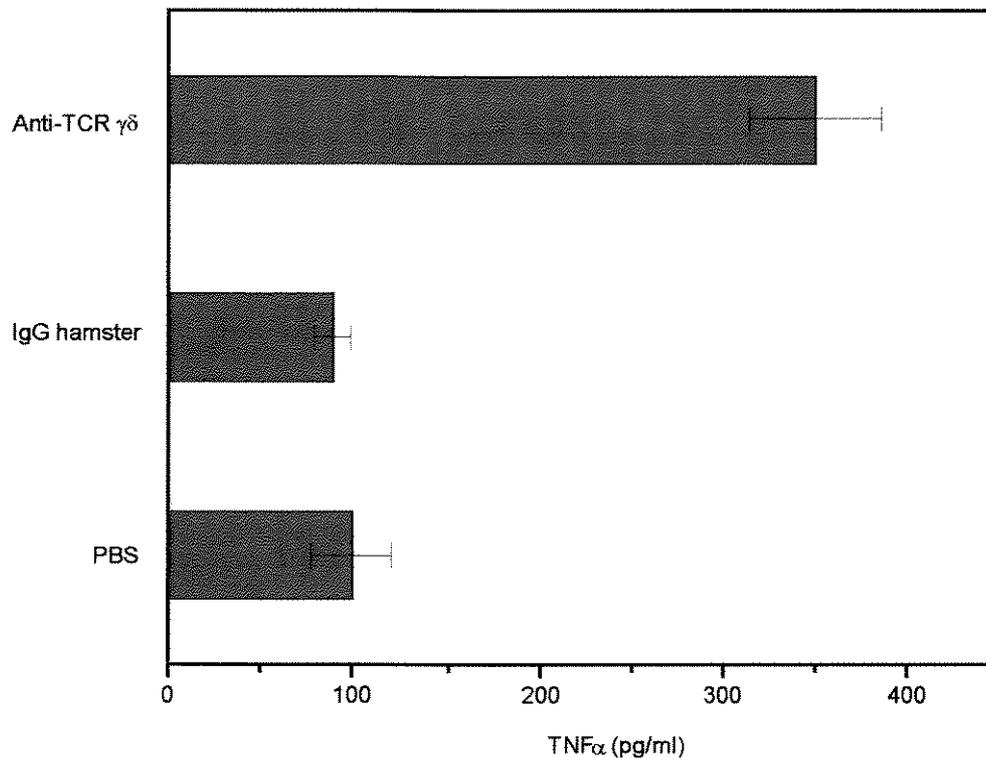


Figura 8 - Dosagem de TNF $\alpha$  do sobrenadante de cultura. Células esplênicas de animais tratados in vivo com o mAb anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS previamente a imunização com MBP/CFA, foram cultivadas na presença de LPS (2,0  $\mu\text{g/ml}$ ). Os resultados representam a média de uma série de experimentos e estão expressos em pg/ml.

### 4.3 MODULAÇÃO DA TOLERÂNCIA ORAL A PLP PELOS LINFÓCITOS T $\gamma\delta$ .

Com o objetivo de estudar os efeitos do tratamento com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  na indução de tolerância oral a PLP e ampliar as nossas observações dentro do modelo de EAE, um grupo de animais recebeu cinco doses de 500  $\mu$ g do anti-TCR $\gamma\delta$  previamente ao tratamento oral com PLP. A escolha do método de tratamento *in vivo* com o anti-TCR $\gamma\delta$  foi baseada em trabalhos anteriores (PETERMAN et al, 1993) e também considerando-se os nossos resultados com o anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma/\delta$  na indução de EAE. Verificou-se que a administração de três doses de 0,5 mg do anticorpo anteriormente à imunização com MBP levava a axacerbação da E.A.E. (item 3.2) Essas informações foram associadas ao esquema de múltiplas baixas doses do antígeno para indução de tolerância oral, resultando no protocolo sumarizado no ANEXO 7.

Para a avaliação dos resultados, utilizamos os valores de Score Clínico Médio (S.C.M.), que representa a média diária do score cínico do referido grupo, e também de média do número de dias até o aparecimento da doença (M.D.A.D.). A figura 9 mostra a evolução clínica da EAE.

Os animais tratados *in vivo* com o anti-TCR $\gamma\delta$  e posteriormente tolerizados oralmente com PLP apresentam uma doença bastante mais severa em relação aos animais oralmente tolerizados sem prévio tratamento com o anticorpo, como mostra a Figura 9. O aparecimento da EAE foi precoce para o mesmo grupo, como mostram os valores de M.D.A.D. (Tabela 3). Os scores cínicos individuais estão colocados no ANEXO 7, juntamente com os valores de Score Clínico Médio.

Todos esses dados em conjunto sugerem que o tratamento com o anticorpo monoclonal antiTCR  $\gamma\delta$  reverteu a tolerância induzida pela administração oral de PLP.

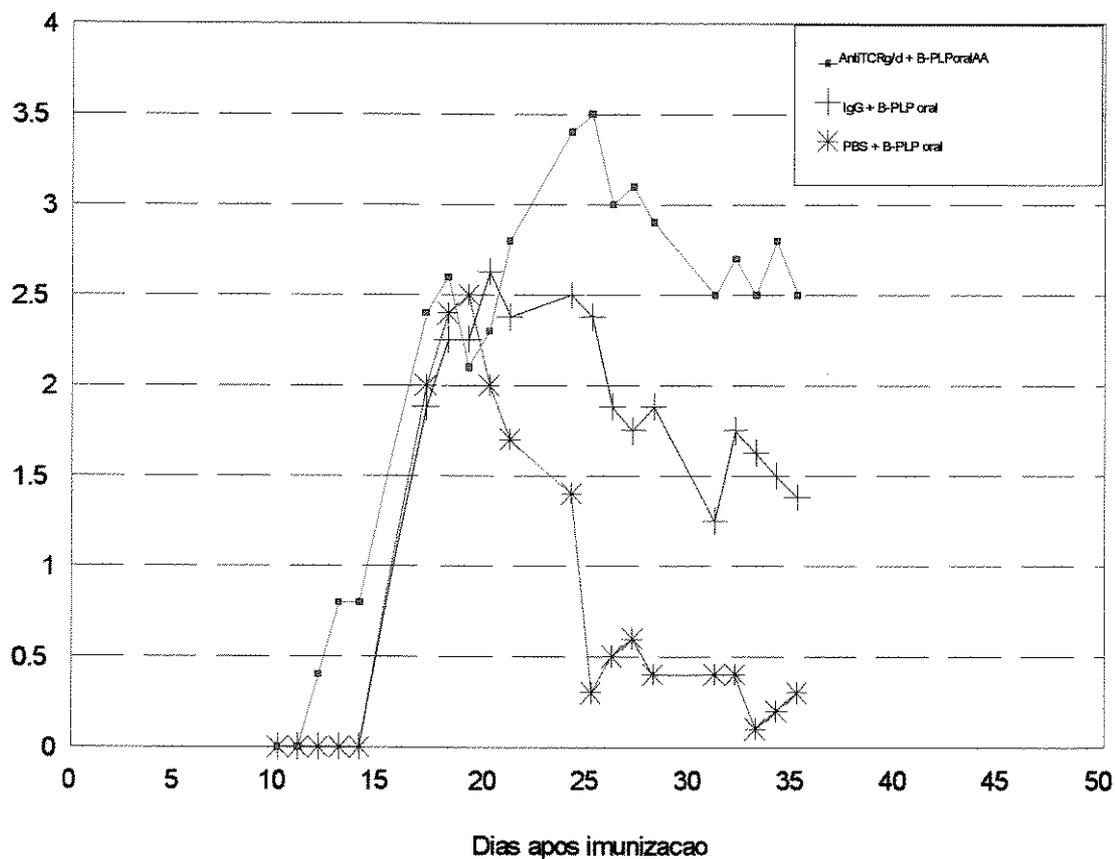


Figura 9 - Evolução clínica da EAE para animais tratados com mAB anti-TCR $\gamma\delta$  ou com IgG de hamster, previamente à tolerização por via oral com PLP e imunização com MBP/CFA. Os dados representam médias diárias dos scores clínicos entre os indivíduos de cada grupo (S.C.M).

**Tabela II** - Valores de Média dos Máximos Scores Clínicos (M.M..S.C) e Média de Dias para o Aparecimento da Doença (M.D.A.D.) para animais tratados *in vivo* com anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG de hamster ou PBS anteriormente à tolerização com PLP e à imunização com MBP/CFA.

<b>Tratamento</b>	<b>M.D.A.D.</b>
antiTCR $\gamma\delta$ +PLP oral	15.8 $\pm$ 1.4
IgG + PLP oral	18.0 $\pm$ 1.0
PBS + PLP oral	17.0 $\pm$ 0.0

**DISCUSSÃO**

## V - DISCUSSÃO

As células  $T\gamma\delta$  vêm sendo alvo de muitas investigações e, até o momento, as conclusões a respeito das funções que desempenham no sistema imunológico são controversas. Entretanto, diversos autores vêm atribuindo às células  $T\gamma\delta$  uma função associada à regulação da resposta imune. Este trabalho tem por objetivo estudar a função destas células dentro do modelo de Encefalomielite Experimental Autoimune.

A evolução clínica da E.A.E. para os animais tratados com o anticorpo monoclonal anti- $TCR\gamma\delta$  foi significativamente diferente. Os animais  $\gamma/\delta$ -depletados levaram menos tempo para apresentar os primeiros sintomas, apresentaram maior incidência e maior severidade da E.A.E. Houve antecipação dos sinais clínicos e principalmente uma nítida exacerbação de doença.

A análise citométrica das células esplênicas dos animais tratados *in vivo* com o anticorpo monoclonal 3A10 mostrou uma redução da população de linfócitos  $TCR\gamma\delta^+$  em relação aos animais não tratados (figuras 1A e 1B). Embora a população de células  $T\gamma\delta$  seja originalmente bem pequena dentre as células esplênicas, o que dificulta evidenciar a depleção, nossos resultados são semelhantes aos obtidos por CARDILLO et al., (1993). Estes resultados nos permitem afirmar que o anticorpo monoclonal 3A10 possui efeito modulador sobre a população de células  $TCR\gamma\delta$ , de forma que os animais tratados *in vivo* com o anticorpo monoclonal 3A10 apresentam, após o tratamento, uma população bastante reduzida de linfócitos  $TCR\gamma\delta$ .

Para os animais tratados *in vivo* com o mAb 3A10 e posteriormente imunizados com MBP/CFA (figura 1C), a análise citométrica mostrou que a população de células  $TCR\gamma\delta$  continua reduzida durante a indução da E.A.E. Esta informação é importante, pois nos permite afirmar que a população de células  $TCR\gamma\delta$  permanece reduzida durante o nosso protocolo para indução da doença. De acordo com

KAUFMANN et al., (1993), as células TCR $\gamma\delta$  repopulam entre 10 e 12 dias após a última dose do anticorpo.

Os resultados *in vitro* apontam diferenças importantes entre os animais tratados com o anti-TCR $\gamma\delta$  e os tratados com PBS ou IgG de hamster. A dosagem de anticorpos anti-MBP no soro e a resposta linfoproliferativa a MBP foram superiores para os animais  $\gamma\delta$ -depletados. A resposta linfoproliferativa a concanavalina A foi significativamente superior, mostrando que também a resposta linfoproliferativa inespecífica foi alterada.

A ação moderadora das células TCR $\gamma\delta$  sobre a produção de anticorpos foi evidenciada por alguns autores. Mc MENAMIN et al., (1994), Mc MENAMIN et al., (1995) mostram que células T $\gamma\delta$  presentes na mucosa do trato respiratório, em animais tolerizados com OVA via inalação, suprimem a produção de IgE através de um mecanismo conhecido como “desvio de resposta imune”. HÄCKER et al (1995) mostram que células T $\gamma\delta$  no sangue periférico são ativadas por células B antígeno-específicas e que, após esta ativação, passam a influenciar a atividade das células B, suprimindo ativamente a secreção de IgG. STANFORD et al., (1996) mostram que as células T  $\gamma\delta$  são capazes de regular a atividade de células B auto-reativas no modelo de Lupus Eritematoso Sistêmico, uma vez que animais  $\gamma\delta$ -deficientes apresentam aumento da produção de auto-anticorpos.

Está amplamente constatado que as células responsáveis pela Encefalomielite Experimental Autoimune são linfócitos T CD4<sup>+</sup> auto-reativos a neuro-antígenos. (HOLOSHITZ et al., 1983; ZAMVIL et al., 1990). O aumento da resposta linfoproliferativa específica para MBP e também dos níveis de anticorpos anti-MBP no soro sugere que, na situação onde a população de células TCR $\gamma\delta$  é reduzida, ocorre provavelmente uma ativação dos clones auto-reativos, o que leva à exacerbação da E.A.E. que observamos *in vivo*.

A dosagem de citocinas do sobrenadante de cultura de células esplênicas dos animais TCR $\gamma\delta$ -depletados previamente a imunização com MBP/CFA revelou níveis maiores de TNF $\alpha$  e níveis menores de TGF $\beta$  em relação aos animais tratados com PBS ou IgG de hamster. Esses resultados sugerem que, na situação em que a população de células T $\gamma\delta$  está reduzida, no modelo de E.A.E., ocorre aumento na produção de TNF $\alpha$  e diminuição na produção de TGF $\beta$ .

Está bem estabelecido que o TNF $\alpha$  e o TGF $\beta$  têm papel importante na determinação da migração de leucócitos para o sistema nervoso central *in vivo*. Foi evidenciado que a aderência de células do endotélio microvascular de cérebro murino a linfócitos pode ser significativamente aumentada pelo pré-tratamento com TNF $\alpha$  e que o oposto ocorre com a administração de TGF $\beta$  (FABRY et al., 1995). Os autores mostram que a administração de TGF $\beta$  reduz significativamente a migração de linfócitos para o interior do sistema nervoso central *in vivo*, de maneira dose-dependente, e sugere um importante papel desta citocina na redução da infiltração de linfócitos no S.N.C. nas doenças desmielinizantes, tais como a E.A.E. No entanto, quando o TNF $\alpha$  é administrado ocorre aumento da migração celular, também de maneira dose-dependente.

O papel do TGF $\beta$  vem sendo amplamente evidenciado na tolerância oral a neuro-antígenos e também nos períodos de remissão natural da E.A.E. KHOURY et al. (1992) mostra o aumento da secreção de citocinas imuno-regulatórias *in vivo*, dentre elas o TGF $\beta$ , diretamente nos sítios inflamatórios de animais oralmente tolerizados com MBP. MILLER et al. (1992) mostram que a administração de anti-TGF- $\beta$  *in vivo* reverte a tolerância de animais tratados oralmente com MBP e exacerba a EAE de animais não tolerizados. SANTOS et al (1994) mostraram que em animais oralmente tolerizados com MBP, células secretoras de TGF- $\beta$  são geradas ainda ao nível da mucosa do trato intestinal e já estão presentes nas Placas de Peyer 24 horas após a administração oral do tolerógeno. Estes trabalhos mostram que, tanto a supressão da

EAE provocada pela administração oral de MBP quanto os mecanismos naturais de recuperação da doença (observados na sua fase remissiva), utilizam uma via imunomodulatória comum que é dependente de TGF- $\beta$ .

O aumento que observamos da produção de TNF $\alpha$  nos animais  $\gamma\delta$ -depletados sugere que, na ausência das células T  $\gamma\delta$  ocorre ativação de células produtoras de TNF- $\alpha$ . Paralelamente observamos-se para esses mesmos animais uma diminuição da produção de TGF- $\beta$ . É sabido que o TGF- $\beta$  inibe a produção de citocinas do tipo Th1, tais como o IFN- $\gamma$ . Uma possibilidade a ser investigada é a de que o TGF- $\beta$ , pela sua ação anti-inflamatória, poderia inibir também a síntese de outras citocinas com efeito pró-inflamatório, tais como o TNF- $\alpha$ .

Está claro que, no modelo de EAE, o perfil de citocinas presentes no ambiente determina o tipo de resposta obtida. A indução da EAE pressupõe um determinado *ambiente* do tipo Th1, com citocinas pró-inflamatórias estimulando e amplificando a resposta auto-imune, enquanto que a sua supressão envolve um *ambiente* tipo Th2, com citocinas anti-inflamatórias freando a resposta auto-imune (DRUET et al., 1996).

Nos nossos resultado observamos a exacerbação da E.A.E. e o concomitante aumento da resposta linfoproliferativa específica para MBP e dos níveis de anticorpos anti-MBP no soro. Paralelamente mostramos o aumento dos níveis de TNF $\alpha$  e a redução dos níveis de TGF $\beta$ . Todos estes dados em conjunto sugerem que, com a redução da população de linfócitos TCR $\gamma\delta$  ocorre um aumento da atividade dos clones auto-reativos causadores da EAE., provavelmente devido à mudança do perfil de citocinas no microambiente celular.

As alterações que evidenciamos para os animais  $\gamma\delta$ -depletados, de exacerbação da EAE sugerem que as células T  $\gamma\delta$  possuem um papel de modulação da resposta imune no modelo de EAE.

O papel imuno-modulador das células T $\gamma\delta$  e a sua importância para a homeostase de diversos tecidos já foi sugerido por outros autores (Mc MENAMIN et al., 1994; Mc MENAMIN et al., 1995; SUZUKI et al., 1995). CARDILLO et al (1993) constataam o surgimento de autoimunidade em animais infectados com *Trypanosoma cruzi* conforme o avanço da idade, concomitante com a perda de função supressora das células T  $\gamma\delta$ . KAUFMANN et al., (1993) mostram a ativação dos linfócitos TCR  $\alpha\beta$  após a modulação da população de linfócitos TCR  $\gamma\delta$ , sugerindo uma importante ação moderadora das células TCR $\gamma\delta$  sobre a atividade das células TCR  $\alpha\beta$  *in vivo*. HÄCKER et al. (1995) propõem um modelo de função para as células T $\gamma\delta$  as quais, enfiadas na rede com outras células do sistema imunológico, atuam como reguladores negativos da resposta imune, provavelmente através de mecanismos tais como a produção de citocinas que regulam a atividade de outras células.

BEN-NUN et al., (1993) mostra que proteínas derivadas do *Mycobacterium tuberculosis*, em especial o PPD, são capazes de proteger camundongos contra a E.A.E. Sabendo que o *M. tuberculosis* é um potente estimulador para células T  $\gamma\delta$ , promovendo a sua ativação, possivelmente a proteção contra a doença seja devida a essa estimulação, embora os autores não levantem essa hipótese. DIAZ-BARDALES et al. (1996) evidenciam o aumento da população de células T $\gamma\delta$  após o tratamento *in vivo* com *M. tuberculosis* ou com PPD, mostrando que a ativação dessa população celular diminui a severidade da E.A.E. em ratos Lewis. Estes dados reforçam nossas proposições de que as células T  $\gamma\delta$  são importantes para a supressão da EAE.

Outros autores obtiveram resultados semelhantes aos nossos no modelo de EAE. KOBAYASHI et al., (1996) mostram o agravamento da doença pela administração de outro anti-TCR  $\gamma\delta$ , o anticorpo monoclonal UC7-13D5. Os autores mostram que após o tratamento com o referido anticorpo, ocorre aumento da severidade da doença e um concomitante aumento da produção de IFN $\gamma$ , uma citocina que, segundo os autores, tem um papel crucial no desenvolvimento da EAE.

De maneira oposta, porém, RAJAN et al., (1996) mostram o aumento das células  $T\gamma\delta$  nos focos inflamatórios do S.N.C. durante os surtos da EAE e atribui um papel patogênico a essas células na doença. Segundo os autores, a depleção das células  $T\gamma\delta$  confere proteção aos animais, e não exacerbação da EAE. No entanto, o anticorpo utilizado para a depleção das células  $T\gamma\delta$  foi GL3 e parece haver uma diferença entre este anticorpo e o que utilizamos (3A10) no que diz respeito ao efeito que produzem, fato apontado pelos próprios autores no referido trabalho. Ademais, o protocolo utilizado para os experimentos diferem em outros dois aspectos muito importantes. O artifício utilizado para induzir a EAE e o fato da depleção anteceder ou proceder ao tratamento para indução da doença. No protocolo utilizado por RAJAN et al. (1996), a depleção das células  $T\gamma\delta$  é feita 4 dias após o tratamento para a indução da doença, tratamento este que consiste da transferência adotiva de clones específicos para MBP. No nosso protocolo, a depleção é feita anteriormente ao tratamento para indução da doença e utilizamos a inoculação do neuroantígeno para induzir a EAE.

A indução da EAE é um fenômeno que tem início na periferia e em seguida se efetiva no Sistema Nervoso Central. Acreditamos que quando a depleção é realizada antes da indução da EAE ocorrem perifericamente, diferenças significativas no que diz respeito ao tipo de ambiente, diferenças estas relacionadas ao nível de determinadas citocinas pró e anti-inflamatórias, de tal forma que, quando do tratamento para indução da EAE, essas diferenças alterariam o comportamento dos clones auto-reativos a MBP, modificando a transcorrência da doença. RACKE et al., (1994) mostra que a administração de IL-4 protege camundongos contra a EAE através de um mecanismo conhecido por 'desvio de resposta imune induzido por citocina'. CHEN et al. (1996) mostram que clones de células MBP-específicas podem se diferenciar *in vivo* em clones encefalitogênicos ou em clones de células T regulatórias, dependendo do contexto no qual são expostos ao antígeno. A questão pode estar no tipo de ambiente que os clones auto-reativos encontram na periferia. Assim sendo, o fato da depleção

ocorrer anteriormente ou posteriormente ao tratamento para indução da EAE poderia estar determinando o padrão da resposta obtida.

A este respeito, HSIEH et al., (1996) mostram que as células  $T\gamma\delta$  atuam na imunoregulação da atividade das células Th1 através da produção de IL-10, durante a infecção por *Listeria monocytogenes*. Os autores sugerem que as células  $T\gamma\delta$  possuem atividade imunossupressora na infecção por patógenos e nas doenças inflamatórias, ou em situações nas quais ocorrem danos teciduais ou ampla ativação de leucócitos. Isto seria possível, segundo os autores, devido ao mecanismo de reconhecimento de antígenos que células  $T\gamma\delta$  possuem, que é não restrito ao MHC, e portanto, de mais amplo espectro.

As células  $T\gamma\delta$  que regulariam a resposta imune aos neuro-antígenos são antígeno-específicas? Considerando-se o aumento da resposta linfoproliferativa a MBP e dos níveis de anticorpos anti-MBP no soro dos animais  $\gamma\delta$ -depletados e posteriormente imunizados com MBP/CFA, poderia parecer, a princípio, que esta ação moduladora no modelo de E.A.E. seria específica. No entanto, o aumento da resposta linfoproliferativa a concanavalina A para para estes mesmos animais (figura 4) sugere que esta ação moduladora é inespecífica. Esta última suposição é fortalecida quando observamos a ação do anticorpo monoclonal antiTCR $\gamma\delta$  *in vitro* sobre a resposta a concanavalina A de animais que não foram submetidos a quaisquer tratamentos (figura 5). Observou-se um aumento crescente da resposta a concanavalina A conforme o aumento da dosagem do anticorpo *in vitro*, sugerindo que na situação onde a população de células  $T\gamma\delta$  é reduzida, ou seus produtos são bloqueados, ocorre ativação celular de forma inespecífica. De acordo com os nossos dados, portanto, essa atividade moderadora das células  $T\gamma\delta$  seria inespecífica.

MILLER et al (1992), estudando a tolerância oral a MBP, propôs um mecanismo denominado *bystander suppression*. O trabalho mostra que, na indução de tolerância oral, o tolerógeno estimula os linfócitos de maneira específica, mas a

supressão é mediada pela liberação de citocinas imuno-supressoras antígeno-inespecíficas, no caso o TGF- $\beta$ . A exemplo deste mecanismo, os nossos resultados sugerem que as células T $\gamma\delta$  cumprem, no modelo de EAE, um papel imunomodulador que se efetiva através da liberação de citocinas imuno-supressoras antígeno-inespecíficas. Dentre essas citocinas, provavelmente o TGF $\beta$  está envolvido.

O experimento *in vivo* mostrando que o tratamento com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  reverte a tolerância obtida pela administração oral de MBP seria mais uma evidência a favor do provável papel modulador das células T $\gamma\delta$  no modelo de EAE. Esses dados sugerem uma provável regulação também da tolerância oral aos neuro-antígenos pelas células T $\gamma\delta$ . Investigações mais aprofundadas seriam necessárias para esclarecer os mecanismos pelos quais as células T $\gamma\delta$  estariam regulando a tolerância oral a neuro-antígenos, mas, a princípio poderíamos supor que isto se deve a regulação da produção de TGF- $\beta$ .

A nossa hipótese de que as células T $\gamma\delta$  regulariam o tipo de ambiente predominante na periferia do organismo, determinando o padrão de resposta imune à indução da E.A.E, pressupõe que a depleção das células T $\gamma\delta$  é realmente capaz de influenciar o padrão de citocinas na periferia do organismo. STANFORD et al., (1996) mostra que ocorre aumento da produção de auto-anticorpos dos isotipos IgG1, IgE e IgG2a em animais  $\alpha\beta$ -deficientes indicando uma provável produção de IL-4 e IFN- $\gamma$  pelas células T $\gamma\delta$ . No nosso trabalho evidenciamos o aumento dos níveis de TNF $\alpha$  e a diminuição dos níveis de TGF $\beta$  para os animais com EAE e também aumento da resposta linfoproliferativa a concanavalina A de animais submetidos exclusivamente ao tratamento com o anti-TCR $\gamma\delta$ . Acreditamos que esta última informação pode ser um indício de que a depleção das células  $\gamma\delta$  induz uma mudança do perfil de citocinas na periferia.

Estas hipóteses são necessariamente assunto para estudos posteriores.

**CONCLUSÕES**

## VI - CONCLUSÕES

1 - A depleção dos linfócitos T  $\gamma\delta$  devida ao tratamento *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  3A10 leva a exacerbação da Encefalomielite Experimental Autoimune, provocando aumento da severidade da doença e antecipação no aparecimento dos sinais clínicos característicos.

2 - Ocorre aumento dos níveis de anticorpos específicos no soro e da resposta linfoproliferativa específica para os neuro-antígenos, bem como da resposta linfoproliferativa inespecífica.

3 - Ocorre aumento da secreção de TNF $\alpha$  e queda na secreção de TGF $\beta$ .

4 – Isto posto, conclui-se que os linfócitos T  $\gamma\delta$  desempenham um papel imunomodulador dentro do modelo de Encefalomielite Experimental Autoimune. Esta atividade moduladora parece ser inespecífica, através da secreção de citocinas, dentre as quais o TGF $\beta$  está envolvido.

**RESZIMO**

## VII - RESUMO

A Encefalomielite Experimental Autoimune é uma doença que apresenta muitos aspectos clínicos e histológicos em comum com a Esclerose Múltipla em humanos, e por este motivo vem sendo utilizada para o estudo da mesma.

O estudo dos mecanismos envolvidos na supressão da EAE, seja através da administração oral de neuro-antígenos ou na fase remissiva da doença, revelou que a supressão ativa é o principal mecanismo imuno-modulador (HIGGINS & WEINER, 1988; LIDER et al., 1989)

Sabe-se que a indução da EAE está relacionada a clones de células T CD4<sup>+</sup> do tipo Th1 auto-reativas a neuro-antígenos, e a produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (NICHOLSON & KUCROO, 1996). Em contrapartida, a supressão da doença é mediada por células do tipo Th2 e por citocinas anti-inflamatórias, tais como IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  (CHEN et al., 1994; DRUET et al., 1996)

Foi demonstrado anteriormente o papel das células T  $\gamma\delta$  no controle da autoimunidade (CARDILLO et al., 1993) e na tolerância imunológica (McMENAMIN et al, 1994; McMENAMIN et al, 1995; SUZUKI et al., 1995)

No presente trabalho procuramos investigar o papel dos linfócitos T  $\gamma\delta$  na indução de EAE, utilizando o anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  3A10 para modular essa população celular. Os resultados aqui obtidos mostram a exacerbação da EAE nos camundongos  $\gamma\delta$ -depletados, com aumento da severidade e da incidência da doença e também antecipação do aparecimento dos seus sinais clínicos. Nos estudos *in vitro* observou-se aumento da resposta linfoproliferativa para a proteína básica de mielina (MBP) e da produção de anticorpos anti-MBP no soro, sugerindo aumento da atividade dos clones auto-reativos causadores da doença. Houve também aumento da resposta linfoproliferativa a concanavalina A. O estudo

da produção de citocinas por células esplênicas dos animais  $\gamma\delta$ -depletados revelou aumento da secreção de TNF- $\alpha$  e diminuição da secreção de TGF- $\beta$ .

Todos esses resultados sugerem que os linfócitos T  $\gamma\delta$  exercem uma função imuno-supressora no modelo de EAE. O aumento da resposta linfoproliferativa a concanavalina A para os animais  $\gamma\delta$ -depletados sugere que esta atividade supressora é inespecífica, a exemplo do mecanismo de *bystander suppression* proposto por MILLER et al. (1991) e provavelmente se efetiva através da secreção de citocinas anti-inflamatórias, dentre as quais o TGF- $\beta$  está envolvido.

## *REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

## VIII - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLISON, J. P.  $\gamma\delta$  T-cell development. **Curr. Opin. Immunol**, 5:241-246, 1993.
- AL-SABBAGH, A.; MILLER, A.; SANTOS, L. M. B.; & WEINER, H. L. Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL mouse. **Eur. J. Immunol.**, 24 : 2104 - 2109 , 1994.
- ALVORD, E.; KIES, M., & SUCKING, A. Experimental Allergic Encephalomyelitis - A Useful Model for Multiple Sclerosis. **Alan R Liss**, New York, 1984.
- BEN-NUN, A.; ITZHAK ,M.; SAPPLER, G., & De ROSBO, N.K. A 12-kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* protects mice against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. Protection in the absence of shared T cell epitopes with encephalitogenic proteins. **J.Immunol.**, 154: 2939-2948, 1995.
- CARDILLO, F.; FALCÃO, R.P.; ROSSI, M.A .& MENGEL J. An age-related  $\gamma\delta$  T cells suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Eur.J.Immunol.** 23:2597-2605. 1993
- CHEN, Y.; KUCHROO, V.K.; INOBE, J-I; HAFLER, D.A . & WEINER, H.L. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of Autoimmune Encephalomyelitis. **Science**, 265: 1237-1240, 1994.
- CHEN, Y.; INOBE, J-I; KUCHROO, V.K.; BARON, J.L.; JANEWAY JR., C. A . & WEINER, H.L. Oral tolerance in myelin basic protein T-cell receptor transgenic mice: Suppression of autoimmune encephalomyelitis and dose-dependent induction of regulatory cells. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 93:338-391, 1996.

DIAZ-BARDALLES, B. M.; ZACCARIAS, C.; SCAGLIUSI, S. M.; GARCIA, C. A. A., & L.M.B. SANTOS. Modulação da EAE por antígenos derivados de Micobactérias. **XX Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia. International Meeting on Citokines.** Novembro, 1996.

DEIBLER, G.E.; MARTENSON, R.E., & KIES, M.W. Large scale preparation of myelin basic protein from Central Nervous Tissue of several mammalian species. **Prep.Bioch.** 2:139-165. 1972

DRUET, P.; SHEELA, R., & PELLETIER, L. Th1 and Th2 cells in Autoimmunity (revision). **Chem.Immunol**, 63: 158-170, 1996.

FABRY, Z.; TOPHAM, D.J.; FEE, D.; HERLEIN, J.; CARLINO, J.; HART, M. & SRIRAM, S. J. TGF- $\beta$ 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. **J.Immunol.**, 155:325-332, 1995.

FRIEDMAN, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; FISHMAN-LOBELL, J.; POLANSKI, M.; PRABHU DAS, M.; KHOURY, S.J., & WEINER, H.L. Oral Tolerance: a biologically relevant pathway to generate peripheral tolerance against external and self antigens. **Chem.Immunol.** 58: 259-290, 1994.

FU, Y-X.; ROARK, C.E.; KELLY, K.; DREVETS, D.; CAMPBELL, P.; O'BRIEN, R., & BORN, W. Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by  $\gamma\delta$  T cells. **J.Immunol.**, 153:3101-3115, 1994.

HAAS, W. ; PEREIRA, P. & TONEGAWA, S.. Gamma/Delta Cells. **Annu. Rev. Immunol.**, 11:637-685, 1993.

- HÄCKER, G.; ADAM, S., & WAGNER, H. Interaction between  $\gamma\delta$  T cells and B cells regulating IgG production. **Immunol**, **84**:105-110, **1995**.
- HEYBORNE, K.; FU, Y-X.; NELSON, A .; FARR, A .; O'BRIEN, R., & BORN, W. Recognition of trophoblasts by  $\gamma\delta$  T cells. **J. Immunol**, **153**: 2918-2926, **1994**.
- HIGGINS, P.J., & WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **J.Immunol.**, **140**:440-445, **1988**.
- HIROI, T.; FUJIHASHI, K.; MCGHEE, J.R., & KIYONO, H. Polarized Th2 cytokine expression by both mucosal  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells. **Eur. J. Immunol.**, **25**:2743-2751, **1995**.
- HOLOSHITZ, J.; FRENKEL, A .; BEN-NUN, A . & COHEN, I.R. Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mediated or prevented by lymphocyte lines directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein. Vaccination is determinant specific. **J.Immunol.**, **131**: 2810-2813, **1983**.
- HSIEH, B.; SCHRENZEL, M. D.; MULVANIA, T.; LEPPER, H. D.; DIMOLFETTO-LANDON, L., & FERRICK D. A. In vivo cytokine production in murine listeriosis - evidence for immunoregulation by  $\gamma\delta^+$  T cells. **J. Immunol.**, **156**: 232-237, **1996**.
- KAPLAN, M.H.; SUN Y.; HOEY, T. & GRUSBY, M. H. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in stat 4-deficient mice. **Nature**, **382**: 174-177, **1996**.
- KAUFMANN, S.H.E.; BLUM, C. & YAMAMOTO S. Crosstalk between  $\alpha/\beta$  and  $\gamma/\delta$  T cells in vivo: activation of  $\alpha/\beta$  T-cells responses after  $\gamma/\delta$  T-cell modulation with the monoclonal antibody GL3. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**. **90**:9620-9624. **1993**.

- KENNEDY, M.K.; TORRENCE, D.S.; PICHIA, K.S. & MOHLER, K. M. Analysis of cytokine mRNA expression in the Central Nervous System of mice with experimental autoimmune Encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. **J Immunol.** **149**: 2496-2505, **1992**.
- KHOURY, S.; HANCOCK, W.W., & WEINER, H.L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of Transforming Growth Factor  $\beta$ , Interleukin 4, and Prostaglandin E expression in the brain. **J. Exp. Med.**, **176**: 1355-1364, **1992**.
- KHOURY, S.J.; AKALIN, E.; CHANDRAKER, A.; TURKA, L.; LINSLEY, P.S.; SAYEGH, M.H., & HANCOCK, W.W. CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system. **J. Immunol.** **155**: 4521-4524, **1995**.
- KOBAYASHI, Y.; KAWAY, K.; ITO, K.; HONDA, H.; SOBUE, G. & YOSHIKAI, Y. Aggravation of murine experimental allergic encephalomyelitis by administration of T-cell receptor  $\gamma\delta$ -specific antibody. **J. Neuroimmunol.**, **73**: 169-174, **1997**.
- KUCHROO V.K.; SOBEL, R.A.; LANING, J.C.; MARTIN, C.A.; GREENFIELD, E.; DORF, M.E., & LEES, M.B. Experimental Allergic Encephalomyelitis mediated by cloned T cells specific for a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. **J. Immunol.** **12**: 3776-3782, **1992**.
- LEES, M., & SAKURA, J. D., in Marks, N. and Rodnight, R. (Eds) Research Methods in Neurochemistry. Plenum Press, New York, p 354, **1978**.
- LIDER, O.; SANTOS, L.M.B.; LEE, C.S.Y.; HIGGINS, P.J., & WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein.

II. Suppression of the disease and *in vitro* immune responses mediated by antigen-specific CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. **J.Immunol.** 142:748-753, 1989.

LIN, H.; MOSMANN, T.R.; GUILBERT, L.; TUNTIPOPIPAT, S., & WEGMANN T.G. Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface. **J.Immunol**, 151:4562-4573, 1993.

McMENAMIN, C.; PIMM,C.; McKERSEY, M., & HOLT, P.G. Regulation of IgE responses to inhaled antigen in mice by antigen specific  $\gamma\delta$  T cells. **Science**, 265: 1869-1871, 1994.

McMENAMIN, C.; McKERSEY,M.; KÜLNLEIN, P.; HÜNIG, T., & HOLT, P.  $\gamma\delta$  T cells down-regulate primary igE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. **J.Immunol.**, 154: 4390-4394, 1995.

MILLER, A.; LIDER, O.; & WEINER,H. Antigen-driven bystander suppression after oral administration of antigens.**J.Exp.Med.**, 174:791-798, 1991.

MILLER, A.; LIDER, O.; ROBERTS, A.; SPORN, M.B. & WEINER, H.L. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both *in vitro* and *in vivo* immune responses by the release of transforming growth factor  $\beta$  after antigen-specific triggering. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, 89: 421-425,1992.

MILLER, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; PRABHU-DAS, M., & WEINER, H.L.. Epitopes of Myelin Basic Protein that trigger TGF- $\beta$  release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. **J.Immunol.**, 151: 7307-7315, 1993.

MINCHEVA-NILSSON, L.; HAMMARSTRÖM, S., & HAMMARSTRÖM M.L.. Human decidual leukocytes from early pregnancy contain high numbers of  $\gamma\delta$ <sup>+</sup> cells and show selective down-regulation of alloreactivity. **J. Immunol.**, 149: 2203-2211, 1992.

- NICK, S.; PILERI, P.; TONGIANI, S.; UEMATSU, Y.; KAPPOS, L., & DE LIBERO, G. T cell  $\gamma\delta$  repertoire is skewed in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients: molecular and functional analysis of antigen-reactive  $\gamma\delta$  clones. **Eur. J. Immunol.**, 25: 355-363, 1995.
- NICHOLSON, L. B., & V. KUCHROO Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune diseases. **Cur. Opin. Immunol**, 8: 837-842, 1996.
- PTAK, W. & ASKENASE, P.W..  $\gamma\delta$  T cells assist  $\alpha\beta$  T cells in adoptive transfer of contact sensitivity. **J Immunol.** 149:3503-3508. 1992.
- PETERMAN, G.; SPENCER, C.; SPERLING, A.I., & BLUESTONE, J.A. Role of  $\gamma\delta$  T cells in murine collagen-induced arthritis. **J.Immunol.**, 151:6546-6558, 1993.
- RAJAN, A. J.; GAO, Y.-L.; RAINE, C.S.; & BROSNAN, C.F. A Pathogenic role for  $\gamma\delta$  T cells in relapsing-remiting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. **J Immunol.**, 157: 941-949, 1996.
- RACKE, M.K.; BONOMO, A .; SCOTT, D.E.; CANELLA, B.; LEVINE, A.; RAINE, C.S.; SCHEVACH, E.M., & RÖCKEN,M. Cytokine-induced immune deviation as a therapy for inflammatory Autoimmune disease. **J.Exper.Med.**, 180:1961-1966, 1994.
- SANTOS, L . M . B .; AL-SABBAGH, A .; LONDONO, A .; & WEINER, H . L. Oral tolerance to Myelin Basic Protein Induces Regulatory TGF- $\beta$ -Secreting T Cells in Peyer's Patches of SJL Mice. **Cel.Immunol**, 157:439-447, 1994.

- SELMAJ, K.; BROSINAN, C.F. & RAINE, C. S. Colocalization of lymphocytes bearing  $\gamma\delta$  T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **88**:6452-6456, **1991**.
- STANFORD, L. P.; MADAIO, M. P.; HAYDAY, A.C. & CRAFT J. Propagation and regulation of systemic Autoimmunity by  $\gamma\delta$  T cells. **J. Immunol.**, **157**: 5689-5698, **1996**.
- STINISSEN, P.; VANDEVYVER, C.; MEDAER, R.; VANDEGAER, L.; NIES, J.; TUYLS. L.; HAFLER, D.A .; RAUS,.J. & ZHANG, J. Increased frequency of  $\gamma\delta$  T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with Multiple Sclerosis. **J. Immunol.**, **154**:4883-4894, **1995**.
- SUZUKI, T.; HIROMATSU ,K.; ANDO, Y.; OKAMOTO, T.; TOMODA, Y. & YOSHITAI,Y.. Regulatory role of  $\gamma\delta$  T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal antifetal immune response. **J.Immunol.**,**154**:4476-4484. **1995**.
- VACCHIO, M.S., ASHWELL, J.D. T Cell Tolerance. **Chem.Immunol.** ,**58**: 1-59, **1994**.
- WUCHERPFENNIG, K.W.; NEWCOMBE,J.; LI, H.; KEDDY,C.; CUZNER, L. & D. HAFLER.  $\gamma\delta$  T-cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesion. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA**, **89**:4588-4592, **1992**.
- WINDHAGEN, A.; NEWCOMBE, J.; DANGOND, F.; LI, H.; WOODROOFE, N.; CUZNER, M. L. & HAFLER, D. A. Expression of IL-12 and B7 costimulatory molecules in Multiple Sclerosis lesions. **J Exp. Med.** **182**: 1985-1996, **1995**.
- YUUKI, H.; YOSHIKAI, Y.; KISHIHARA, K.; IWASAKI, A.; MATSUZAKI, G.; TAKIMOTO, H.; & NOMOTO, K. Clonal anergy in self-reactive  $\alpha\beta$  T cells is abrogated by heat-shock protein-reactive  $\gamma\delta$  T cells in aged athymic nude mice. **Eur. J. Immunol.**, **20**: 1475-1482, **1990**.

ZAMVIL, S. S., & STEINMAN, L. The T lymphocytes in experimental allergic encephalomyelitis.  
**Ann.Rev.Immunol. 8: 579-621, 1990.**

*ANEXOS*

<b>Dias após imunização</b>	<b>Anti-TCR<math>\gamma\delta</math></b>	<b>PBS</b>
	<b>S.C.M.*</b>	<b>S.C.M.*</b>
8	0	0
9	0	0
10	0	0
11	0	0
12	0,2	0
13	0,5	0
14	0,5	0
15	0,7	0
16	1,8	0,2
17	2,5	0,8
18	2,6	0,9
19	2,9	1,2
20	2,5	0,9
21	1,2	0,8
22	0,8	0,6

ANEXO 1 - Evolução clínica da E.A.E. para animais tratados *in vivo* com anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  ou PBS previamente à imunização com MBP/CFA. Valores de Score Clínico Médio As diferenças observadas são significantes (p=0,0247)

Diluições do soro	Anti- $\gamma\delta$			IgG de hamster			PBS		
	EXP#1	EXP#2	MÉDIA/desvio	EXP#1	EXP#2	MÉDIA/desvio	EXP#1	EXP#2	MÉDIA/desvio
1/100	1.301	1.329	1.315±19,79	0.952	1.000	0.976 ± 33,9	0.877	0.842	0.859±24,7
1/200	1.094	1.218	1.156± 87,6	0.744	0.712	0.728 ±22,6	0.623	0.698	0.660±53,03
1/400	0.972	1.010	0.991,25±26,5	0.611	0.665	0.633 ±31,11	0.480	0.418	0.449±43,84
1/800	0.714	0.763	0.738,5±34,64	0.512	0.484	0.498 ±19,7	0.337	0.260	0.298,5±54,4
1/1600	0.513	0.523	0.518±7,42	0.317	0.271	0.294 ± 32,5	0.225	0.148	0.186,5±54,4

ANEXO 2 - Tabela mostrando os resultados das dosagens de anticorpos anti-MBP no soro. Teste T aplicado para a diluição de 1/200;  $p=0,01052$ .

TRATAMENTO	ConA (ug/ml)	EXP #1	EXP# 2	EXP# 3	MÉDIAS/DESVIO
Anti- $\gamma\delta$	2,5	34.254	33.997	34.246	34.165 $\pm$ 146
Anti- $\gamma\delta$	1,25	26.321	27.675	29.810	27.935 $\pm$ 1.759
Anti- $\gamma\delta$	0,625		25.097		25.097
Anti- $\gamma\delta$	-	1.248	3.191	2.300	2.246 $\pm$ 972
IgG hamst.	2,5	19.014		20.858	19.936 $\pm$ 1.303
IgG hamst.	1,25	17.883		21.332	19.607 $\pm$ 2.438
IgG hamst.	0,625				
IgG hamst.	-	1.122		1.264	1.193 $\pm$ 100
PBS	2,5	14.672	24.321	20.328	19.773 $\pm$ 4.848
PBS	1,25	14.944	18.877	15.177	16.336 $\pm$ 2.206
PBS	0,625		7.579		7.579
PBS	-	898	1.712	1.222	1.277 $\pm$ 409

ANEXO 3 - Tabela mostrando aos resultados dos experimentos de proliferação celular de culturas estimuladas com Concanavalina A. Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm). As diferenças são significativas (p=0,0068)

Anti- $\gamma\delta$ ( $\mu\text{g/ml}$ )	EXP#1 (cpm)	EXP#2 (cpm)	EXP#3 (cpm)	cpm MÉDIA/DESVIO
32	24086	21519		22802,5+-1815
24	27037	22826	22017	23960+-2695
16	22318	19587	20197	20700+-1433
8	25086	16521	21587	21064+-4306
4	24215	18687		19951+-3073
2	18761	17166		17963,5 +-1127,8
0	14610	12048	10799	12485,6 +-1942,8

IgG hamster	EXP#1	EXP#2	MÉDIA/DESVIO
32	14.788	15.983	15.185 +- 562
24	14.244	15.338	14.791 +- 773
16	13.956	14.298	14.127 +- 241
8	12.538	13.335	12.936 +- 563
4	12.944	14.225	13.584 +- 905
2	14.311	13.546	13.928 +- 540
0	13.890	14.976	14.433 +- 767

Anexo 3B - Dados experimentais do efeito do anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$  *in vitro* na resposta proliferativa a concanavalina A, em animais não submetidos a quaisquer tratamentos *in vivo*.

TRATAMENTO	MBP in vitro (ug/ml)	EXP#1	EXP#2	EXP#3	MÉDIA/SD
Anti- $\gamma\delta$	10	15.018	24.179	13.763	17.653 $\pm$ 5.686
Anti- $\gamma\delta$	5	17.321	20.861	17.445	18.542 $\pm$ 2008
Anti- $\gamma\delta$	2,5	9.311	18.225	15.992	14.509 $\pm$ 4.638
Anti- $\gamma\delta$	-	1.289	1.253	1.957	1.271 $\pm$ 25
IgG hamst.	10	3.193	5.557	6.205	4.985 $\pm$ 1.585
IgG hamst.	5	5.804	4.543	4.827	5.071 $\pm$ 646
IgG hamst.	2,5	3.767	3.952	5.178	4.299 $\pm$ 766
IgG hamst.	-	704	514	1.027	815 $\pm$ 183
PBS	10	4.068	7.877	6.506	6.150 $\pm$ 1959
PBS	5	5.144	8.839	7.788	7.257 $\pm$ 1.903
PBS	2,5	3.230	6.337	7.452	5.673 $\pm$ 2.187
PBS	-	1.439	778	1.255	1.157 $\pm$ 341

ANEXO 4 - Tabela mostrando os resultados dos experimentos de resposta linfoproliferativa a MBP. Resultados expressos em contagem por minuto (cpm). As diferenças observadas são significantes ( $p=0,00212$ ); teste t aplicado aos resultados de resposta proliferativa a 5  $\mu\text{g/ml}$  de MBP.

TRATAMENTO	Estimulo	EXP #1 (cpm)	EXP# 2 (cpm)	cpm MÉDIA/DESVIO	TGFβ (pg)
Anti-γδ	ConA	11.119	12.767	11.943 ±1.165	335
Anti-γδ	MBP	13.662	13.809	13.735 ±103	220
Anti-γδ.	S.E	23.128	19.293	21.210 ±2711	0
IgG	ConA	8.562.	6.929	7.749 ±1.154	515
IgG	MBP	7.956		7.956	525
IgG	S.E.	12.398	6.671	9.534 ±4049	310
PBS	ConA	7.729	8.014	7.871 ±201	520
PBS	MBP	8.529	10.449	9.489 ±1357	435
PBS	S.E	7.269	18.531	12.900 ±7.963	290

ANEXO 5 - Tabela mostrando os resultados dos experimentos de ensaio biológico com as células CCL-64 para quantificação dos níveis de TGFβ no sobrenadante de cultura.

TRATAMENTO	ESTÍMULO	EXP#1 (D.O.)	EXP#2 (D.O.)	D.O. MÉDIA/DESVIO	TNF $\alpha$ (pg/ml) aproximado
Anti- $\gamma\delta$	LPS	0.580	0.451	0.515 $\pm$ 0.091	350
Anti- $\gamma\delta$	-	0.006	0.004	0.005 $\pm$ 0.001	0
IgG hamst.	LPS	0.230	0.194	0.212 $\pm$ 0.025	90
IgG hamst.	-	0.005	0.006	0.005,5 $\pm$ 0,5	0
PBS	LPS	0.240	0.318	0.279 $\pm$ 0.055	100
PBS	-	0.006	0.008	0.007 $\pm$ 0.001	0

ANEXO 6 - Tabela mostrando os resultados dos experimentos de dosagem dos níveis de TNF  $\alpha$  do sobrenadante de cultura. As diferenças são significativas (p=0,04722).

Tratamento	DIAS											
	-11	-10	-9	-7	-4	-2	0	3	5	7	10	12
Anti-TCR $\gamma\delta$ , IgG ou PBS (i.p.)	X	X	X	-	X	X	X	X	X	X	X	X
PLP ou PBS (oral)	-	-	X	X	X	X	X	X	X	-	-	-
MBP/CFA (s.c.)	-	-	-	-	-	-	X	-	-	X	-	-

**ANEXO 7A** - Esquema de tratamento utilizado para o experimento sobre a modulação da indução de tolerância oral a PLP pelos linfócitos TCR  $\gamma\delta^+$ . A primeira linha indica os dias e a primeira coluna indica os tratamentos.

<b>DIAS</b>	<b># II</b>	<b># II</b>	<b># III</b>	<b># IV</b>	<b># V</b>	<b>S.C.M.</b>
<b>após</b>						<b>*</b>
<b>imuniz.</b>						
<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0	0	0	0
<b>12</b>	0	0	2	0	0	0.4
<b>13</b>	0	0	0	4	0	0.8
<b>14</b>	0	0	0	4	0	0.8
<b>17</b>	0	0	3.5	5	3.5	2.4
<b>18</b>	0	0	4	5	4	2.6
<b>19</b>	0	2.5	4	5	4	2.1
<b>20</b>	0.5	3	4	5	4	2.3
<b>21</b>	0	2	3	5	4	2.8
<b>24</b>	1.5	2.5	3	5	5	3.4
<b>25</b>	1.5	3	3	5	5	3.5
<b>26</b>	0.5	2.5	2	5	5	3.0
<b>27</b>	0.5	2.5	2.5	5	5	3.1
<b>28</b>	0	2	2.5	5	5	2.9
<b>31</b>	0	1	1.5	5	5	2.5
<b>32</b>	0	1.5	2	5	5	2.7
<b>33</b>	0	1	1.5	5	5	2.5
<b>34</b>	0	2	2	5	5	2.8
<b>35</b>	0	1	1.5	5	5	2.5

ANEXO 7B - Dados individuais do grupo de animais tratados *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma\delta$  i.p. e PLP oral anteriormente a imunização com MBP/CFA. \*S.C.M. = score clínico médio.

<b>DIAS</b>	<b># I</b>	<b># II</b>	<b># III</b>	<b># IV</b>	<b># V</b>	<b>S.C.M.</b>
<b>após</b>						<b>*</b>
<b>imuniz</b>						
<b>10</b>	0	0	0	0	-	0
<b>11</b>	0	0	0	0	-	0
<b>12</b>	0	0	0	0	-	0
<b>13</b>	0	0	0	0	-	0
<b>14</b>	0	0	0	0	-	0
<b>17</b>	0.5	0	3.5	3.5	-	1.88
<b>18</b>	2	0	3	4	-	2.25
<b>19</b>	2.5	0	3	3.5	-	2.25
<b>20</b>	3	0	4	3.5	-	2.63
<b>21</b>	2.5	0.5	3.5	3	-	2.38
<b>24</b>	3	1	3	3	-	2.5
<b>25</b>	2.5	0.5	3	3.5	-	2.38
<b>26</b>	2	0	2.5	3	-	1.88
<b>27</b>	1.5	0	2.5	3	-	1.75
<b>28</b>	1.5	0.5	2.5	3	-	1.88
<b>31</b>	1	0	1.5	2.5	-	1.25
<b>32</b>	1.5	0	2.5	3	-	1.75
<b>33</b>	1.5	0	2	3	-	1.63
<b>34</b>	1.5	0	2	2.5	-	1.5
<b>35</b>	1.5	0	1	3	-	1.38

ANEXO 7C - Dados individuais relativos ao score clínico da E.A.E., referentes ao grupo de animais tratados in vivo com IgG i.p. e B-PLP oral, anteriormente a imunização com MBP/CFA . \* **S.C.M.** = score clínico médio.

<b>DIAS</b>	<b># I</b>	<b># II</b>	<b># III</b>	<b># IV</b>	<b># V</b>	<b>S.C.M.</b>
<b>após</b>						<b>*</b>
<b>imuni-</b>						
<b>zação</b>						
<b>10</b>	0	0	0	0	0	0
<b>11</b>	0	0	0	0	0	0
<b>12</b>	0	0	0	0	0	0
<b>13</b>	0	0	0	0	0	0
<b>14</b>	0	0	0	0	0	0
<b>17</b>	2.5	2	0	2.5	3.0	2.0
<b>18</b>	3	3	0	3	3.5	2.4
<b>19</b>	4	3.5	0	2	3.0	2.5
<b>20</b>	3	3	0	1.5	2.5	2.0
<b>21</b>	3	2.5	0	2	1.0	1.7
<b>24</b>	2.5	2	0	1	1.5	1.4
<b>25</b>	0	0.5	0	0.5	0.5	0.3
<b>26</b>	0.5	1.5	0	0.5	0	0.5
<b>27</b>	1	0.5	0	0.5	1	0.6
<b>28</b>	0	0	0	1.0	0.5	0.4
<b>31</b>	0	0	0	1.5	0.5	0.4
<b>32</b>	0	0	0	0.5	0.5	0.4
<b>33</b>	0	0	0	0.5	0	0.1
<b>34</b>	0.5	0	0	0.5	0	0.2
<b>35</b>	0.5	0.5	0	0.5	0	0.3

ANEXO 7D - Dados individuais de score clínico da E.A.E. para os animais tratados somente com B-PLP oral, e posteriormente imunizados com MBP/CFA.

\*S.C.M = Score clínico Médio.