

BLANCA MARIA DIAZ BARDALES



**MODULAÇÃO DA SEVERIDADE DA
ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE
POR ANTÍGENOS DERIVADOS DE
MICOBACTÉRIA**

***CAMPINAS
1998***

BLANCA MARIA DIAZ BARDALES

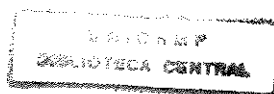
**MODULAÇÃO DA SEVERIDADE DA
ENCEFALOMIELTE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE
POR ANTÍGENOS DERIVADOS DE
MICOBACTÉRIA**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual de
Campinas – UNICAMP, para obtenção do
grau de MESTRE, em Ciências Biológicas
na área de Imunologia.

ORIENTADORA: Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

**Departamento de Microbiologia e Imunologia – Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP**

**CAMPINAS
1998**



este exemplar corresponde à redação final
tese defendida por (a) candidato (a)
Blanca Maria Diaz Bardales
e aprovada pela Comissão Julgadora.
[Signature]

27/02/98

9813423

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	2543m
V.	Ex.
TOMBO BC/	34.233
PROC.	395/98
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	11/06/98
N.º CPD	

CM-00112644-8

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

Díaz Bardales, Blanca Maria

D543m Modulação da severidade da encefalomielite experimental autoimune
por antígenos derivados de micobactéria / Blanca Maria Díaz Bardales. --
Campinas, SP: [s.n.],1998.
75f.: illus.

Orientadora: Leonilda Maria Barbosa Santos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas,
Instituto de Biologia.

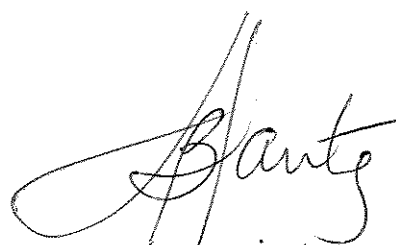
1. Autoimune. 2. Linfócitos. 3. Antígenos. I. Santos, Leonilda
Maria Barbosa. II. Universidade Estadual de Campinas.Instituto de
Biologia. III. Título.

Campinas, 17 de Fevereiro de 1998.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Profa. Dra. (orientador) LEONILDA M. B. SANTOS



assinatura

Prof. Dr. IRINEU JOSÉ BARSANTI CAMARGO



assinatura

Profa. Dra. MARIA HELOISA SOUZA LIMA BLOTTA



assinatura

SUPLENTES:

Profa. Dra. DAGMAR RUTH STACH-MACHADO

assinatura

*Toda a sabedoria vem do senhor Deus, ela sempre esteve com
Ele. Ela existe antes de todos os séculos.*

ECLO 1:1

“ Um dos momentos mais gratificantes da vida ocorre naquela fração de segundo em que aquilo que nos é familiar assume, de repente, a aura estonteante do que é profundamente novo... Esses instantes de iluminação são demasiadamente infrequentes, mais incomuns do que comuns; a maior parte do tempo, permanecemos imersos no que é mundano e trivial. Aí vem a surpresa: o que parece mundano e trivial é própria essência das descobertas. A única diferença é a nossa perspectiva, nossa disposição de colocar as peças de maneira diferente e ver configurações onde, um momento antes, víamos somente sombras”.

EDWARD B. LINDMAN

*À Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos pela Orientação,
ensinamentos e mais que tudo pela grande amizade, apoio e confiança
oferecida desde o primeiro momento no desenvolvimento deste trabalho.*

Aos meus queridos pais, Sofonias e Teresa, pelo carinho, apoio moral, incentivo e esforço que me brindaram neste momento mais importante da minha vida.

Aos meus irmãos Pilar, José, Juan, aos meus cunhados, Juan e Josefa e aos meus sobrinhos, Carol, Gabriel, Miguel, Eliane, Guillermo e Giovani.

*Aos meus amigos especiais, Sílvia, Cristiane, Gláucia, Antonio e Doris
pela amizade, apoio , companherismo e que estiveram do meu lado nos
momentos difíceis e alegres da minha vida no Brasil.*

AGRADECIMENTOS:

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP).

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia, Cristina, Dirce, Daniele; ao pessoal do CEMIB, Francisco e Rovilson; do biotério, Marcos e Antonio; às secretárias, Lúcia, Lourdes e Alba pela amizade e apoio ao longo desta etapa.

Às amigas, Eloísa, Elaine, Sônia, Luciana, Anália, Clarissa, Patrícia e Sílvia (Lab. de Aids do Hospital das Clínicas) e em especial a Célia, Dona Ignês e Paula pela amizade, companherismo e apoio oferecido durante todo momento.

A todas as pessoas que de maneira direta ou indireta participaram deste trabalho.

Trabalho realizado com apoio recebido da
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA
FAPESP

ABREVIATURAS:

MBP	Proteína Básica de Mielina
PLP	Proteolipoproteína
EAE	Encefalomielite Experimental Autoimune
TCR	Receptor para antígeno das células T
HSP	“Heat shock protein”
PPD	Derivado de proteína purificada
Mt	Mycobacterium tuberculosis
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
PBS	Tampão Salino Fosfato
CFA	Adjuvante Completo de Freund
S.C.M	“Score” Clínico Médio
IL4	Interleucina 4
IL10	Interleucina 10
IFN γ	Interferon γ
IFN β	Interferon β
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
GP-MBP	Guinea Pig-Proteína Básica de Mielina
IEL	Linfócitos intraepiteliais

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO	12
II. OBJETIVOS	21
III. MATERIAIS E MÉTODOS	23
3.1 Animais	23
3.2 Antígenos	23
3.3 Anticorpos	23
3.4 Indução ativa de EAE em ratos Lewis	23
3.5 Avaliação da evolução clínica	24
3.6 Administração dos Antígenos derivados de micobactérias	24
3.7 Obtenção de células mononucleares de baço	25
3.8 Cultura de células mononucleares de baço.	25
3.9 Obtenção dos linfócitos T TCR $\gamma\delta$ da mucosa intestinal de ratos Lewis	26
3.10 Transferência adotiva de células	27
3.11 Depleção in vivo das células TCR $\gamma\delta$	27
3.12 Citometria de fluxo	28
3.13 Análise Estatística	28
IV. RESULTADOS	28

4.1 Quantificação de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ do baço de ratos Lewis, após a administração de antígenos derivados de Micobactérias	28
4.2 Efeito da administração in vivo de antígenos derivados de <u>Mycobacterium tuberculosis</u>, PPD e Peptídeo derivado de PPD na transformação blástica de linfócitos esplênicos de ratos Lewis	29
4.3 Efeito da depleção das células T $\gamma\delta$ na supressão da resposta proliferativa de ratos Lewis pré tratados com antígenos derivados de Micobactérias	30
4.4 Evolução clínica da EAE, de ratos Lewis, que foram pré-tratados com Antígenos derivados de Micobactérias	31
4.5 Efeito da transferência adotiva de células enriquecidas da população $\gamma\delta$, derivados da mucosa intestinal, na severidade da EAE	31
V. DISCUSSÃO	42
VI. CONCLUSÕES	49
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64

I. Introdução

A Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE) é um modelo de doença autoimune órgão-específica, do sistema nervoso central, mediada por linfócitos T CD4+. Manifesta-se clinicamente por uma paralisia ascendente das extremidades, caracteriza-se histologicamente por infiltração perivascular de células mononucleares no cérebro e medula, e imunologicamente pela presença de resposta celular e humoral a componentes da mielina (SWANBORG, 1995; JAVED *et al.* 1995).

A Encefalomielite Experimental Autoimune pode ser induzida em animais geneticamente susceptíveis, pela imunização com mielina ou seus componentes como a proteína básica de mielina (MBP), proteolipoproteína (PLP), peptídeos encefalitogênicos da MBP ou PLP ou ser transferida passivamente para animais normais por células T CD4+ específicas para MBP ou PLP (TUOHY *et al.* 1988).

A indução da Encefalomielite Experimental Autoimune é utilizada como modelo animal, que permite o estudo dos mecanismos patogênicos e reguladores da Esclerose Múltipla Humana (EM). A EM é uma doença caracterizada pela inflamação e desmielinização de múltiplas áreas do cérebro, que resulta clinicamente em disfunção neurológica, na forma de surtos e remissões, que podem progredir para incapacidade física (HAFLER & WEINER, 1989; VANDENBARK *et al.* 1996).

A EM acomete normalmente adultos jovens. Estudos imunológicos sugerem que as lesões da bainha de mielina são resultantes de processos autoimunes (WAKSMAN 1985). Como na maioria das doenças autoimunes de etiologia

desconhecida, não se sabe como a resposta imune aos antígenos próprios se inicia. Agressão por agentes infecciosos como vírus e bactérias, em indivíduos geneticamente predispostos ao desenvolvimento de doenças autoimunes, tem sido proposta por alguns autores (WUCHERPFENNIG *et al.* 1995).

Os mecanismos imunológicos envolvidos na EAE têm motivado uma série de pesquisa que visa encontrar a cura, ou pelo menos reduzir a severidade dos episódios de exacerbação. Acredita-se que os surtos da EM ou da EAE sejam resultado de deficiência da ação supressora do sistema imune sobre os clones de linfócitos autorreativos (AMOR *et al.* 1996; GREER *et al.* 1992; ZAMVIL *et al.* 1985; HOLOSHITZ *et al.* 1983; BEN-NUN & LANDO 1983).

Utiliza-se, normalmente, a imunossupressão global como medida terapêutica para controlar os efeitos indesejáveis das reações autoimunes. No entanto, devido aos importantes efeitos colaterais desses agentes sobre o organismo, mais e mais os autores estudam a possibilidade de empregar terapias específicas, que levariam a inativação seletiva, eliminação ou bloqueio funcional dos clones de linfócitos autorreativos causadores da doença.

Várias abordagens têm se mostrado efetivas na prevenção e tratamento da EAE, e algumas com aplicação potencial no tratamento da EM. Podemos citar a Imunoterapia com o IFN β , a indução de tolerância aos neuroantígenos e a manipulação dos receptores para o antígeno, no complexo trimolecular: TCR, peptídeo e complexo principal de histocompatibilidade.

O emprego de IFN β tem mostrado efeitos benéficos no tratamento da EAE e de pacientes com EM, com redução tanto da severidade como da frequência dos surtos. Os mecanismos pelos quais o IFN β exerce esses efeitos benéficos, no entanto, não estão totalmente esclarecidos. Acredita-se que estão associados à antagonização dos efeitos do IFN γ , incluindo a redução da expressão de moléculas MHC de classe II e de citocinas pró-inflamatórias produzidas pelos macrófagos ativados e linfócitos Th1 (RUULS *et al.* 1996; YASUDA *et al.* 1996).

A indução de tolerância a neuroantígenos, em particular a tolerância obtida pela administração oral de mielina e seus componentes MBP e PLP, tem se mostrado um meio efetivo de suprimir a EAE e ultimamente vem sendo sugerida como possível alternativa terapêutica para o tratamento de algumas doenças autoimunes, entre elas a EM (WEINER *et al.* 1994).

Na indução de tolerância oral, um grande número de estudos têm mostrado que um dos mecanismos primários associados a esta, é a geração de supressão ativa. O fator primário que determina a forma de tolerância, desenvolvida através da administração oral de antígenos é a dose do tolerógeno. Mostrou-se que baixas doses do tolerógeno induz a geração de supressão ativa ou regulação da célula T; altas doses de antígeno, no entanto, conduzem à anergia (MOWAT *et al.* 1982; FRIEDMAN *et al.* 1994). Assim, demonstrou-se que a administração oral de baixas doses de MBP levava à ativação de linfócitos T CD8⁺ (LIDER *et al.* 1989). MILLER *et al.* (1992) mostraram que na indução de tolerância oral, o tolerógeno estimula os linfócitos de maneira específica, mas a supressão observada é mediada pela liberação

de citocinas imunossupressoras não específicas, como o TGF β . CHEN *et al.* (1994) mostraram a produção de citocinas do tipo Th2 (IL-4, IL-10 e TGF β) por clones isolados de linfonodos mesentéricos de animais tratados oralmente com MBP. Mais recentemente, em trabalho realizado em nosso laboratório, OLIVEIRA (1997) mostrou que a administração oral de neuroantígeno, foi capaz de inibir a síntese de citocinas inflamatórias (IFN γ) produzidas pelos linfócitos Th1, não modificando, significativamente, as citocinas produzidas pelos clones Th2.

Em função do tipo de receptores para o antígeno (TCR) os linfócitos T podem ser divididos em duas grandes sub-populações: células que expressam receptores para o antígeno α e β , que constitui a maioria das células T e reconhece os peptídeos apresentados por moléculas do MHC, e as células que expressam os receptores para o antígeno γ e δ (HAAS *et al.* 1993; VOLTARELLI & LOUGHRAM 1994; OKRAGLY *et al.* 1995).

As células que expressam os receptores para o antígeno TCR α e β são as melhores estudadas com relação ao desenvolvimento de doenças autoimunes, como a EAE. Tanto a EAE como a EM são causadas por linfócitos T CD4 do tipo Th1 (KUCHROO *et al.* 1993), logo, a manipulação da interação do TCR, com os peptídeos derivados dos neuroantígenos e as moléculas do MHC tem sido feita, com o objetivo de inibir a apresentação do antígeno e consequentemente alterar a manifestação da doença. Foi demonstrado que animais tratados previamente com pequena quantidade de células autorreativas a neuroantígenos, quando imunizados com MBP/CFA apresentavam redução significativa da EAE. Esse procedimento foi denominado "T

cell vaccination” (BEN-NUN *et al.* 1981; BEN-NUN & COHEN 1982; HOLOSHITZ *et al.* 1983).

Trabalhos posteriores, baseados no mesmo princípio, demonstraram que a imunização com peptídeos derivados das moléculas de TCR dos clones encefalitogênicos contribui para proteger ratos Lewis contra o desenvolvimento da EAE. Foi demonstrado que clones autorreativos à MBP, utilizam preferencialmente os genes da família V β 8.2 e V α 2.3 (BURNS *et al.* 1989; BEN-NUN *et al.* 1991; BOURDETTE *et al.* 1994), sendo que a imunização com o peptídeo sintético TCR V β 8.2 (39-59) induz proteção contra EAE nos Ratos Lewis (VANDENBARK *et al.* 1989; OFFNER *et al.* 1991; STEVENS *et al.* 1992; CHOU *et al.* 1994). Os autores mostraram ainda que a imunização com o peptídeo sintético do TCR V β 8.2 (39-59) resultava tanto em aumento dos níveis de anticorpos (HASHIM *et al.* 1990), como na produção e liberação de fatores solúveis, que inibem a ativação dos clones encefalitogênicos (OFFNER *et al.* 1994). A administração de peptídeos sintéticos foi capaz de inibir os sintomas da EAE também em camundongos SJL (MARINI *et al.* 1996). Camundongos transgênicos que expressam o receptor TCR $\alpha\beta$ específico para MBP, apresentam doença rápida e muito severa. MARUSIC & TONEGAWA (1997) demonstraram que é possível obter proteção contra doença, induzindo tolerância com um peptídeo (p17) da molécula de MBP.

A administração de peptídeos sintéticos do TCR V β 5.2 (39-59) e o TCR V β 6.1 (39-59) em diferentes doses, também foi tentada, com fins terapêuticos, em pacientes portadores de Esclerose Múltipla (BOURDETTE *et al.* 1994; CHOU *et al.*

1994), os autores mostraram redução significativa da frequência destes clones autorreativos na circulação sanguínea dos doentes.

Com relação às células que expressam os receptores para o antígeno $\gamma\delta$, sabe-se que tanto os linfócitos T $\alpha\beta$ como os $\gamma\delta$ sofrem o processo de maturação no timo, sendo que as células T TCR $\gamma\delta$ são as primeiras a habitar esse órgão na ontogenia. No entanto, algumas células que expressam o receptor $\gamma\delta$ podem sofrer maturação extratímica expressando, normalmente, os marcadores Thy-1 e CD8 $\alpha\alpha$ (HAAS *et al.* 1993). Sabe-se também, que cada subpopulação migra preferencialmente para determinado tecido, em função da presença de proteínas de adesão, as quais são responsáveis pelas diferenças observadas nos padrões de migração. Nos tecidos linfóides (de humanos e murinos) a proporção de células T $\gamma\delta$ é bastante diminuída; mas estão localizadas em abundância nas mucosas; compondo o chamado “Sistema Imune das Mucosas”.

O grupo de células T que expressa os receptores TCR $\gamma\delta$ vem sendo atualmente alvo de extensas investigações, no entanto, a função dessa população celular não está completamente esclarecida. Sabe-se que elas têm um papel protetor nas doenças infecciosas, sugerindo que pelo menos uma fração significativa de células T $\gamma\delta$ represente a primeira linha de defesa do hospedeiro contra diversos patógenos (KABELITZ *et al.* 1990; KABELITZ *et al.* 1994; PFEFFER *et al.* 1990; O'BRIEN *et al.* 1989; OKRAGLY *et al.* 1995). Camundongos infectados com *Escherichia coli*, *Plasmodium*, *Chlamydia trachomatis*, *Influenza*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* apresentaram aumento da população de linfócitos T $\gamma\delta$ (KRONENBERG, 1994; VAN

DER HEYDE *et al.* 1993). No homem, o aumento da população de linfócitos $\gamma\delta$ foi descrito em associação com *Leishmaniose*, *Salmonelose*, *Brucelose* e *Tuberculose* (KRONENBERG *et al.* 1994). Recentes evidências mostram que IL-15 derivada de macrófagos infectados contribue para a ativação das células T $\gamma\delta$ durante a infecção bacteriana com *Salmonella* (NISHIMURA *et al.* 1996). Também foi observado que células T $\gamma\delta$ têm um papel crucial na expressão de hsp 65 essencial para a imunidade protetiva a *T. gondii*, na fase inicial da infecção (HISAEDA *et al.* 1996).

A interação de células T TCR $\gamma\delta$ com outras células do sistema imune e a sua importância para a modulação da resposta imune vem sendo estudada por diversos autores (FUJIIHASHI *et al.* 1992; PTAK & ASKENASE 1992; KAUFMANN *et al.* 1993; Mc MENAMIN *et al.* 1994).

PTAK & ASKENASE (1992) observaram que as células T $\alpha\beta$ necessitam da colaboração das células T $\gamma\delta$ para transferir hipersensibilidade de contato. KAUFMANN *et al.* (1993) mostraram um aumento na ativação das células TCR $\alpha\beta$ após o tratamento *in vivo* com o anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma\delta$ sugerindo importante ação moduladora dos linfócitos T $\gamma\delta$ sobre os linfócitos T $\alpha\beta$. FU *et al.* (1994) reportaram que as células T $\gamma\delta$ contribuem para proteger tanto na infecção primária quanto na secundária com *L. monocitogenes* sugerindo, deste modo, que células T $\gamma\delta$ podem diferir funcionalmente no transcurso das doenças; mostrou também que estas células atuam na imunomodulação da inflamação no sentido de prevenir dano excessivo ao fígado durante a resposta imune a *Listeria monocitogenes*.

O envolvimento das células T $\gamma\delta$ na patogenia de doenças autoimunes tem sido proposto, principalmente no caso daquelas que possuem um componente inflamatório crônico, como é o caso de Artrite Reumatóide e da Esclerose Múltipla (ROAK *et al.* 1996; FREEDMAN *et al.* 1991). No entanto, acredita-se que tal envolvimento seja restrito a certos fenótipos de células T $\gamma\delta$ (PETERMAN *et al.* 1993). Particularmente no caso da EM, a presença de linfócitos TCR $\gamma\delta$ ao redor dos oligodendrócitos, em pacientes com a doença ativa foi detectada; assim como um número aumentado de células T $\gamma\delta$ foi reportado no líquido céfalo-raquidiano de pacientes portadores de EM (SELMAJ *et al.* 1991; NICK *et al.* 1995). WUCHERPFENNING *et al.* (1992) mostraram que no SNC essas células são predominantemente TCR V δ 1 ou TCR V δ 2.

Quanto à apresentação do antígeno aos linfócitos T TCR $\gamma\delta$, a literatura encontra-se dividida. Alguns autores mostraram que essa população celular pode reconhecer o antígeno sem a participação das moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (BOISMENU & HAVRAM, 1997). Outros autores, no entanto, acreditam que a exemplo da população $\alpha\beta$, os antígenos são apresentados em associação com as moléculas do MHC. Há concordância, no entanto, sobre a forte reatividade das células T $\gamma\delta$ aos antígenos derivados das micobactérias.

Foi demonstrado que células T TCR $\gamma\delta$ do timo de murinos neonatos, respondiam a antígenos derivados de micobactérias. A literatura mostra que hibridomas $\gamma\delta$ eram ativados, liberando níveis elevados de IL-2, quando estimulados com PPD. Este mesmo grupo de pesquisadores mostrou que a ativação dos hibridomas $\gamma\delta$ era devida a presença da hsp 60 e hsp 65 componentes da molécula de PPD

(O'BRIEN *et al.* 1989). A utilização de peptídeos sintéticos correspondentes a diferentes porções de hsp 65, que têm a capacidade de estimular células $\gamma\delta$, foi descrito por BORN *et al.* (1990). Os autores utilizaram peptídeos antigênicos da sequência de aminoácidos 180-196 correspondente a hsp 65 de *Mycobacterium leprae* que era comum à *Mycobacterium tuberculosis* e *Mycobacterium bovis*, observando forte reatividade dos hibridomas $\gamma\delta$ (BNT- 19.8.7 e BNT- 9.12.18), reforçando a idéia que estas células podem especificamente reconhecer peptídeos sintéticos, derivados das moléculas dos antígenos de micobactéria.

No modelo da EAE, a indução da doença tanto em ratos como em camundongos é dependente da presença de adjuvantes na emulsão imunizante. O *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) é rotineiramente utilizado como agente imunopotenciador na indução da EAE. Por outro lado, há evidências demonstrando que a pré-exposição de animais (ratos e camundongos) ao adjuvante completo ou à Mt induz resistência ao desenvolvimento da EAE, mesmo quando a micobactéria é inoculada em solução aquosa (HEMPEL *et al.* 1985). Estas observações mostraram que Mt não só promove a indução da doença, como também protege o indivíduo contra o desenvolvimento da mesma.

BEN-NUN *et al.* (1993) observaram que a pré-exposição de camundongos à toxina de *B. pertussis* e derivado purificado de proteína de *M. tuberculosis* confere proteção completa a EAE. O mesmo grupo de autores, demonstrou que camundongos inoculados com um fragmento de 12 kDa, derivado da molécula de PPD, desenvolvia resistência a EAE. Os autores afastam a possibilidade de ser indução de tolerância, uma vez que esse peptídeo não apresenta sequência em comum com os epítomos

encefalitogênicos da molécula de MBP.

A possibilidade de as células T $\gamma\delta$ atuarem como células supressoras nos mecanismos de autoimunidade começa a ser aventada. No modelo da EAE, KOBAYASHI *et al* (1997) mostraram o agravamento da doença pela administração *in vivo* de anticorpo monoclonal anti-células T $\gamma\delta$. Os autores mostraram associação entre o aumento da severidade da doença e os níveis de IFN γ , citocina implicada na gênese da EAE.

Em trabalho recentemente realizado em nosso laboratório, DOMENICI (1997) concorda com esses autores, mostrando que a depleção *in vivo* de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ de camundongos SJL, leva a aumento da severidade da EAE. A resposta proliferativa de linfócitos estimulados com a MBP, assim como os níveis de anticorpos dirigidos para este neuroantígeno, também estavam elevados após a depleção *in vitro* da população celular $\gamma\delta$. A autora mostra ainda, aumento dos níveis de TNF α e redução significativa de TGF β após a depleção da população de células T $\gamma\delta$. Estes dados sugerem importante função supressora das células TCR $\gamma\delta$ no modelo de EAE.

Diante das evidências da possível função supressora das células T $\gamma\delta$ no modelo da EAE, aliada às observações da forte reatividade dessas células aos antígenos derivados de micobactéria, no presente trabalho pretendemos verificar se a redução da severidade da EAE, observada pela prévia exposição aos agentes derivados de micobactérias, se deve à ativação da função supressora das células T $\gamma\delta$.

II. Objetivos

Este trabalho tem por objetivo verificar em que medida a ativação dos linfócitos T $\gamma\delta$ por antígenos derivados de *Mycobacterium tuberculosis*, modula a severidade da EAE.

III. Materiais e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Lewis, fêmeas de 8 semanas de idade, obtidos do laboratório Harlan-Sprague Dawley USA e mantidos durante a fase de experimentação no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia sob condições convencionais.

3.2 Antígenos

Foi utilizado Proteína Básica de Mielina purificada do cérebro do cobaia segundo o método de DEIBLER *et al.* (1972); os níveis de proteína das amostras foram dosadas pelo método de LOWRY *et al.* (1951), com algumas modificações.

3.3 Anticorpos

Anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ de rato clone (V 65) foi gentilmente cedido pelo Dr. AHMAD AL-SABBAGH (BioGen, Cambridge-USA).

3.4 Indução ativa de EAE em ratos Lewis

Os animais (pelo menos 6 por grupo) foram imunizados com GP-MBP

(50µg/animal) em adjuvante completo de Freund, via subcutânea, nas patas posteriores.

3.5 Avaliação da evolução clínica

Os ratos foram observados diariamente iniciando 9 dias após imunização com GP-MBP + CFA, para os sinais clínicos da EAE. A avaliação da evolução dos sintomas foi feita da seguinte forma:

grau 0 $\Rightarrow$ não doente

grau 1 $\Rightarrow$ perda de tonus da cauda

grau 2 $\Rightarrow$ fraqueza parcial dos membros posteriores

grau 3 $\Rightarrow$ paralisia severa dos membros posteriores

grau 4 $\Rightarrow$ paralisia severa dos membros anteriores e posteriores

grau 5 $\Rightarrow$ morte.

3.6 Administração dos antígenos derivados de micobactérias

Os animais (pelo menos 6 por grupo) foram imunizados, via subcutânea, com 100µg/animal de Mt, 50µg/animal de PPD ou 50µg/animal de peptídeo de PPD 180-196 (TFGLQLELTEGMRFDKG-NH₂) PS9603-D sintetizado pelo Depto. de

Biofísica da Universidade Federal de São Paulo (Escola Paulista de Medicina), emulsificado em igual volume de Adjuvante Incompleto de Freund. Cada animal recebeu 0.2 ml da emulsão e o grupo controle recebeu apenas o adjuvante.

3.7 Obtenção de células mononucleares de baço

Baço dos animais imunizados 20 dias após imunização, foi removido assepticamente e colocados em placas de Petri estéreis, contendo meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, USA). As células foram liberadas cuidadosamente, utilizando pequenas peneiras estéreis. As células isoladas foram colocadas em tubos de ensaio estéreis e lavadas por 3 vezes com solução salina de Hank's e centrifugadas por 10 minutos, a 1500 rpm. No caso das células do baço, após a primeira centrifugação o botão celular foi tratado com tampão de lise com o objetivo de eliminar as hemácias. A suspensão celular foi lavada por 3 vezes com solução de Hank's e ressuspensa em meio RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino a 5% (Microbiológica-RJ) e 4,25 mg/ml de gentamicina. Para determinar a viabilidade celular usou-se o método de exclusão do corante Azul Trypan.

3.8 Cultura de células mononucleares de baço.

Células de baço, obtidas de acordo com o item anterior, foram ajustadas para $1-2 \times 10^5$ céls/poço e colocados em placas para cultura de células de 96 poços (Costar MA-USA). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 (Sigma Co, USA) enriquecido com soro fetal bovino 5% (Microbiológica-RJ) e 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina 0,2M e 2-Mercaptoetanol a 1:5000. O ensaio foi realizado em triplicata. Avaliou-se a transformação blástica de linfócitos estimulados

com Con A, usando diferentes concentrações do mitógeno (1,25µg/ml; 2,5µg/ml e 5µg/ml). As células foram incubadas por 48 horas com o mitógeno, em incubadora contendo tensão constante de 5% de CO₂, a 37° C. Aproximadamente 18 horas antes do término do período de incubação, cada poço recebeu 1 µCi de timidina tritiada (New England Nuclear Ma,USA). Após este período, o excesso de material radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor (Cell Harvester - modelo 200 A- Cambridge Technology, Inc). As células livres de excesso radioativo foram depositadas em papel de fibra de vidro (Cambridge Tech, USA) e embebidas em 2 ml de líquido de Cintilação. O conteúdo radioativo foi determinado em Cintilador beta (Beckman- Liquid Scintillation System, USA). Os resultados foram expressos em contagem por minuto (cpm), sendo considerada a média das triplicatas.

3.9 Obtenção dos linfócitos T TCR γδ da mucosa intestinal de ratos Lewis

Para obtenção de linfócitos intraepiteliais (IEL) da mucosa intestinal de rato Lewis, o animal foi sacrificado, retirou-se o intestino delgado, colocando-o em placa de Petri contendo meio de Hank's. O intestino foi cortado em pedaços de 2 cm, e lavado exaustivamente com Hank's contendo antibiótico, com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Após retirar-se as placas de Peyer, os pedaços de intestino foram abertos longitudinalmente e removeu-se o excesso de muco interno. Com ajuda de um êmbolo foram macerados sobre uma peneira apropriada para soltar as células. Nesta etapa, verificou-se a presença dos linfócitos ao microscópio. Após este processo a suspensão de células foi filtrada em um funil forrado com uma fina capa de lã de vidro, com a finalidade de reter o muco, e as células foram centrifugadas por 20 minutos a 1500

rpm sobre gradiente de Percoll (43%). A nuvem celular foi retirada e ressuspensa em meio RPMI enriquecido com 5% de SBF e 4,25 mg/ml de gentamicina. A concentração celular foi ajustada para 10^7 cél/ml. A porcentagem de células $\gamma\delta$ presentes nessa preparação foi determinada por análise de citometria de fluxo (descrito no item 3.12). As preparações celulares continham cerca de 53,5% de linfócitos T TCR $\gamma\delta$.

3.10 Transferência adotiva de células

Para o ensaio da transferência adotiva de células, cada um dos ratos recipientes recebeu 1 ml/animal de linfócitos intraepiteliais de rato Lewis normal, a uma concentração de 10^7 cél/ml via intraperitoneal, em 3 doses, com intervalo de 1 dia e 24 horas depois da última dose foram imunizados com GP-MBP + CFA (50 μ g/animal) via subcutânea, nas patas posteriores. Os animais controles foram imunizados com a mesma dose de antígeno.

3.11 Depleção in vivo das células TCR $\gamma\delta$

A depleção *in vivo* das células T TCR $\gamma\delta$ foi realizada de acordo com o método descrito por CARDILLO *et al.* (1993). Cada animal recebeu três doses contendo 500 μ g. de anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ em 0,25 ml de PBS, administradas por via intraperitoneal, em dias alternados 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.

3.12 Citometria de fluxo

Citometria de fluxo foi utilizada para a fenotipagem dos Linfócitos intraepiteliais (IEL), para controle da depleção *in vivo* e ação dos antígenos derivados de Mt. A suspensão celular das células esplênicas obtida como descrito (item 3.7), foi ajustada para a concentração de 4×10^6 cél/ml. Para a coloração, 500 µl destas células foram colocados em cada frasco eppendorf, ao qual se adicionou 5 µl do respectivo anticorpo marcado, no caso anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma\delta$ de rato marcado com FITC ou IgG de hamster marcado com FITC (controle); uma das amostras não recebeu anticorpo algum sendo o controle (absoluto). As amostras foram incubadas por 40 minutos em banho de gelo. Após o período de incubação, centrifugaram-se os tubos em microcentrífuga por 10 minutos a 1500 rpm. Cada botão celular foi lavado por três vezes com solução salina de Hank's centrifugando-se por 10 minutos a 1500 rpm em cada lavagem, logo após, os botões celulares foram ressuspensos em 1 ml de formalina 10% e as amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Orthocitorom-Johnson & Johnson) no laboratório de AIDS do Hospital das Clínicas da UNICAMP.

3.13 Análise Estatística

As amostras com distribuição paramétrica foram analisadas com o teste "t" de Student. Para analisar as amostras não paramétricas utilizou-se o teste de Wilcoxon.

IV. Resultados

4.1 Quantificação de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ do baço de ratos Lewis, após a administração de antígenos derivados de Micobactérias

No sentido de verificar se a administração de Mt , PPD e peptídeo de PPD estimula a população de linfócitos T TCR $\gamma\delta$, quantificamos essa população celular antes e após a administração *in vivo* da Mt., PPD e peptídeo de PPD. A análise foi realizada por citometria de fluxo, 20 dias após o tratamento. Na tabela I e figura 1 (a) mostramos que a administração de Mt levou a significativo aumento ($p = 0,007$) da população de células T $\gamma\delta$, quando se comparou com o grupo de animais controle que recebeu apenas IFA. O aumento significativo da população de células T $\gamma\delta$ também foi observado no grupo de animais tratados com PPD ($p < 0,001$) tabela II e figura 1 (b) e peptídeos de PPD ($p < 0,001$) tabela III e figura 1.(c) Observamos ainda que o Mt induziu aumento superior que os antígenos derivados de PPD ou peptídeo de PPD. Para cada grupo de experimento foram utilizados 6 animais.

4.2 Efeito da administração in vivo de antígenos derivados de Mycobacterium tuberculosis, PPD e Peptídeo derivado de PPD na transformação blástica de linfócitos esplênicos de ratos Lewis

A transformação blástica de linfócitos estimulados com Con A é um método clássico de avaliação da imunidade celular. No sentido de verificar o efeito da

administração de antígenos micobacterianos sobre a resposta imune celular, nas tabelas IV, V e VI figuras 2, 3 e 4 mostramos os resultados da estimulação de linfócitos de ratos Lewis previamente sensibilizados com Mt, PPD e peptídeo de PPD. Nossos dados mostram que a administração de 100 ug de Mt, 50 ug de PPD e 50 ug de peptídeo de PPD respectivamente leva a redução significativa da resposta proliferativa de linfócitos ($p < 0.01$) quando comparada com o grupo controle. A supressão foi mais acentuada (52%) quando se administrou Mt (fig. 2). As preparações mais purificadas do antígeno (PPD e o Peptídeo de PPD) suprimiram de forma menos acentuada a transformação blástica dos linfócitos (25%) figuras (3 e 4). As médias de 6 experimentos foram apresentadas apenas para facilitar a leitura, não sendo utilizadas na análise estatística com o teste de Wilcoxon.

4.3 Efeito da depleção das células T $\gamma\delta$ na supressão da resposta proliferativa de ratos Lewis pré tratados com antígenos derivados de Micobactérias

Com a finalidade de mostrar que a supressão da resposta proliferativa à Con A pelos antígenos micobacterianos, está associada à estimulação de células T $\gamma\delta$, nesse grupo de experimentos, os animais foram depletados (item 3.11) *in vivo* das células T $\gamma\delta$ e posteriormente tratados com Mt e PPD. Nas tabelas VII, VIII e IX e figura 5, mostramos que após a depleção *in vivo* das células T $\gamma\delta$, a supressão da resposta proliferativa de linfócitos de animais tratados com Mt (1) ; PPD (3) e Peptídeo de PPD (5) foi totalmente revertida. A figura 5A do apêndice, mostra que a administração *in vivo* de anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma\delta$ efetivamente depleta a população de

células T $\gamma\delta$ uma vez que a porcentagem inicial de 5,2% e passou a ser de 0,7% após a depleção.

4.4 Evolução clínica da EAE, de ratos Lewis, que foram pré-tratados com Antígenos derivados de Micobactérias

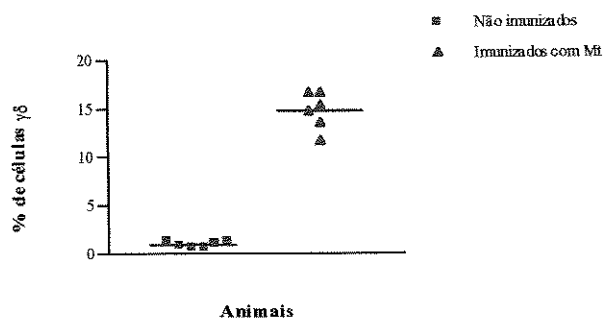
Este grupo de experimentos foi conduzido no sentido de verificar se a supressão da resposta imune celular que observamos com a administração de antígenos derivados de micobactérias, modula a severidade da EAE. As tabelas X, XI, XII e figuras 6, 7 e 8 mostram a evolução clínica da EAE. Os animais que receberam *in vivo* Mt.(fig.6), PPD (fig.7) e peptídeo de PPD (fig.8) apresentaram um retardo no início da doença, sendo que a mesma se mostrou clinicamente menos severa, quando comparada com os animais controles. As figuras 6, 7 e 8 claramente mostram que o grupo de animais que recebeu Mt, PPD e Peptídeo de PPD *in vivo* teve o início da doença retardado em comparação ao grupo que somente foi imunizado com GP-MBP ou que recebeu o adjuvante incompleto. Para avaliação dos resultados, utilizamos os valores de Score Clínico Médio (S.C.M.), que representa a média diária do score clínico de cada grupo (5 por experimento) de animais

4.5 Efeito da transferência adotiva de células enriquecidas da população $\gamma\delta$, derivados da mucosa intestinal, na severidade da EAE

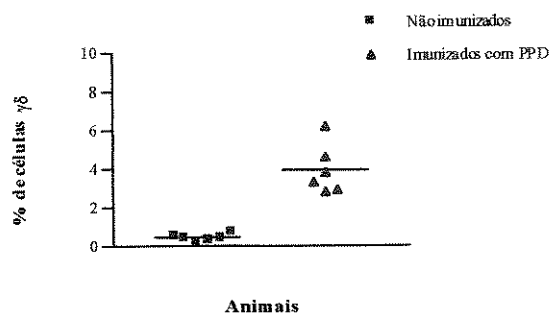
Este grupo de experimentos foi conduzido no sentido de avaliar o efeito da

população de células T TCR $\gamma\delta$, na modulação da severidade da EAE. Sabe-se que a população de células T TCR $\gamma\delta$ está localizada na epiderme e epitélio intestinal (POUSSIER & JULIUS, 1994; ROSAT *et al.* 1993). BARRET *et al.* (1992) mostraram que 87% dos IEL eram TCR $\gamma\delta$ + CD8 $\alpha\alpha$. A figura 10, no apêndice, mostra que a porcentagem de células T TCR $\gamma\delta$ existente na preparação das células derivadas da mucosa intestinal é de 53,5%. Na tabela XV e figura 9, mostramos que ratos Lewis que receberam população de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ adotivamente, tiveram a severidade da EAE reduzida de forma significativa. Houve discreto retardo no aparecimento da doença e efetiva redução da severidade da mesma quando comparado com o grupo controle (Média do Máximo Score Clínico 1,6 para o grupo tratado e 3,3 para o grupo controle).

(a)



(b)



(c)

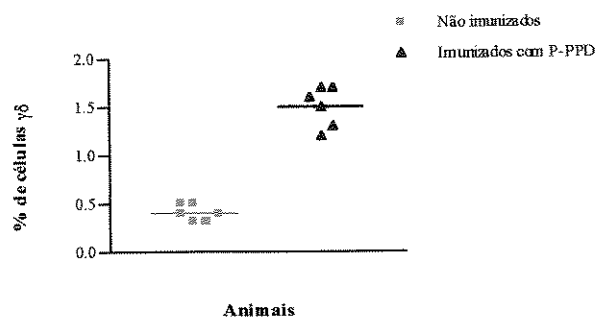


FIGURA 1. Porcentagem de células T TCR $\gamma\delta$ dos ratos Lewis (6 animais/ grupo) estimulados com Mt (100 μ g/animal)(a), PPD (50 μ g/animal)(b) e Peptídeo de PPD (50 μ g/animal)(c), comparados com o grupo controle.

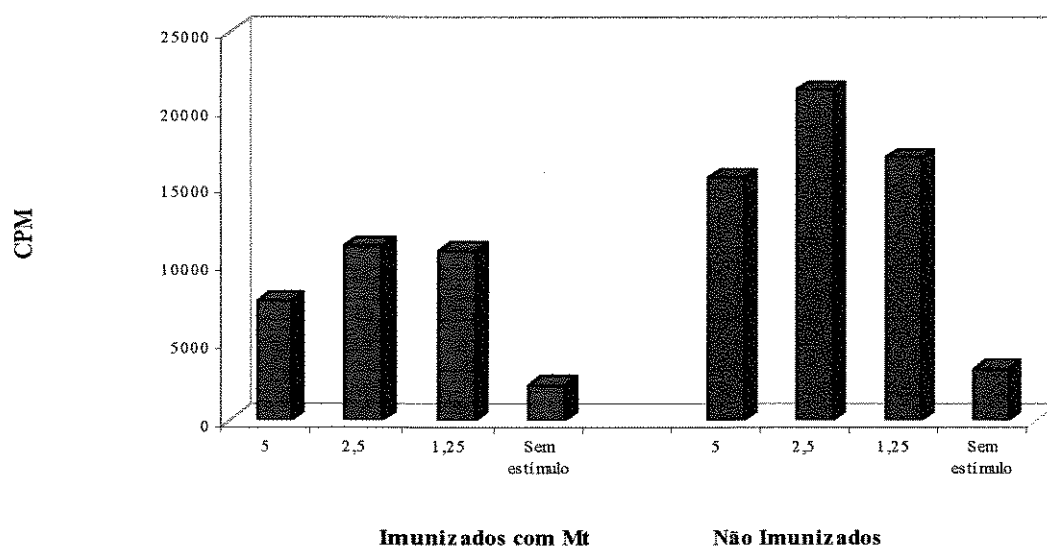


FIGURA 2. Resposta proliferativa a Con A ($\mu\text{g/ml}$) de linfócitos esplênicos de ratos Lewis (6 animais/grupo) após 20 dias a imunização com 100 μg de Mt, comparado com o grupo controle.

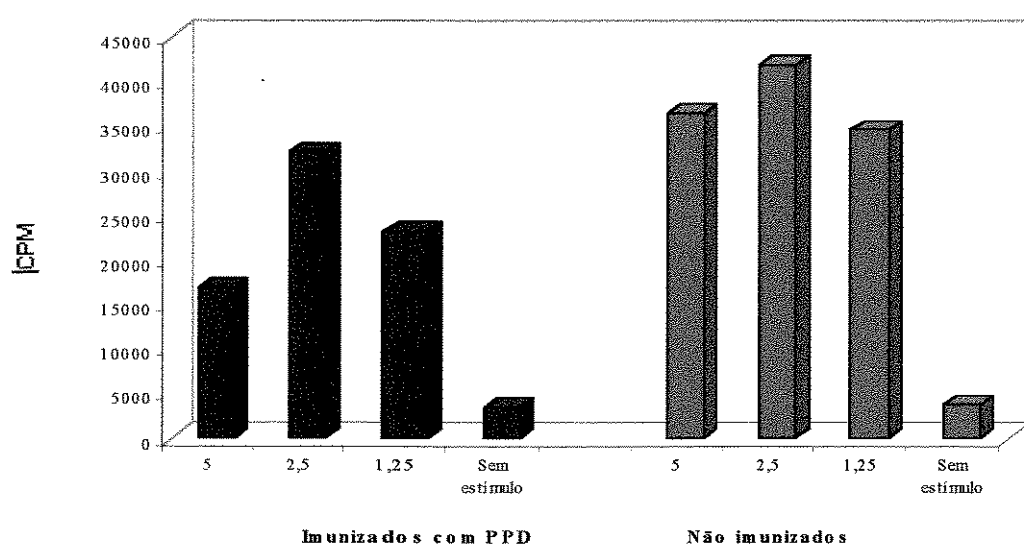


FIGURA 3. Resposta proliferativa a Con A ($\mu\text{g/ml}$) de linfócitos esplênicos de ratos Lewis (6 animais/grupo), após 20 dias a imunização com 50 μg de PPD, comparado com o grupo controle.

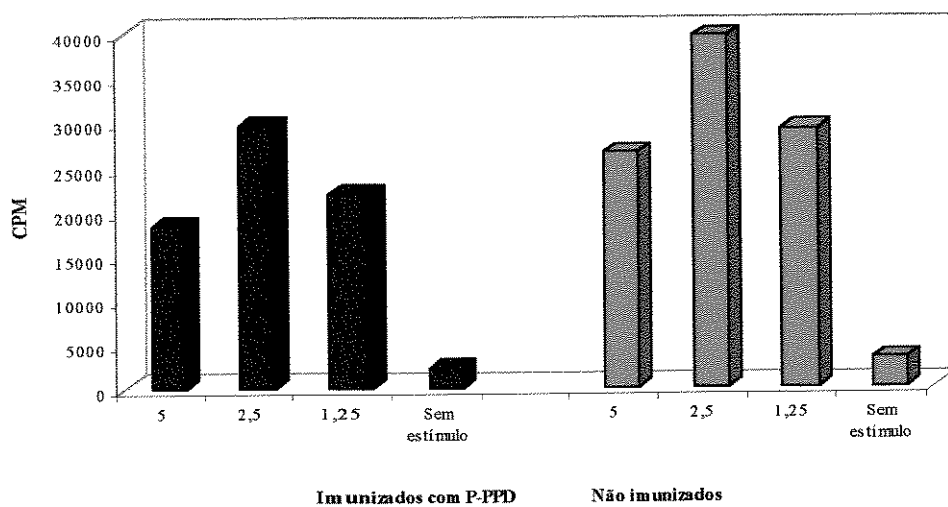


FIGURA 4. Resposta proliferativa a Con A ($\mu\text{g/ml}$) de linfócitos esplênicos de ratos Lewis (6 animais/grupo) após 20 dias a imunização com 50 μg de Peptídeo de PPD, comparado ao grupo controle.

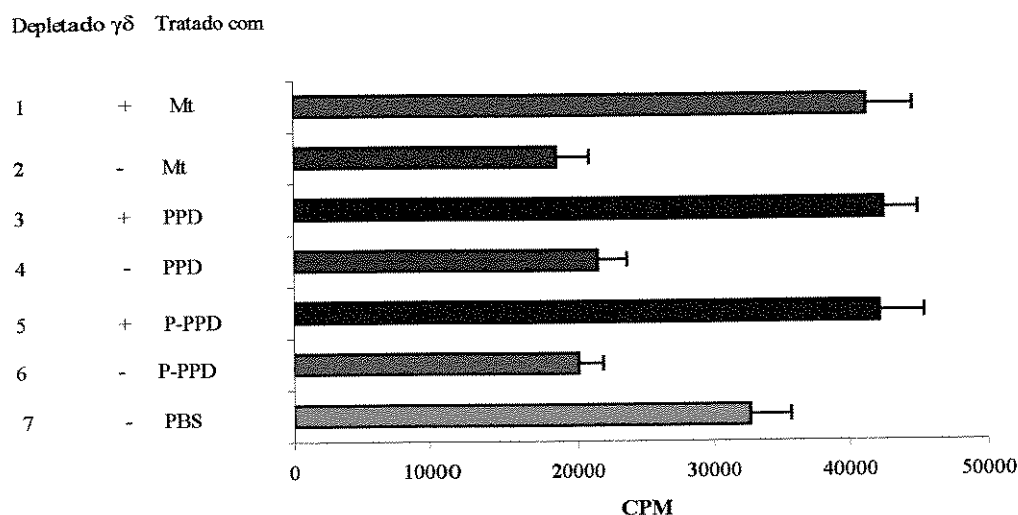


Figura 5. Resposta proliferativa a Con A: Células esplênicas de ratos Lewis que foram depletados das células T $\gamma\delta$ e 24 horas depois imunizados com Mt (100 μ g/ml), PPD (50 μ g/ml) e Peptídeo de PPD (50 μ g/ml) (1, 3 e 5), comparado com células esplênicas de ratos Lewis somente imunizados com Mt (100 μ g/ml), PPD (50 μ g/ml) e Peptídeo de PPD (50 μ g/ml) (2, 4 e 6) e o grupo que apenas recebeu PBS (grupo controle).

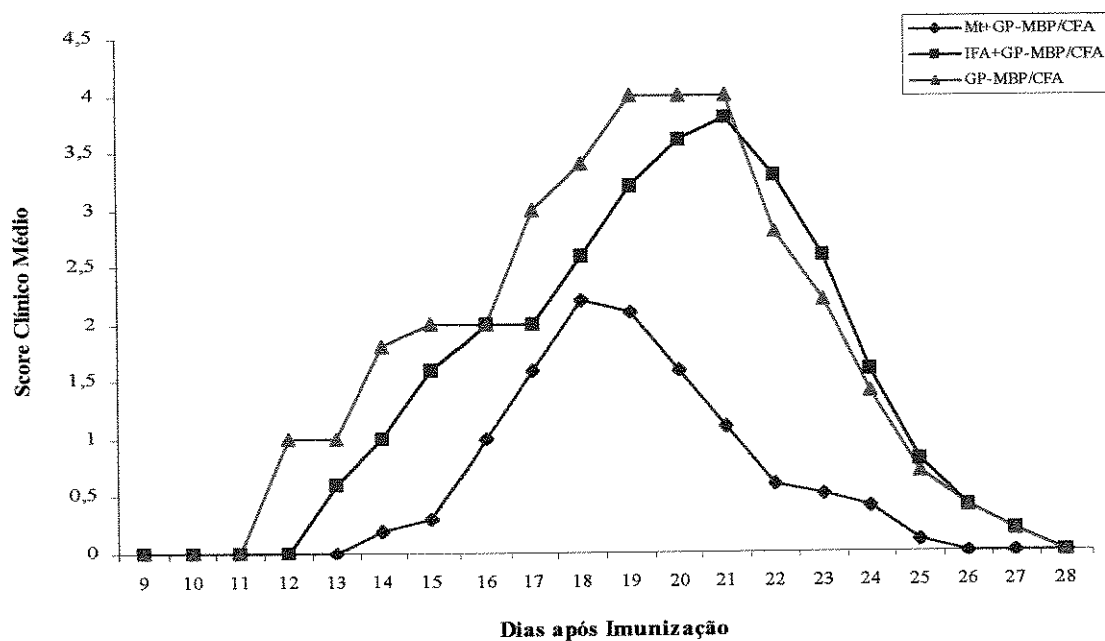


FIGURA 6. EAE (Score Clínico Médio) induzida em ratos Lewis (5 animais /grupo) 20 dias após tratamento com Mt e IFA, e imunizados com GP-MBP/CFA, comparado com o grupo controle (imunizados apenas com GP-MBP/CFA).

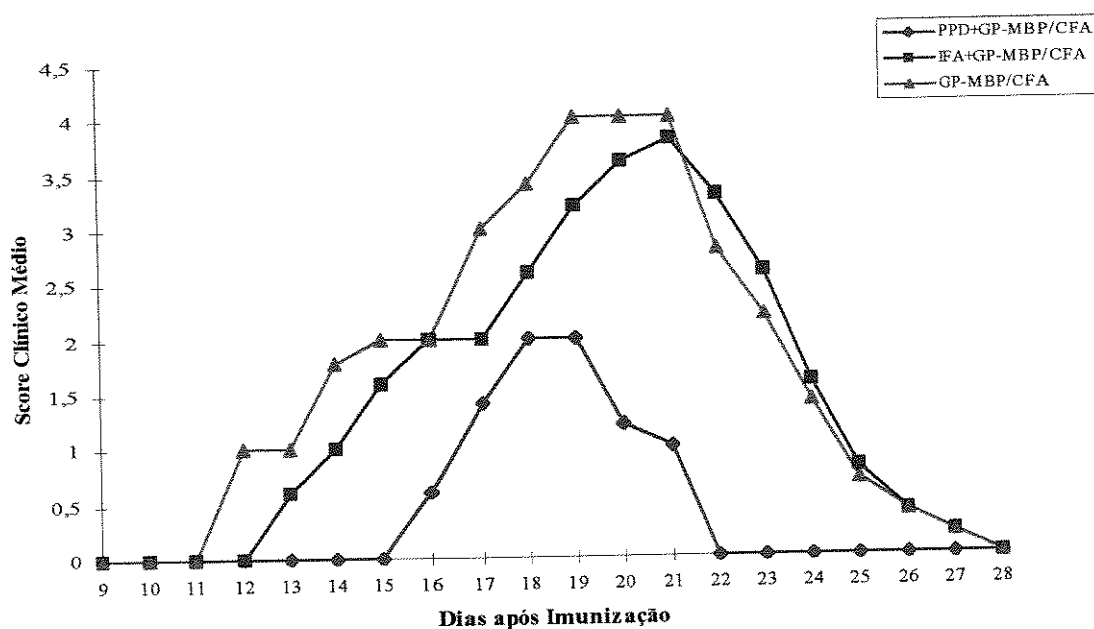


FIGURA 7. EAE (Score Clínico Médio) induzida em ratos Lewis (5 animais /grupo) 20 dias após tratamento com PPD e IFA, e imunizados com GP-MBP/CFA, comparado com o grupo controle (imunizados apenas com GP-MBP/CFA).

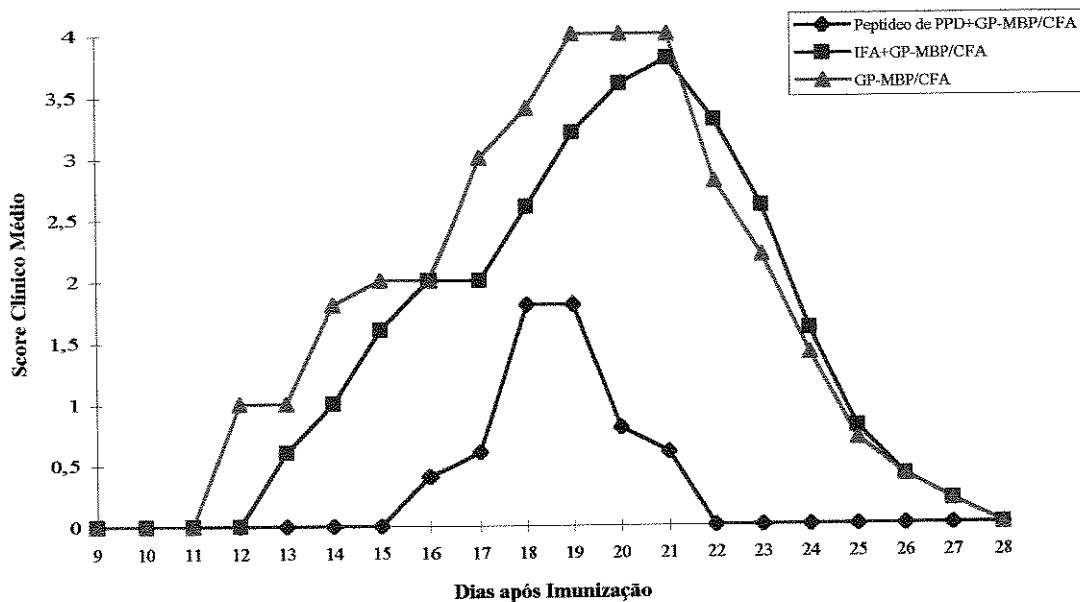


FIGURA 8. EAE (Score Clínico Médio) induzida em ratos Lewis (5 animais /grupo) 20 dias após tratamento com P-PPD e IFA, e imunizados com GP-MBP/CFA, comparado com o grupo controle (imunizados apenas com GP-MBP/CFA).

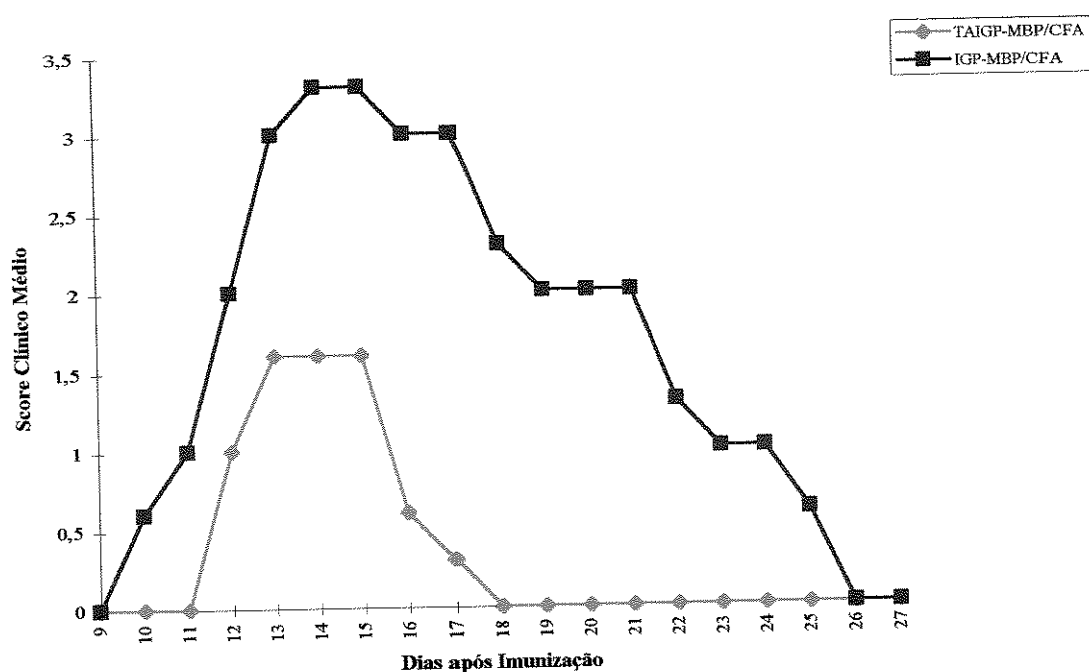


FIGURA 9. EAE (Score Clínico Médio) induzida em ratos Lewis (3 animais /grupo) que receberam transferência adotiva de células T TCR $\gamma\delta$ 24 horas antes da imunização com o neuroantígeno (GP-MBP/CFA), comparada com o grupo controle (sem tratamento prévio).

V. Discussão

O presente trabalho teve como objetivo estudar o envolvimento das células que expressam os receptores para o antígeno TCR $\gamma\delta$, na modulação da severidade da EAE. Pretendeu-se estabelecer relação entre a imunossupressão observada pela administração de antígenos derivados de micobactérias, a ativação da população de linfócitos TCR $\gamma\delta$ e a redução da severidade da EAE.

A análise citométrica de células esplênicas de ratos Lewis que receberam Mt., PPD e peptídeo de PPD *in vivo* mostrou significativo aumento da população de linfócitos TCR $\gamma\delta$, em relação ao grupo não tratado. O grupo de animais tratados com Mt mostrou um aumento da população de células T $\gamma\delta$ mais acentuado do que os animais que receberam o antígeno na forma purificada ou o peptídeo de PPD. Este aumento na população T TCR $\gamma\delta$ pelo estímulo com Mt, se deve provavelmente à complexidade do antígeno, que apresenta maior quantidade de epitopos estimuladores da célula T $\gamma\delta$. Estas observações estão de acordo com vários outros grupos que mostraram, previamente, a forte reatividade das células T $\gamma\delta$, tanto de murinos como humanos, aos antígenos derivados das micobactérias. Utilizando hibridomas de células T $\gamma\delta$, os autores foram capazes de demonstrar a liberação de IL-2, ou seja, a ativação destes clones, na presença de algumas *heat shock protein* (hsp), da molécula de PPD ou peptídeos com a sequência de aminoácidos 181-197 e 180-196 da hsp de micobactéria (O'BRIEN *et al.* 1989; BORN *et al.* 1990).

A observação de que as células T TCR $\gamma\delta$ respondem aos antígenos derivados de micobactérias é válida também para células humanas. No homem, a população de células T $\gamma\delta$ constitui aproximadamente 5% das células do sangue periférico. A forte reatividade das células T $\gamma\delta$ humana aos antígenos derivados de Mt foi descrita por PANCHAMOORTHY *et al.* (1991) e UETA *et al.* (1994). UETA *et al.* (1994) observaram aumento significativo da população de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ (CD4+ V δ 2) após a estimulação de linfócitos de indivíduos normais com PPD *in vitro*. Embora haja controvérsias sobre a forma como os antígenos são apresentados às células T $\gamma\delta$, as evidências mostram que essa população celular tem condições de reconhecer o estímulo antigênico das micobactérias.

O próximo passo foi verificar o efeito dos antígenos micobacterianos sobre a resposta imune celular dos ratos Lewis. A ativação ou transformação linfocitária, refere-se a um processo *in vitro* que se correlaciona ao processo que regularmente ocorre quando linfócitos de indivíduos especificamente sensibilizados, interagem com o antígeno. Por medir a capacidade funcional dos linfócitos proliferarem a um estímulo antigênico ou mitogênico, reflete melhor a imunocompetência do que a simples fenotipagem das subpopulações de linfócitos (MUSATTI *et al.* 1976). É a técnica que vem, portanto, sendo utilizada há décadas para avaliar a imunidade celular dos indivíduos. Fomos capazes de demonstrar que a administração de Mt, PPD e peptídeo de PPD *in vivo* aos ratos Lewis, levou a significativa redução da resposta proliferativa de linfócitos estimulados por Con A. Em outras palavras, a administração de Mt, PPD e peptídeo de PPD *in vivo* suprime a resposta imune celular dos animais normais.

O dano tecidual observado na infecção pelo Mt é devido a reações de hipersensibilidade tardia, reação caracterizada pela resposta de tipo celular. Linfócitos sensibilizados produzem diferentes tipos de citocinas que tentam destruir as células infectadas. Por outro lado, macrófagos ativados pelas citocinas resultantes da interação antígeno-linfócitos sensibilizados podem liberar enzimas capazes de lesar os tecidos adjacentes ao local da reação. Embora a infecção com Mt resulte em uma reação de hipersensibilidade local, a supressão da resposta imune sistêmica tem sido descrita nos indivíduos infectados. Vários mecanismos responsáveis pela imunossupressão foram demonstrados como: aumento da atividade supressora de macrófagos em indivíduos infectados (FUJIWARA *et al.* 1986), supressão da resposta proliferativa dos linfócitos, principalmente nos indivíduos com a tuberculose avançada (MORENO *et al.* 1988 ; CASTRO, 1997), redução dos níveis de citocinas pró-inflamatórias como IFN γ com aumento de citocinas com atividade imunossupressora como TGF β (CASTRO, 1997). Vários autores têm associado a liberação de TGF β com a imunossupressão observada nos indivíduos infectados com Mt (ELLNER *et al.* 1991; CHAMPSI *et al.* 1995; TOOSSI *et al.* 1995; CASTRO, 1997). No presente trabalho, apresentamos evidências de que a ativação da função supressora das células T $\gamma\delta$ pelos antígenos derivados de micobactérias é mais um mecanismo pelo qual esses antígenos podem levar a depressão imunológica do indivíduo. Fomos capazes de demonstrar que a depleção *in vivo* das células T $\gamma\delta$ reverte a supressão da resposta proliferativa dos linfócitos, obtida pelo estímulo dos antígenos micobacterianos.

Nossos dados estão em concordância com as observações de vários autores que apresentam evidências sobre o possível papel supressor das células T $\gamma\delta$ em diferentes modelos experimentais. KAUFMANN *et al.* (1993) mostraram aumento na ativação das células TCR $\alpha\beta$ após a depleção *in vivo* com anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma\delta$, sugerindo uma importante ação moduladora destas células sobre a atividade dos linfócitos T $\alpha\beta$. 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 monocytogenes*.

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.

McMENAMIN *et al.* (1995), em modelo de inalação de antígenos protéicos, mostraram que a tolerância (supressão da hipersensibilidade imediata) obtida após a inalação de OVA pode ser transferida para animal recipiente normal através de células esplênicas T $CD8^+ \gamma\delta^+$. 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.

PETERMAN *et al.* (1993), trabalhando no modelo experimental para a artrite reumatóide verificaram a participação das células $\gamma\delta$ tanto na proteção, como na

indução da doença, demonstrando uma dupla função para as células $\gamma\delta$, sendo que o possível efeito protetor dependia do estado de ativação das células. Os autores também verificaram um padrão diferente de migração, ou seja, diferentes tipos de células $\gamma\delta$ migram para diferentes tecidos.

No modelo da EAE, alguns autores mostraram aumento das células T $\gamma\delta$ nos focos inflamatórios do sistema nervoso central durante os períodos de exacerbação clínica, atribuindo um papel patogênico a essas células (RAJAN *et al.* 1996). Nossos dados, no entanto, apontam para o efeito supressor. Trabalho realizado em nosso laboratório sobre a participação das células T TCR $\gamma\delta$ na evolução clínica da EAE mostrou que a depleção *in vivo* de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ leva a aumento da severidade da doença. A resposta proliferativa de linfócitos estimulados com a MBP, assim como os níveis de anticorpos dirigidos para este neuro-antígeno, também estavam elevados após a depleção *in vitro* dessa população celular, sugerindo importante função supressora destas células no modelo de EAE (DOMENICI, 1997). Em concordância com esses dados, KOBAYASHI *et al.* (1997) mostraram o agravamento da EAE quando utilizaram o anticorpo monoclonal anti TCR $\gamma\delta$ UC7-13D5. Os autores mostraram que após o tratamento com o referido anticorpo, ocorre um aumento da severidade da doença com o consequente aumento da produção de IFN γ , citocina que tem um papel crucial no desenvolvimento da doença.

Nossos dados mostram que o pré-tratamento dos animais com antígenos derivados de micobactéria, paralelamente à ativação das células T $\gamma\delta$, levam à redução da severidade da EAE. Nossos resultados concordam com os obtidos por

outros autores que evidenciam que a pré-exposição de animais ao adjuvante completo ou a *Mt* induz resistência ao desenvolvimento da EAE, (HEMPEL *et al.* 1985). Posteriormente BEN-NUN *et al.* (1995) mostraram que a pré-exposição de camundongos à toxina pertussis e derivado purificado de proteína de *M. tuberculosis* protege completamente contra a EAE, atribuindo a responsabilidade de conferir proteção aos componentes bacterianos. O mesmo grupo de autores, demonstrou que camundongos inoculados com um fragmento de 12 kDa, derivados da molécula de PPD, desenvolvia resistência a EAE. Os autores discutem também que este fragmento não apresenta característica em comum com o epítipo encefalitogênico da molécula de MBP, afastando a possibilidade de indução de tolerância.

O fato de a transferência adotiva das células T $\gamma\delta$ levar à redução da severidade da EAE, reforça nossa idéia sobre a função supressora dessas células. DOMENICI (1997) mostrou previamente que a depleção de células T $\gamma\delta$ levava diminuição dos níveis de TGF β . SUZUKI *et al.* (1995) estudando os linfócitos intraepiteliais TCR $\gamma\delta$ da mucosa uterina, sugere 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 alogeneica, suprimem *in vitro* a resposta de células estimuladas por antígenos paternos, o autor mostra que tais células T $\gamma\delta$ têm um papel fundamental na manutenção da gravidez, no sentido de suprimir a resposta imune materno anti-feto, devido principalmente à produção de TGF β .

Como foi mencionado, antígenos micobacterianos, podem auxiliar na indução da EAE e quando utilizados como pré-tratamento, podem reduzir a severidade da

doença (BEN-NUN *et al.* 1993). Para que esses antígenos possam modular a severidade da doença é importante que o período de pré-administração seja respeitado, uma vez que apresentamos dados mostrando que durante esse tempo as células T $\gamma\delta$ proliferam sob a ação dos antígenos e sua função supressora é ativada.

É possível que o peptídeo de PPD (180-196) seja a unidade responsável pela ligação com os receptores $\gamma\delta$ e ativem, dessa forma, a produção de citocinas anti-inflamatórias. Determinados peptídeos têm a capacidade de se ligar aos receptores e estimular preferencialmente a liberação de citocinas anti-inflamatórias. MILLER *et al.* (1993) mostraram que a administração oral do epítipo não encefalitogênico da molécula de MBP (21-40) levava a significativa redução da severidade da doença. Os autores mostraram que esse epítipo estimulava preferencialmente a produção de TGF β , enquanto o epítipo encefalitogênico (71-90) não tinha essa propriedade.

Concluindo, nossos dados mostram que as células T $\gamma\delta$, quando ativadas pelos antígenos micobacterianos ou quando transferidos adotivamente, em maior quantidade, podem exercer função supressora sobre as células autorreativas, reduzindo, dessa forma, a severidade da EAE. Não temos a informação no momento, dos mecanismos utilizados por essas células, ou subpopulações de $\gamma\delta$, para resultar em supressão; essa pergunta deverá ser respondida em estudos posteriores. No entanto, o trabalho é relevante, pois sinaliza que a manipulação de determinadas subpopulações celulares pode interferir no curso das doenças autoimunes, e a somatória desses conhecimentos, eventualmente, poderá ser aplicada para reduzir os danos das reações autoimunes no homem.

VI. Conclusões

Dos resultados obtidos podemos concluir que:

Ratos Lewis que receberam Mt, PPD e Peptídeo de PPD apresentam aumento da população de linfócitos T TCR $\gamma\delta$, mostrando a forte reatividade desta população aos antígenos derivados de Mt.

A administração de Mt, PPD e Peptídeo de PPD *in vivo* em ratos Lewis levou à significativa redução da resposta proliferativa de linfócitos esplênicos estimulados por Con A, mostrando que a administração destes antígenos suprime a resposta imune de animais normais.

A depleção da população das células T $\gamma\delta$ *in vivo*, reverte a supressão da resposta blastogênica dos linfócitos.

Os animais pré-tratados com Mt, PPD e peptídeo de PPD e os que receberam transferência adotiva de células T $\gamma\delta$ apresentaram a EAE menos severa quando comparada ao grupo controle, reforçando a propriedade das células T TCR $\gamma\delta$ de suprimir a resposta imune celular.

Tabela I. Porcentagem de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ de baço de ratos Lewis (6 animais/grupo) 20 dias após imunização com Mt. O grupo controle apenas recebeu IFA.

% de cél. T TCR $\gamma\delta$	% de cél. T TCR $\gamma\delta$
(Normais)	(Após imunização com Mt)
0.6	13.6
0.5	14.8
1.1	16.7
1.1	16.7
0.9	15.4
0.8	11.7
Média : 0.8	Média : 14.8
Desvio padrão : 0.3	Desvio padrão : 1.7

Teste t Student : $p = 0.007$

Tabela **II**. Porcentagem de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ de baço de ratos Lewis (6 animais/grupo) 20 dias após imunização com PPD. O grupo controle apenas recebeu IFA.

% de cél. T TCR $\gamma\delta$	% de cél. T TCR $\gamma\delta$
(Normais)	(Após imunização com PPD)
0,5	6,2
0,3	4,6
0,2	3,8
0,4	3,3
0,7	2,8
0,4	2,9
Média : 0,4	Média : 3,9
Desvio padrão: 0,2	Desvio padrão : 1,3

Teste T Student : $p < 0,001$

Tabela III. Porcentagem de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ de baço de ratos Lewis (6 animais/grupo) 20 dias após imunização com Peptídeo de PPD. O grupo controle apenas recebeu IFA.

% de cél. T TCR $\gamma\delta$	% de cél. T TCR $\gamma\delta$
(Normais)	(Após imunização com Peptídeo de PPD)
0,4	1,70
0,3	1,50
0,3	1,30
0,5	1,20
0,5	1,60
0,4	1,70
Média : 0,4	Média : 1,5
Desvio padrão : 0,1	Desvio padrão : 0,20
Teste t Student : $p < 0.001$	

Tabela IV. Resposta proliferativa de linfócitos esplênicos de ratos Lewis (6 animais/grupo) estimulados com Con A, 20 dias após imunização com Mt, comparado com o grupo controle. Os resultados estão expressos em cpm, representando a média das triplicatas.

N #	Concentrações de Con A			
	5 ug/ml	2,5 ug/ml	1,25 ug/ml	Sem estímulo
Experimento				
1	18040	17400	13816	7251
2	2388	11370	16790	1065
3	10437	13740	15200	1217
4	7600	11823	12170	3147
5	4891	6160	4920	220
6	2724	6622	2390	443
Média	7680	11185	10881	2223
Animais Normais				
N#	Concentrações de Con A			
	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	Sem estímulo
Experimento				
1	32096	42390	20305	10976
2	6400	13488	14870	1895
3	19272	21513	20157	2916
4	10824	18554	16390	1821
5	15839	18677	19275	935
6	9050	13042	10300	914
Média	15580	21277	16883	3243
	Wilcoxon	Wilcoxon	Wilcoxon	
	p<0.01	p<0.01	p<0.025	

Tabela V. Resposta proliferativa de linfócitos esplênicos de ratos Lewis (6 animais/grupo) estimulados com Con A, 20 dias após imunização com PPD, comparado com o grupo controle. Os resultados estão expressos em cpm, representando a média das triplicatas.

N# Experimento	Concentrações de Con A			
	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	Sem estímulo
1	8629	6551	8987	762
2	25839	31264	13193	1358
3	12914	20281	21347	3386
4	7171	19839	19600	2443
5	38262	46133	36718	6143
6	9051	69325	39743	6457
Média	16978	32232	23265	3425
Animais normais				
N# Experimento	Concentrações de Con A			
	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	Sem estímulo
1	24674	12180	13853	624
2	34457	42739	38300	2130
3	14504	25878	19611	1806
4	21333	25297	23041	4818
5	58661	72713	55754	5949
6	66460	73395	57395	7040
Média	36682	42034	34659	3728
	Wilcoxon	Wilcoxon	Wilcoxon	
	p<0.01	p<0.01	p<0.01	

Tabela VI. Resposta proliferativa de linfócitos esplênicos de ratos Lewis (6 animais/grupo) estimulados com Con A, 20 dias após imunização com Peptídeo de PPD, comparado com o grupo controle. Os resultados estão expressos em cpm, representando a média das triplicatas.

N# Experimento	Concentrações de Con A			
	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	Sem estímulo
1	10815	27700	18900	1809
2	17770	27480	20480	1532
3	22560	28680	22835	2070
4	23472	41362	32920	2780
5	16320	23210	19100	2223
6	19016	29120	17200	3100
Média	18326	29592	21907	2252
Animais normais				
N# Experimento	Concentrações de Con A			
	5 ug/ml	2.5 ug/ml	1.25 ug/ml	Sem estímulo
1	13046	28846	23779	2852
2	28767	33231	30520	2240
3	33432	40413	36671	3189
4	32620	56418	40320	3480
5	26230	38480	20600	3100
6	25480	40900	23410	4900
Média	26596	39715	29217	3294
	Wilcoxon	Wilcoxon	Wilcoxon	
	p<0.01	p<0.01	p<0.01	

Tabela VII. Efeito da depleção de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ *in vivo*, sobre a resposta proliferativa de linfócitos de ratos Lewis, em resposta à Con A. Os animais foram depletados e tratados *in vivo* com Mt (DIMt) apenas tratados com Mt (IMt) e animais normais (grupo controle)

N# de animais	DIMt	IMt	Controle
1	42154	18452	37964
2	38735	16350	24830
3	46238	22476	39588
4	37864	16743	25896
Média	41248	18505	32069

Tabela VIII. Efeito da depleção de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ *in vivo*, sobre a resposta proliferativa de linfócitos de ratos Lewis, em resposta à Con A. Os animais foram depletados e tratados *in vivo* com PPD, apenas tratados com PPD e animais normais (grupo controle).

N# de animais	DIPPD	IPPD	Controle
1	41182	18356	35628
2	44529	23318	30449
3	45014	20968	35628
4	39294	23566	28820
Média	42505	21552	32631

Tabela IX. Efeito da depleção de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ *in vivo*, sobre a resposta proliferativa de linfócitos de ratos Lewis, em resposta à Con A. Os animais foram depletados e tratados *in vivo* com P-PPD, apenas tratados com P-PPD e animais normais (grupo controle).

N# de animais	DIP-PPD	IP-PPD	Controle
1	40600	17480	36970
2	43620	22220	27448
3	46238	21300	35120
4	38120	19430	26630
Média	42144	20107	31542

Tabela X. Evolução clínica da EAE de ratos Lewis pré-tratados com Mt posteriormente imunizados com GP-MBP/CFA .

Pré-tratados com Mt						
Nº dias	Animais					S.C.M.
	I	II	III	IV	V	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
Imunizados com GP-MBP/CFA						
Dias após Imunização	I	II	III	IV	V	S.C.M.
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0,5	0	0	0	0,5	0,2
14	1	0	0	0	0,5	0,3
16	1,5	0,5	1	1,5	0,5	1
17	2	2	2	2	0	1,6
18	2	3	3	3	0	2,2
19	2	3	4	1,5	0	2,1
20	1	3	3	1	0	1,6
21	0,5	2	1	1	1	1,1
22	0	1	0	1	1	0,6
23	0	1	0	0,5	1	0,5
24	0	1	0	0	1	0,4
25	0	0	0	0	0,5	0,1
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0

Tabela XI. Evolução clínica da EAE de ratos Lewis pré-tratados com PPD e posteriormente imunizados com GP-MBP/CFA.

Pré-tratados com PPD						
Nº dias	Animais					S.C.M.
	I	II	III	IV	V	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
Imunizados com GP-MBP/CFA						
Dias após Imunização	I	II	III	IV	V	S.C.M.
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	1	1	1	0,6
17	1	0	2	2	2	1,4
18	2	2	2	2	2	2
19	2	2	2	2	2	2
20	1	1	1	1	2	1,2
21	1	1	1	1	1	1
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0

Tabela XII Evolução clínica da EAE de ratos Lewis pré-tratados com Peptídeo de PPD e posteriormente imunizados com GP-MBP/CFA.

Pré-tratados com Peptídeo de PPD						
Nº dias	Animais					S.C.M.
	I	II	III	IV	V	
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
Imunizados com GP-MBP/CFA						
Dias após Imunização	I	II	III	IV	V	S.C.M
12	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	0	0	0	0	0
16	0	0	1	0	1	0,4
17	0	0	1	1	1	0,6
18	1	2	2	2	2	1,8
19	1	2	2	2	2	1,8
20	0	1	1	1	1	0,8
21	0	0	1	1	1	0,6
22	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	0	0
24	0	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0	0

TABELA XIII Evolução clínica da EAE de ratos Lewis pré-tratados com IFA e posteriormente tratados com GP-MBP/CFA..

Pré-tratados com IFA						
Nº dias	Animais					
	I	II	III	IV	V	S.C.M.
1	0	0	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0
7	0	0	0	0	0	0
8	0	0	0	0	0	0
9	0	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0
Imunizados com GP-MBP/CFA						
Dias após Imunização	I	II	III	IV	V	S.C.M.
12	0	0	0	0	0	0
13	0,5	1	0,5	0	1	0,6
14	1	1	1	1	1	1
15	2	1	2	1	2	1,6
16	2	2	2	2	2	2
17	2	2	2	2	2	2
18	2	3	2	3	3	2,6
19	3	3	2	4	4	3,2
20	3	4	3	4	4	3,6
21	4	4	3	4	4	3,8
22	4	3	3	3,5	3	3,3
23	3	3	2	2	3	2,6
24	2	2	1	2	1	1,6
25	2	1	0	1	0	0,8
26	1	1	0	0	0	0,4
27	0	1	0	0	0	0,2
28	0	0	0	0	0	0

TABELA XIV. Evolução clínica da EAE de ratos Lewis imunizados com GP-MBP/CFA, sem tratamento prévio.

Imunizados com GP-MBP/CFA						
Dias após Imunização	Animais					
	I	II	III	IV	V	S.C.M.
12	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1
14	1	2	2	2	2	1,8
15	2	2	2	2	2	2
16	2	2	2	2	2	2
17	3	3	3	3	3	3
18	3	3	4	3	4	3,4
19	4	4	4	4	4	4
20	4	4	4	4	4	4
21	4	4	4	4	4	4
22	3	3	3	2	3	2,8
23	3	2	2	1	3	2,2
24	2	1	1	1	2	1,4
25	1,5	0	1	0	1	0,7
26	1	0	0	0	1	0,4
27	1	0	0	0	0	0,2
28	0	0	0	0	0	0

Tabela XV. Evolução clínica da EAE de ratos Lewis que receberam adotivamente os linfócitos TCR $\gamma\delta$.

Transferência adotiva de células				
Imunizados com GP-MBP/CFA				
Dias após imunização	Animais			
	I	II	III	S.C.M.
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	1	1	1	1
13	1	2	2	1,6
14	2	1	2	1,6
15	2	1	2	1,6
16	1	0	1	0,6
17	0	0	1	0,3
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	0	0	0	0
25	0	0	0	0
26	0	0	0	0

Tabela XVI. Evolução clínica da EAE de ratos Lewis que não receberam transferência adotiva de células T TCR $\gamma\delta$.

Imunizados com GP-MBP/CFA				
Dias após Imunização	Animais			
	I	II	III	S.C.M.
10	1	1	0	0,6
11	1	1	1	1
12	2	2	2	2
13	3	3	3	3
14	3	3	4	3,3
15	3	3	4	3,3
16	3	3	3	3
17	3	3	3	3
18	2	3	2	2,3
19	2	2	2	2
20	2	2	2	2
21	2	2	2	2
22	2	1	1	1,3
23	1	1	1	1
24	1	1	1	1
25	1	0	1	0,6
26	0	0	0	0

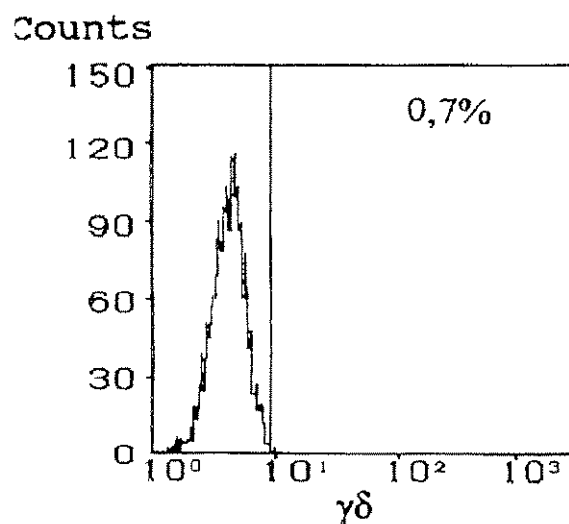
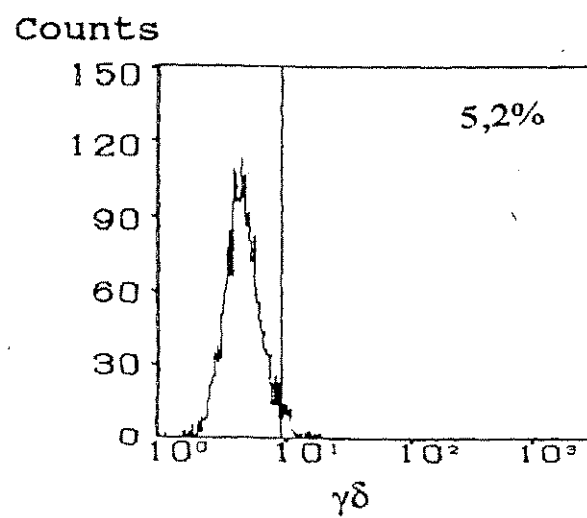


Figura 5a. Porcentagem de células T $\gamma\delta$ de células esplênicas de rato Lewis obtida por citometria de fluxo: 5,2% de células $\gamma\delta$ correspondem aos animais que foram tratados in vivo com PBS e 0,7% destas células correspondem aos animais que foram depletados das células $\gamma\delta$ (tratados com o anticorpo monoclonal)

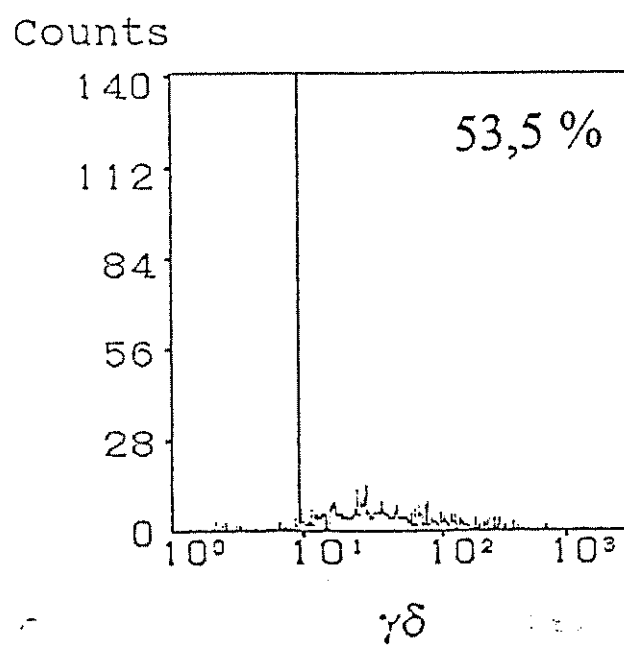


Figura 10. Porcentagem de células T $\gamma\delta$ da mucosa intestinal de ratos Lewis.

VIII. Referências Bibliográficas

- AMOR, S.; O'NEILL, J.K.; MORRIS, M. M.; SMITH, R.M.; WRAITH, D.C.; GROOME, N.; TRAVERS, P.J. & BAKER, D. Encephalitogenic Epitopes of Myelin Basic Protein, Proteolipid Protein, and Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein for Experimental Allergic Encephalomyelitis Induction in Biozzi ABH (H-2a²⁷) Mice share an Amino Acid Motif. *J. Immunol.* 156: 3000-3008, 1996.
- BARRET, T. A.; DELVY, M.L; KENNEDY, D.M.; LeFRANCOIS, L.; MATIS, L.A.; DENT, A.L.; HEDRICK, S.M. & BLUESTONE, J.A. Mechanism of self-tolerance of $\gamma\delta$ T cells in epithelial tissue. *J. Exp. Med.* 175: 65-70, 1992.
- BEN-NUN, A.; WEKERLE, H. & COHEN, I. R. Vaccination against autoimmune encephalomyelitis with T-lymphocyte line cells reactive against myelin basic protein. *Nature*, 292: 60-63, 1981.
- BEN-NUN, A., & COHEN, I.R. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) mediated by T cell lines: process of selection of lines and characterization of the cells. *J. Immunol.* 129: 303-308, 1982.
- BEN-NUN, A. & LANDO, Z. Detection of Autoimmune cells proliferating to myelin basic protein and selection of T cell lines that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *J. Immunol.* 130: 1205-1209, 1983.
- BEN-NUN, A.; LIBLAU, R.S.; COHEN, L.; LEHMANN, D.; TOURNIER-LASSERVE, E.; ROSENZROCIG, A.; JINGMRI, Z.; RAUS, J.C.M. & BACH, M.A. Restricted T- cell receptor V β gene usage by myelin basic protein-specific T-cell clones in multiple sclerosis: Predominant genes vary in individuals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 2466-2470, 1991.

- BEN-NUN, A.; YOSSEFI, S. & LEHMANN, D. Protection against autoimmune disease by bacterial agents. II PPD and pertussis toxin as proteins active in protecting mice against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 23: 689-696, 1993.
- BEN-NUN, A., MENDEL, I.; SAPPLER, G. & ROSBO, N.K. A 12 KDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* protects mice against Encephalomyelitis. Protection in the absence of shared T cell epitopes with encephalitogenic proteins. *J. Immunol.* 154: 2939-2948, 1995.
- BORN, W.; HALL, L.; DALLAS, A.; BOYMEL, J.; SHIMICK, T.; YOUNG, D.; BRENNAN, P. & O'BRIEN, R. Recognition of a Peptide antigen by heat shock reative $\gamma\delta$ T lymphocytes. *Science*, 249: 67-69, 1990.
- BOISMENU, R. & HAVRAN, W.L. An innate view of $\gamma\delta$ T cells. *Current Opin. In Immunol.* 9: 57-63, 1997.
- BOURDETTE, D.N.; WHITHAM, R.H.; CHOU, Y.K.; MORRISON, W.J.; ATHERTON, J.; KEMY, C.; LIEFELD, D.; HASHIM, G.A.; OFFNER, H. & VANDENBARK, A.A. Immunity to TCR Peptides in Multiple Sclerosis. I Successful Immunization of Patients With Synthetic V β 5.2 and V β 6.1 CDR2 Peptides. *J. Immunol.* 152: 2510-2519, 1994.
- BURNS, F.R.; Li, X.B.; SHEN, N.; OFFNER, H.; CHOU, Y.K.; VANDENBARK, A.A. & HEBER-KATZ, E. Both rat and mouse T cell receptors specific for the encephalitogenic determinant of myelin basic protein use similar V alpha and beta chain genes even though the major histocompatibility complex and encephalitogenic determinants being recognized are different. *J. Exp. Med.* 169: 27-39, 1989.

- CARDILLO, F.; FALCÃO, R.P.; ROSSI, M.A. & MENGEL, J.A. 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.
- CASTRO, A.Z. Imunidade Celular de Pacientes Portadores de Tuberculose Pulmonar. Participação do Fator Transformador de Crescimento Beta (TGF- β) e Interferon Gama (IFN- γ). *Tese de Mestrado*. UNICAMP. 84 f. 1997.
- CHAMPSI, J.; YOUNG, S.L. & BERMUDEZ, E.L. Production of TNF- α and IL-6, during murine *Mycobacterium avium* infection. *Immunol.* 84: 549-554, 1995.
- 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.
- CHOU, Y.K.; MORRISON, W.J.; WEINBERG, A.D.; DEDRICK, R.; WHITHAM, R.; BOURDETTE, D.N.; HASHIM, G.; OFFNER, H. & VANDENBARK, A.A. Immunity to TCR Peptides in Multiple Sclerosis. II T cell Recognition of V β 5.2 and V β 6.1 CDR2 Peptides. *J. Immunol.* 152: 2520-2529, 1994.
- 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.
- DOMENICI, E.L. Modulação da Encefalomielite Experimental Autoimune pelos linfócitos T $\gamma\delta$. *Tese de Mestrado*. UNICAMP. 71 f. 1997.
- ELLNER, J.J.; BOOM, W.H.; EDMONDS, K.L.; RICH, E.A.; TOOSI, Z. & WALLIS, R.S. Regulation of the immune response to *Mycobacterium tuberculosis* : Microbial determinants of virulence and host response. *American Society for Microbiology. Washington, D.C.*; pp. 77-79, 1991.

- FREEDMAN, M.S.; RUIJS, T.C.G.; SELIN, L.K. & ANTEL, J.P. Peripheral Blood γ - δ T cells Lyse Fresh Human Brain-Derived Oligodendrocytes. *Ann. Neurol.* 30: 794-800, 1991.
- 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.; ROAK, E.R.; KELLY, K.; DREVETS, D.; CAMPBELL, P.; O'BRIEN, R.; & BORN, W. Immune protection and controls of inflammatory tissue necrosis by γ δ T cells. *J. Immunol.* 153: 3101-3115, 1994.
- FUJIIHASHI, K.; TAGUCHI, T.; AICHER, W.K.; McGhee, J.R.; BLUESTONE, J. A.; ELDRIDGE, J.H. & KIYONO, H. Immunoregulatory functions for Murine Intraepithelial lymphocytes: γ δ T cell receptor positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance, while $\alpha\beta$ TCR+ T cells provide B cell help. *J. Exp. Med.* 175: 695-707, 1992.
- FUJIWARA, H.; KELEINHENZ, M.E.; & WALLIS, R.S. Increased interleukin 1 production and monocyte suppressor cell activity associated with human tuberculosis. *Am. Rev. Respiratory. Disease.* 133: 73-77, 1986.
- GREER, J.M.; KUCHROO, V.K.; SOBEL, R.A. & LEES, M.B. Identification and characterization of a second encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein (residues 178-191) for SJL mice. *J. Immunol.* 149: 783-788, 1992.
- HAAS, W.; PEREIRA, P., & TONEGAWA, S. Gamma /Delta Cells. *Annu. Rev. Immunol.* 11: 637-685, 1993.

- HAFLER, D.A., & WEINER, H.L. MS : A CNS and Systemic Autoimmune Disease. *Immunology Today*, 10: 104-107, 1989.
- HASHIM, G.A.; VANDENBARK, A.A.; GALANG, A.B.; DIAMANDUROS, T.; CARVALHO, E.; SRINIVASAN, J.; JONES, R.; VAINIENE, M.; MORRISON, W.J. & OFFNER, H. Antibodies Specific for V β 8 receptor Peptide Suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 144: 4621- 4627, 1990.
- HISAEDA, H.; SAKAI, T.; NAGASAWA, H.; ISHIKAWA, H.; YASUTOMO, K.; MAEKAWA, Y. & HIMENO, K. Contribution of extrathymic $\gamma\delta$ T cells to the expression of heat-shock protein and to protective immunity in mice infected with *Toxoplasma gondi*. *Immunology*, 88: 551-557, 1996.
- HEMPEL, K.A.; FREINTAG, B.; ENDRES, B.; MAI, B. & LIEBALDT, G. Unresponsiveness to Experimental Allergic Encephalomyelitis in Lewis rats pretreated with complete Freund's adjuvant. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.* 76: 193-199, 1985.
- HOLOSHITZ, J.; FRENKEL, A.; BEN-NUN, A. & COHEN, I.R. Autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated or prevented by T lymphocyte lines directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein. Vaccination is determinant specific. *J. Immunol.* 131: 2810-2813, 1983.
- JAVED, N.H.; GIENAPP, I.E.; COX, K.L. & WHITACRE, C.C. Exquisite Peptide Specificity of Oral Tolerance in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 155: 1599- 1605, 1995.
- KABELITZ, D.; BENDER, A.; SCHONDELMAIER, B.S.; SCHOEL, B. & KAUFMANN, S.H. A large fraction of human peripheral blood $\gamma\delta^+$ T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65 - KD heat shock protein. *J. Exp.Med.* 171: 667-679, 1990.

- KABELITZ, D.; ACKERMAN, T.; HINZ, T.; DAVODEAU, F.; BAND, H.; BONNEVILLE, M.; JANSSEN, O.; ARDEN, B. & SCHONDELMAIER, S.A. New monoclonal antibody (23D12) recognizing three different V γ elements of the human $\gamma\delta$ T cell receptor 23D12+ cells comprise a major subpopulation of $\gamma\delta$ T cell in posnatal thymus. *J. Immunol.* 152: 3128, 1994.
- KAUFMANN, S.H.E.; BLUM, C. & YAMAMOTO. Crosstalk between α/β T cells responses after γ/δ T cell modulation with the monoclonal antibody GL3. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 90: 9620-9624, 1993.
- KOBAYASHI, Y.; KAWAI, 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.
- KRONENBERG, M. Antigens recognized by $\gamma\delta$ T cells. *Current Op. Immunol.* 6: 64-71, 1994.
- KUCHROO, V.K.; MARTIN, C.A; GREER, J.M.; JU, S.T.; SOBEL, R.A. & DORF, M.E. Cytokines and adhesion molecules contribute to the ability of myelin proteolipid protein-specific T cell clones to mediated experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 151: 4371-4382, 1993.
- LIDER, O.; SANTOS, L.M.B.; LEE, C.; HIGGINS, P. & WEINER, H.L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein. II Suppression of disease and in vitro immune responses is mediated by antigen specific CD8+ T lymphocytes. *J. Immunol.* 142: 748-752, 1989.
- LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDERL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275, 1951.

- MARINI, J.C.; JAMESON, B.A.; LUBLIN, F.D. & KORNGOLD, R. A CD4-CDR3 Peptide Analog Inhibits both Primary and Secondary Autoreactive CD4 + T Cell Responses in Experimental Allergic Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 157: 3706-3715, 1996.
- MARUSIC, S. & TONEGAWA, S. Tolerance induction and autoimmune Encephalomyelitis amelioration after administration of Myelin Basic Protein-derived peptide. *J. Exp. Med.* 186: 507-515, 1997.
- MILLER, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; PRABHU DAS, M. & WEINER, H.L. Epitopes of myelin basic protein that trigger TGF- β release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. *J. Immunol.* 151: 7307-7315, 1993.
- 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 β after antigen-specific triggering. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 421– 425, 1992.
- Mc MENAMIN, C.; PIMM, C.; MCKERSEY, M. & HOLT, P.G. Regulation of Ig E response to inhaled antigen in mice by antigen specific $\gamma\delta$ T cells. *Science* 265: 1869-1871, 1994.
- Mc MENAMIN, C.; MCKERSEY, M.; KUHNLEIN, P.; HUNIG, T. & HOLT, P. G. $\gamma\delta$ cells downregulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. *J. Immunol.* 154: 4390-4394, 1995.
- MORENO, C.; MEHLERT, A. & LAMB, J. The inhibitory effects of mycobacterial liporabinomannan and polysaccharides upon polyclonal and monoclonal human T cell proliferation. *Clin. Exp. Immunol.* 74: 206-210, 1988.

- MOWAT, A. McI.; STROBEL, S.; DRUMMOND, H.E. & FERGUSON, A. Immunological responses to fed protein antigens in mice. I. Reversal of oral tolerance to ovalbumin by cyclophosphamide. *Immunol.* 45: 105-113, 1982.
- MUSATTI, C.C.; RESKALAH, M.T.; MENDES, E. & MENDES, N.F. *In vivo* and *in vitro* evaluation in cell mediated immunity in patients with paracoccidioidomycosis. *Cell Immunol.* 24: 365-369, 1976.
- NICK, S.; PILERI, P.; TONGIANI, S.; UEMATSU, Y.; KAPOSS, L. & DE LIBERO, G. T cell receptor $\gamma\delta$ repertoire is skewed in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients: molecular and functional analyses of antigen-reactive $\gamma\delta$ clones. *Eur. J. Immunol.* 25: 355-363, 1995.
- NISHIMURA, H.; HIROMATSU, K.; KOBAYASHI, N.; GRABSTEIN, K.H.; PAXTON, R.; SAGAMURA, K.; BLUESTONE, J.A. AND YOSHIKAI, Y. IL-15 is a novel growth factor for Murine $\gamma\delta$ T cell Induced by *Salmonella* Infection. *J. Immunol.* 156: 663-669, 1996.
- O'BRIEN, R.; HAAP, M.; DALLAS, A.; PALMER, E.; HUBO, R. & BORN, W. K. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor $\gamma\delta$ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 57: 667-674, 1989.
- OKRAGLY, A.J.; HANBY-FLARIDA, M. & BALDWIN, C.L. Monocytes control $\gamma\delta$ T-cell responses by a secreted product. *Immunology* 86: 599-605, 1995.
- OFFNER, H.; VAINIENE, M.; CELNIK, B.; WEINBERG, A.D.; BUENAFE, A. & VANDENBARK, A.A. Coculture of TCR Peptide-Specific T cells with Basic Protein-Specific T cells inhibits Proliferation, IL-3 mRNA, and transfer of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J. Immunol.* 153: 4988 - 4996, 1994.

- OFFNER, H.; HASHIM, G.A. & VANDENBARK, A.A. T cell receptor peptide therapy triggers autoregulation of experimental encephalomyelitis. *Science*, 251: 430-432, 1991.
- OLIVEIRA, E.C. Efeito da Indução de tolerância, obtida pela administração oral de proteína básica de mielina, na produção de citocinas pelos linfócitos Th1 e Th2. *Tese de Mestrado*. UNICAMP. 82 f. 1997.
- PANCHAMOORTHY, G.; McLEAN, J.; MODLIN, R.L.; MORITA, C.T.; ISHIKAWA, S.; BRENNER, M.B. & BAND, H. A predominance of the T cell receptor V γ 2/V δ 2 subset in human mycobacteria-responsive T cells suggests germline gene encoded recognition. *J. Immunol.* 147: 3360-3369, 1991.
- PETERMAN, G.M.; SPENCER, CH.; SPERLING, A.I.; BLUESTONE, J.A. Role of $\gamma\delta$ T cells in Murine Collagen-Induced Arthritis. *J. Immunol.* 151: 6546-6558, 1993.
- PFEFFER, K.; SCHOEL, B.; GULLE, H.; KAUFMANN, S.G.E. & WAGNER, H. Primary responses of human T cell to mycobacteria: a frequent set of $\gamma\delta$ T cell are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur. J. Immunol.* 29: 1175-1179, 1990.
- PTAK, W. & ASKENASE, P.W. $\gamma\delta$ T cell assist $\alpha\beta$ T cells in adoptive transfer of contact sensitivity. *J. Immunol.* 149: 3503-3508, 1992.
- POUSSIER, P. & JULIUS, M. Thymus independent T cell development and selection in the intestinal epithelium. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 521-553, 1994.
- RAJAN, A.J.; GAO, Y.L.; RAINE, C.S. & BROSNAN, C.F. A pathogenic role for $\gamma\delta$ T cells in relapsing-remitting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. *J. Immunol.* 157: 941-949, 1996.

- ROARK, C.E.; VOLLMER, M.K.; CAMPBELL, P.A.; BORN, W.K. & O'BRIEN, R.L. Response of a $\gamma\delta$ + T cell receptor Invariant subset During Bacterial Infection. *J. Immunol.* 156: 2214-2220, 1996.
- ROSAT, J.P.; Mc DONALD, H.R. & LOUIS, J.A. A role for $\gamma\delta$ + T cell during Experimental infection of mice with *Leishmania major*. *J. Immunol.* 150: 550-555, 1993.
- RUULS, S.R.; DE LABIE, M.C.D.C.; WEBWER, K.S.; BOTMAN, C.A.D.; GROENESTEIN, C.D.D.; OLSSON, T. & VAN DER MEIDE, P.H. The length of treatment determines whether IFN- β prevents or aggravates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Lewis Rats. *J. Immunol.* 157: 5721-5731, 1996.
- SELMAJ, K.; BROSNAN, C.F. & RAINE, C.S. Colocalization of lymphocytes bearing $\gamma\delta$ T cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendocytes in multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 6452-6456, 1991.
- STEVENS, D.B.; KARPUS, W.J.; GOULD, K.E. & SWANBORG, R.H. Studies of V β 8 T cell receptor peptide treatment in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 37: 123-129, 1992.
- SUZUKI, T.; HIROMATSU, K.; ANDO, Y.; OKAMOTO, T.; TOMODA, Y. & YOSHIKAI, Y. Regulatory role of $\gamma\delta$ T cells in uterine intraepithelial lymphocytes in maternal anti fetal immune response. *J. Immunol.* 154: 4476-4484, 1995.
- SWANBORG, R.H. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Rodents as a Model for Human Demyelinating Disease. *Clin. Immunol. and Pathol.* 77: 4-13, 1995.

- TOOSI, Z; YOUNG, T.; AVRIL, L.; HAMILTON, B.; SHIRATSUCHI, H. & ELLENER, J.J. β -Induction of TGF β 1 by PPD of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 63: 224-228, 1995.
- TUOHY, V. K.; LU, Z.; SOBEL, R. A ; LAURSEN, R. A & LEES, M. B. A synthetic peptide from myelin proteolipid protein induces experimental allergic encephalomyelitis. *J. Immunol.* 141: 1126-1130, 1988.
- UETA, C.; TSUYUGUCHI, I.; KAWASUMI, H.; TAKASHIMA, T.; TOBA, H. & KISHIMOTO, S. Increase of gamma delta T cells in hospital workers who are in close contact with tuberculosis patients. *Infect. Immunol.* 12: 5434-5441, 1994.
- VANDENBARK, A.A.; HASHIM, G. & OFFNER, H. Immunization with a synthetic T-cell receptor V-region peptide protects against experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature*, 341: 541-544, 1989.
- VANDENBARK, A.A.; VAINIENE, M.; ARIAIL, K.; MILLER, S.D. & OFFNER, H. Prevention and treatment of relapsing Autoimmune Encephalomyelitis with Myelin Peptide-Coupled Splenocytes. *J. Neurosc. Res.* 45: 430-438, 1996.
- VAN DER HEYDE, H.C.; MANNING, D.D. & WEIDANZ, W.P. Role of CD4+ T cells in the expansion of the CD4-, CD8- $\gamma\delta$ T cell subset in the spleens of mice during blood-stage Malaria. *J. Immunol.* 151: 6311-6317, 1993.
- VOLTARELLI, J.C. & LOUGHRAN JR, T.P. Expansion of a subset of TCR $\gamma\delta$ human lymphocytes from various lymphoid organs cultured with recombinant IL-2. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 27: 709-718, 1994.
- WAKSMAN, B. Mechanisms in Multiple Sclerosis. *Nature* 318: 104-105, 1985.

- WEINER, H.L.; FRIEDMAN, A.; MILLER, A.; KHUORY, S.J.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.; SAYEGH, M.; NUSSENBLATT, R.B.; TRENTAM, D.E. & HAFLER, D.A. ORAL TOLERANCE: Immunologic Mechanisms and Treatment of Animal and Human Organ-Specific Autoimmune Diseases by Oral Administration of Autoantigens. *Annu. Rev. Immunol.* 12: 809-837, 1994.
- WUCHERPFENNIG, K.W.; NEWCOMBE, J.; LI, H.; KEDDY, C.; CUZNER, L. & HAFLER, D. $\gamma\delta$ T cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4588-4592, 1992.
- WUCHERPFENNIG, K.W. & STROMINGER, J.L. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: Viral peptides activate human T cell clones Specific for Myelin Basic Protein. *Cell*, 80: 695-705, 1995.
- YASUDA, C.L.; GARCIA, C. A.A. , AL-SABBAGH, A. & SANTOS; L.M.B. Estudo do padrão de citocinas produzidos pelos linfócitos Th1 e Th2 após a administração "in vivo" do Interferon β . International Meeting on Cytokines XXI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Imunologia-RJ. Novembro, 1996.
- ZAMVIL, S.; NELSON, P.; TOTTER, J.; MITCHEL, D.; KNOBLER, R.; FRITZ, R. & STEIMMAN, L. T cell clones specific for Myelin Basic Protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* 317: 355-358, 1985.