SECRETARIA
DE
PÓS-GRADUAÇÃO
I. B.

SÍLVIA MANSUR SCAGLIUSI NOVASKI

ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS T TCR $\gamma\delta$ NA FASE DE RECUPERAÇÃO DA ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE (EAE) INDUZIDA EM RATOS LEWIS

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo (a) candidato a) Silvia Mansur Scagliusi Novaski
e aprovada pela Comissão Julgadora.
03/06/98

UNICAMP

1998

SÍLVIA MANSUR SCAGLIUSI NOVASKI

ENVOLVIMENTO DAS CÉLULAS T TCR $\gamma\delta$ NA FASE DE RECUPERAÇÃO DA ENCEFALOMIELITE EXPERIMENTAL AUTOIMUNE (EAE) INDUZIDA EM RATOS LEWIS

Tese 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

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE BC
N.º CHAMADA:
T/Unicamp
N857e
V. Ex.
TOMBO BC/ 34733
PROC. 395/98
C [ ] D [X]
PREÇO R$ 11,00
DATA 11/08/98
N.º CPD

CM-00115423-9

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Novaski, Silvia Mansur Scagliusi

N857e Envolvimento das células T TCR *y* o na fase de recuperação da encefalomielite experimental autoimune (EAE) induzida em ratos Lewis/ Silvia Mansur Scagliusi Novaski.--Campinas,SP.[s.n],1998.
81f: ilus.

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

1.Autoimune. 2.Linfocitos. 3.Linfocinas. I.Santos, Leonilda Maria Barbosa dos. II.Universidade Estadual de Campinas.Instituo de Biologia.

Campinas, 03 de Junho de 1998

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

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

Profa. Dra. DAGMAR RUTH STACH-MACHADO

Profa. Dra. JÚLIA KEIKO SAKURADA

SUPLENTES:

Prof. Dr. IRINEU JOSE BARSANTI CAMARGO

Trabalho realizado com apoio recebido da

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA

FAPESP

À memória de meu pai *Vito Augusto Scagliusi* e aos meus filhos,

Letícia e *Gustavo* dedico este trabalho.

À Professora Dra. *Leonilda Maria Barbosa dos Santos*, minha orientadora agradeço pela imprescindível contribuição na minha vida profissional, pela orientação segura e pelos conhecimentos transmitidos, que com certeza marcaram minha vida.

Ao meu marido *Olívio* pelo apoio, pela ajuda valiosa em todos os momentos desta jornada.

À minha mãe, *Laila Mansur Scagliusi* pela presença constante em minha vida, dedicação, estímulo e compreensão nos momentos mais difíceis, sem a qual este trabalho não seria realizado.

E mais uma vez, a meu pai, *Vito Augusto Scagliusi*, que embora fisicamente ausente, estará presente em todos os momentos de minha vida, dando-me proteção e forças para prosseguir.

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento especial a minha amiga Blanca María Díaz Bardales, companheira inseparável desta longa jornada, por todo apoio, incentivo e carinho que me deu neste trabalho.

Aos meus irmãos, Marisa, Sandra e Vítor e a minha prima Kátia, pelo apoio, incentivo e compreensão.

A todos os colegas do laboratório: Célia, Gláucia, Elaine, Anália, Paula, Dona Ignês, Clarissa, Sônia, Dani, Cristina, Dirce, Sr. Antonio, Marcos, Issa, Rovilson, Francisco, Airton, Márcia Carvalho, Márcia e Sílvia Grascia (Lab. de AIDS do HC) e agora aos novos estágiários do laboratório 4, Gustavo, Alexandre e Cristiane, e a todos, que de alguma maneira contribuiram para a realização deste trabalho.

A Dra. Irene Lorand Metze, e as queridas meninas do Hemocentro: Fernanda, Maristela, Elisângela e Aparecida pelo apoio e amizade oferecida durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Microbiologia e Imunologia Lourdes, Lúcia e Alba.

E a todos os Professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, agradeço profundamente.

..Pouca ciência nos afasta de Deus, mas muita ciência nos aproxima Dele.

(Francisco Bacon)

"Todos aqueles que encontramos profundamente: formam-nos, modificam-nos, constroem-nos".

(Jean Cordonel)

Índice

ABREVIATURAS 11

I. INTRODUÇÃO 12

II. OBJETIVOS 23

III. MATERIAIS E MÉTODOS 24

3.1. Animais de experimentação 24

3.2. Antígenos 24

3.3. Reagentes 24

3.3.1. Anticorpos 24

3.3.2. Citocinas 25

3.4. Indução ativa da EAE em ratos Lewis 25

3.5. Avaliação da Evolução clínica da EAE 25

3.6 Obtenção das células mononucleares dos linfonodos ou esplênicas 26

3.7 Quantificação da população das células T TCR γδ 26

3.8. Produção de TGFβ 27

3.9 . Determinação dos níveis de TGF-β 28

3.10 . Expansão dos linfócitos T TCR γδ 29

3.11. Estimulação das células T TCR γδ com anticorpo monoclonal imobilizado na microplaca 29

3.12. Obtenção da população enriquecida de linfócitos T TCR γδ + (linfócitos intraepiteliais da mucosa intestinal de rato Lewis) 30

3.13. Transferência adotiva de células 31

3.14. Determinação de Apoptose 31

IV. RESULTADOS ____ *34*

Encefalomielite Experimental Autoimune Induzida em Ratos Lewis ____ **34**

Porcentagem de Linfócitos T TCR γδ nas diferentes fases clínicas da EAE ____ **34**

Efeito da Tranfêrencia Adotiva de Linfócitos T TCR γδ na severidade da EAE ____ **35**

Níveis de TGFβ nas diferentes fases clínicas da EAE induzida em ratos Lewis ____ **35**

Produção de TGFβ pelas células T TCR γδ ____ **36**

Indução da Apoptose dos Clones Auto-reativos à MBP nas diferentes fases clínicas da EAE37

Níveis de apoptose de células esplênicas de animais imunizados com GP-MBP e animais normais cultivados na presença de TGFβ e MBP. ____ **38**

V.DISCUSSÃO ____ *51*

VI. CONCLUSÕES ____ *61*

APÊNDICE ____ *62*

VII. RESUMO ____ *70*

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ____ *71*

ABREVIATURAS

MPB	Proteína Básica de Mielina
GP-MBP	Proteína Básica de Mielina de Cobaia
PLP	Proteolipoproteína
EAE	Encefalomielite Experimental Autoimune
EM	Esclerose Múltipla
TCR	Receptor da célula T
HSP	*Heat Shock Protein*
PPD	Derivado de Proteína Purificada
Mt	*Mycobacterium tuberculosis*
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
IFA	Adjuvante Incompleto de Freund
CFA	Adjuvante Completo de Freund
PBS	Tampão Salino Fosfato
SCM	" Score" Clínico Médio
IL	Interleucinas
SNC	Sistema Nervoso Central
TCGF	Fator de Crescimento da Célula T

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.

A Esclerose Múltipla (E.M.) é doença desmielinizante própria de adultos jovens. Clinicamente apresenta característica de doença crônica, que usualmente progride por anos ou décadas, nas formas de surtos e remissões ou crônica progressiva (NAVIKAS & LINK,l996). Os períodos de exacerbação da doença são indesejáveis, pois promovem o declínio da qualidade de vida do paciente. Atualmente a maioria dos estudiosos enquadram a Esclerose Múltipla como doença desmielinizante de natureza auto-imune (WAKSMAN, l985).

A EAE é mediada por linfócitos T CD4+ e consiste em uma reação inflamatória do sistema nervoso central dirigida especificamente contra os componentes da mielina. A EAE pode ser induzida em murinos geneticamente suscetíveis, pela inoculação de mielina e seus componentes, a proteína básica de mielina (MBP), a proteolipoproteina (PLP), epítopos encefalitogênicos das moléculas de MBP ou PLP ou ainda, a transferência adotiva de linfócitos T previamente sensibilizados a esses antígenos (MILLER *et al.*, l993).

A doença induzida em camundongos, a exemplo do que acontece no homem, apresenta períodos de exacerbação e remissão. A EAE pode ser

igualmente induzida em ratos Lewis. Nestes animais, no entanto, a doença se apresenta de forma monofásica, ou seja, após a inoculação do neuro-antígeno, o animal apresenta um surto muito severo e após duas semanas se recupera completamente, não voltando a apresentar períodos de exacerbação da doença (LIDER *et al.*1989).

Recentemente foi demonstrado que a EAE pode ser transferida passivamente por clones auto-reativos do tipo Th1, mas não do tipo Th2. A indução da EAE está relacionada, portanto, com um perfil de citocinas do tipo Th1, as citocinas inflamatórias, IL2, IFN-γ e TNFα, sendo que as mesmas foram detectadas no SNC durante a fase aguda da doença. O tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais anti-TNFα e anti-IL12, quando administrados na fase aguda da EAE, reduziram a sua severidade (NICHOLSON & KUCHROO, I996).

Uma vez que as doenças auto-imunes resultam , em vias gerais, da reversão de tolerância a auto-antígenos, torna-se necessário compreender os mecanismos de indução de tolerância para se entender as doenças e também para se chegar à 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, sabe-se que esse mecanismo não garante totalmente a tolerância, uma vez que existem clones auto-reativos a componentes de vários tecidos, inclusive aos neuro-antígenos, circulando na maioria dos indivíduos sãos (OTA *et al.*, I990, VACCHIO & ASHWELL, I994).

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 a dosagem do antígeno, a via de inoculaçâo e a forma como ele é apresentado. CHEN *et al.* (l996) mostraram que altas doses do antígeno, administrados oralmente, ativam preferencialmente a anergia e a apoptose, enquanto que FRIEDMAN *et al.* (l994) mostraram que baixas doses do antígeno favorecem a supressão ativa.

Ultimamente, muitas evidências vem sugerindo que a apoptose (ou morte celular programada) é um mecanismo central na embriogênese e morfogênese, no desenvolvimento do sistema nervoso , na eliminação de células senescentes ou indesejáveis (neoplásicas e outras), na destruição de células infectadas por virus e, ainda na resposta a estímulos agressivos. Todos estes estudos ressaltam uma distinção clara entre necrose e apoptose. A necrose é uma forma de morte celular degenerativa e incontrolável, provocada normalmente por um estímulo ambiental agressivo: hipertermia, radiação e uma variedade de agentes físicos e químicos, entre outros grupos. A apoptose também pode ser desencadeada por estes agentes, embora em concentrações mais baixas, mas é essencialmente um processo fisiológico. A morte celular por apoptose envolve o reconhecimento de um sinal específico e a intervenção de sistemas complexos de regulação (família bcl-2) e de execução e morte (família ICE). Este último sistema também intervém na sinalização de células em morte, facilitando o reconhecimento pelos macrófagos e permitindo assim a sua eliminação sem dano para os tecidos. Estas características fazem da apoptose uma forma de morte silenciosa e fisiológica (LEITE,1996).

Estas características fazem da apoptose uma forma de morte silenciosa e fisiológica (LEITE,1996).

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 biologia das citocinas. O envolvimento de uma citocinas em particular, o TGFβ também está bem estabelecido. Sabe-se que TGFβ pela sua ação anti-inflamatória, é capaz de suprimir a EAE e outras doenças auto-imunes. MILLER *et al.* (1992) mostraram que a administração de anti-TGFβ *in vivo* exacerbava a EAE e também revertia a tolerância obtida pela administração oral do neuro-antígeno, evidenciando a supressão da resposta imune *in vitro* e *in vivo* através da secreção de TGFβ. KHOURY *et al.* (1992) observaram o aumento da expressão de TGFβ no cérebro de animais oralmente tolerizados com MBP e também de animais com EAE na fase remissiva. Na sequência desses estudos, demonstrou-se que as células secretoras de TGFβ 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 TGFβ mostrou ser dose dependente, diminuindo conforme o aumento da dose de MBP administrada (SANTOS *et al.*, l994). 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 TGFβ; estas observações levaram à proposição de 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 TGFβ como citocina chave na supressão da EAE. Estes estudos mostram, portanto, que tanto a supressão da EAE provocada pela indução de tolerância à MBP, quanto os mecanismos naturais de recuperação da doença, observados na fase de remissão, utilizam uma via imunomodulatória comum que é dependente de TGFβ.

Além da participação do TGFβ, citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, também modulam a severidade da EAE. Em trabalho recentemente concluído em nosso laboratório foi possível demonstrar que a administração oral de MBP, inibe a produção de citocinas Th1 (IL-2 e IFNγ), não modificando os níveis de IL-4 e IL-10. Mostrou-se ainda, que a administração do anticorpo monoclonal anti-IL4, reverte o efeito protetor observado pela administração oral de MBP (OLIVEIRA, I997). Estes dados reforçam que as citocinas produzidas pelos clones Th2 podem modificar o padrão Th1 e consequentemente, modular a severidade da EAE. Também na E.M., em trabalho realizado em nosso laboratório, foi possível correlacionar o aumento de citocinas produzidas por linfócitos Th 1 e a exacerbação da doença (COSTA, 1997).

Resumindo, temos que as citocinas tipo Th1 estão associadas com a patogenia das doenças auto-imunes órgão-específicas como a EAE. Em contrapartida, as citocinas tipo Th2, e outras não necessariamente relacionadas com Th2 e sim com um terceiro tipo celular (Th3), como o TGFβ,

vêm sendo associadas com a fase remissiva e com a manutenção da tolerância (CHEN *et al.,* I996).

Em relação ao estabelecimento de supressão da resposta imune, pergunta-se que população celular ,estaria envolvida, além das populações de linfócitos T TCR $\alpha\beta$ já descritos.

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 Thy 1 e CD8 $\alpha\alpha$ homodímeros. As sub-populações timo-dependentes completam sua maturação dentro do timo e deixam o órgão em ondas subsequentes. Quando comparado com a linhagem germinativa das células T $\alpha\beta$, o repertório da linhagem germinativa γ e δ é muito limitado, consistindo de um pequeno número de segmentos V. Este fato, aliado à baixa diversidade dos pareamentos que as cadeias γ e δ fazem entre si para formar os dímeros $\gamma\delta$, resulta na formação de um repertório bastante limitado de células T (HAAS *et al.*, I993).

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 γδ 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 γδ dos órgãos linfóides e do intestino podem maturar extratimicamente.

A despeito do grande número de publicações enfocando as células T γδ , a função desta população celular não está bem entendida. Vários estudos mostraram que as células T γδ estão frequentemente associadas *in vivo* com as 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 γδ 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 γδ com outras células do sistema imune e a sua importância para a modulação da resposta vem sendo constatada por diversos autores. PTAK & ASKENASE (1992) mostraram que as células T αβ precisam da colaboração das células T γδ para transferir hipersensiblidade de contato. KAUFMANN *et al.* (1993) mostraram um aumento na ativação das células TCR αβ após o tratamento *in vivo* com um anticorpo monoclonal anti-TCR γδ sugerindo uma importante ação moduladora dos linfócitos T γδ sobre os linfócitos αβ. HACKER *et al.* (1995) destacaram uma ação dos linfócitos T γδ sobre as células B no sentido de inibir a síntese

de IgG. FU *et al.*, (1994) mostraram que as células T γδ atuavam na imunomodulação da inflamação , no sentido de prevenir dano excessivo ao fígado durante a resposta imune a *Listeria monocytogenes.*

Tem sido também proposto que as células T γδ participem ativamente dos processos de tolerância e autoimunidade. YUUKI *et al.* (1990) mostraram que as células T γδ revertem a anergia de clones de células T αβ auto-reativos em animais atímicos de idade avançada. O envolvimento das células T γδ diretamente na patogenia das doenças autoimunes tem sido sugerido, principalmente naquelas que possuem um componente inflamatório crônico, como é o caso da Artrite Reumatóide e 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 γδ (WUCHERPFENNIG *et al.,* 1992; PETERMAN *et al.*, 1993; STINISSEN *et al.,* 1995). No caso da Esclerose Múltipla, a presença de linfócitos TCR γδ+ ao redor dos oligodendrócitos foi detectado em pacientes com a doença ativa (SELMAJ *et al.,* 1991). Porém, WUCHERPFENNIG *et al.* (1992) mostraram que essas células são predominantemente TCR Vδ1 ou TCR Vδ2.

HACKER *et al.* (1995) mostraram que células T γδ antígeno-específicas regulam negativamente a produção de IgG. Com essas evidências, os autores propõem um modelo de função para as células T γδ as quais, enfronhadas na rede com outras células do sistema imunológico, atuariam como reguladores negativos da resposta imune. Em relação à presença das células TCR γδ 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 efetive através de mecanismos tais como produção de citocinas que regulam a atividade de outras células. Ainda com relação à ação dos linfócitos γδ sobre as células B, STANFORD *et al.,* (1996) mostraram que as células T γδ são capazes de regular a atividade de células B auto-reativas no modelo Lupus Eritematoso Sistêmico, uma vez que animais γδ deficientes, apresentam aumento da produção de auto-anticorpos.

CARDILLO *et al.* (I993) mostraram que animais infectados experimentalmente com *T.cruzi* vão perdendo a função supressora das células T γδ com o avanço da idade, sendo esta perda de função associada ao aparecimento de auto imunidade, sugerindo uma importante participação dessas células no controle da autoimunidade.

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

McMENAMIN *et al.* (1995) em modelo de inalação de antígenos protéicos, para estudo de hipersensibilidade imediata, mostraram que a

tolerância obtida após a inalação de OVA podia ser transferida para um animal recipiente normal através de linfócitos T CD8 + γδ esplênicas.

Em trabalho recentemente realizado em nosso laboratório DOMENICI (I997) mostrou que a depleção de células T γδ leva ao aumento da severidade da EAE, acompanhado de aumento da resposta proliferativa e dos níveis de anticorpos específicos para MBP. A autora mostra ainda, que a depleção de linfócitos T TCR γδ *in vivo* induz aumento da produção de TNFα com redução dos níveis de TGFβ.

Em termos de apresentação do antígeno pelos linfócitos T TCR γδ, 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. Outros autores, no entanto, acreditam que a exemplo da população αβ os antígenos são apresentados às células T γδ em associação com as moléculas do MHC. Há concordância, no entanto, sobre a forte reatividade das células γδ aos antígenos derivados de micobactérias. Foi descrito que os linfócitos T TCR γδ do timo de murinos neonatos, respondiam a uma "heat shock protein" 60 e que hidridomas γδ eram ativados, liberando níveis elevados de IL-2, quando estimulados com PPD (O'BRIEN *et al.* 1993). Este mesmo grupo de autores mostrou a ativação de hibridomas de γδ por um peptídeo (180-196) de PPD (BORN *et al.*, I990).

Com relação ao modelo de EAE, a indução da doença tanto em ratos como em camundongos é depedente da presença de adjuvantes na

emulsão imunizante. O *Mycobacterium tuberculosis* (Mt) é rotineiramente utilizado como agente imunopotenciador na indução da EAE. Por outro lado, algumas evidências demonstraram que a pré exposição de animais (ratos e camundongos) ao adjuvante completo ou à Mt, induzia resistência ao desenvolvimento da EAE (Mc PHEE & MASON, 1990; HEMPEL *et al.*, 1985). Posteriormente, BEN-NUN *et al.* (1993) mostraram que a pré exposição dos animais à Mt ou a um fragmento de 12 KDa, derivado de PPD, induzia resistência a EAE.

Estas observações nos levaram, a estudar a possível associação entre a pré-exposição aos antígenos derivados de Micobactérias e a ativação da função supressora dos linfócitos T $\gamma\delta$ na evolução clínica da EAE. Fomos capazes de demonstrar que a prévia exposição dos animais aos antígenos de Mt, PPD e peptídeos derivados de PPD, levam à redução da severidade da EAE, associada ao aumento da população de linfócitos T $\gamma\delta$ (DIAZ BARDALES, *et al.* 1997). Estes dados reforçam as observações de DOMENICI (1997) sobre o importante efeito supressor da população de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ na EAE.

Diante destas evidências no presente estudo tivemos como objetivo aprofundar o conhecimento da participação das células T TCR $\gamma\delta$ no modelo da EAE, estudando os ítems que segue.

II. OBJETIVOS

1- Estudar, em termos quantitativos a população de linfócitos T γδ, no modelo de EAE induzida em ratos Lewis, antes, durante e após a recuperação da doença.

2- Quantificar os níveis de TGFβ nas diferentes fases da doença.

3- Verificar se os linfócitos T γδ são responsáveis, pelo menos em parte, pela produção de TGFβ.

4- Estudar o índice de apoptose dos clones autorreativos à MBP nas diferentes fases clínicas da EAE.

5- Verificar a possível participação do TGFβ na indução de apoptose dos clones auto-reativos à MBP.

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais de experimentação

Foram utilizados ratos da linhagem Lewis, fêmeas de oito 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 a Proteína Básica de Mielina purificada do cérebro de cobaia, segundo o método de DEIBLER *et al.* 1972; os níveis de proteínas das amostras foram dosadas pelo método de LOWRY *et al.* (1951) com modificações.

3.3. Reagentes

3.3.1. Anticorpos

Para o ensaio de Citometria de Fluxo foram utilizados os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-TCR $\gamma\delta$ (camundongo anti-TCR $\gamma\delta$ de

rato), marcado com fluoresceína (FITC), anticorpo monoclonal anti-IgG de hamster marcado com fluoresceína (Pharmingen, CA, USA).

3.3.2. Citocinas

Para o estabelecimento da curva padrão referente ao nível da citocina estudada, foi utilizado o seguinte recombinante: TGF-β1 recombinante humano (Genzyme, MA - USA).

3.4. Indução ativa da EAE em ratos Lewis

Os animais foram imunizados com GP-MBP (50 μg/animal) em adjuvante completo de Freund (CFA) via subcutânea nas patas posteriores.

3.5. Avaliação da Evolução clínica da EAE

Os ratos foram avaliados diariamente iniciando 9 dias após a imunização de GP-MPB/CFA, para os sinais clínicos da EAE. A avaliação foi feita da seguinte forma:

grau 0: não doente;

grau 1: perda de tônus da cauda;

grau 2: fraqueza parcial dos membros posteriores;

grau 3: paralisia severa dos membros posteriores;

grau 4: paralisia severa dos membros posteriores e anteriores;

grau 5: morte.

3.6 Obtenção das células mononucleares dos linfonodos ou esplênicas

Baço e linfonodos axilares foram removidos assepticamente e colocados em placas de Petri estéreis, contendo meio RPMI; 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 1,500 rpm a cada lavagem. No caso das células do baço, após a primeira centrifugação o botão celular foi tratado com tampão de lise com o objetivo de se eliminar as hemácias. As células foram lavadas por 3 vezes com solução de Hank's e ressuspendidas em meio RPMI 1640 (Sigma-USA) 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 com Azul Trypan.

3.7 Quantificação da população das células T TCR $\gamma\delta$

As células T TCR $\gamma\delta$ foram fenotipadas através de Citometria de Fluxo.

A suspensão celular obtida como descrito, foi ajustada a uma concentração de $4x10^6$ cél/ml. Para a coloração simples, 500 μl foram colocados em cada frasco tipo eppendorf, ao qual se adicionou 5μl 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); a

uma das amostras não se adicionou anticorpo algum (absoluto). As amostras foram incubados 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 ressuspendidos em 1 ml de formalina 10% em PBS e as amostras foram analisadas em Citômetro de Fluxo B/D Scalibur do Hemocentro da UNICAMP.

3.8. Produção de TGFβ

A suspensão celular foi ajustada para concentração de 2 x 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), 4,25 mg/ml de gentamicina e 1% de glutamina 0,2M e 2-Me 1:5000. Após colocadas nas placas, as células foram incubadas em estufa com sistema de CO_2 a 37^{0}C por duas horas, após o que retirou-se cuidadosamente o meio de cultura e as células não aderentes e acrecentou-se igual volume de meio contendo LPS, na concentração de 5μg/ml. Este procedimento visa obter uma cultura predominantemente de macrófagos. Para obtenção de sobrenadante de linfócitos, a suspensão celular foi estimulada com Con A (25 μg/ml). Os sobrenadantes foram recolhidos após 72 horas de incubação em estufa com sistema de CO_2 a 37^{0}C, coletou-se o sobrenadante, centrifugou-se a 1200 rpm por 10 minutos

Para e estabelecimento da curva padrão referente ao nível da citocina (TGFβ) foi utilizado o recombinante TGF-β1 recombinante humano (Genzyme, MA-USA).

3.9 . Determinação dos níveis de TGF–β

Os níveis de TGF β no sobrenadante de cultura foram determinados através de ensaio biológico. Células da linhagem CCL-64 (MILLER *et al.*, 1992) foram colocadas em meio de cultura a uma concentração de 1 x 10^6 células/ml. Colocou-se 200 μl da suspensão por poço em uma microplaca para cultura de 96 poços, a qual permaneceu 18 foras em estufa com sistema de CO_2 a 37°C. Após isso, retirou-se cuidadosamente 100μl de cada poço e adicionou-se igual volume de cada amostra de sobrenadante de cultura. Para a determinação da curva padrão utilizou-se o TGF β recombinante humano, nas concentrações de 20 ng/ml a 0.01 ng/ml. Incubou-se a microplaca por 24 horas em estufa com sistema de CO_2 a 37°C. Após este periodo, adicionou-se a cada poço timidina tritiada (1μCi/poço), incubando-se a placa por 18 horas. Para lavagem das células, adicionou-se 200μl/poço de tripsina (1:250) com o objetivo de 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 colocadas em tubos padronizados na presença de 2 ml de líquido de cintilação. O conteúdo radioativo foi determinado em Cintilador Beta (Beckman LS 6000 *Series Scintilation System).*

3.10 . Expansão dos linfócitos T TCR γδ

Após obtenção dos linfócitos de acordo com o ítem 3.6, a concentração foi ajustada para 2 x 10^6 células/ml e a suspensão celular foi distribuída em microplacas de 24 poços e estimuladas com PPD, pois é característica das células T γδ a forte reatividade aos antígenos derivados de micobactérias. As placas foram incubadas em estufa com sistema de CO_2 a 37° C por 96 horas. Após esse período, o sobrenadante foi substituído por meio RPMI completo enriquecido com 20% de TCGF (meio enriquecido contendo IL-2) de ratos Lewis. E assim, a cada 48 horas o meio era substituído e as células expandidas por 16 a 18 dias. Após esse tempo foi realizado fenotipagem para os linfócitos T TCR γδ e estimulação com anticorpo imobilizado.

3.11. Estimulação das células T TCR γδ com anticorpo monoclonal imobilizado na microplaca

Utilizou-se o método de ativação das células T γδ pelo anticorpo monoclonal imobilizado. Esse procedimento se baseia na observação que placas de poliestireno podem adsorver proteínas e que o fragmento antígeno-ligante (Fab) do anticorpo são retidos. Sendo assim, este fenômeno foi aplicado para a separação de subpopulações de linfócitos (KUHNLEIN *et al.* 1994).

Em placas de cultura de 96 poços foram colocados 100μl de anticorpo monoclonal anti TCR γδ purificado (Pharmingen , USA) numa concentração de 10μg/ml, em PBS. Deixou-se incubar por 24 horas a 4^0 C. Após este tempo, as ligações inespecíficas foram bloqueadas com PBS contendo 10% de soro bovino fetal. As células, previamente expandidas por estimulação com PPD, foram adicionadas por 6 horas e após este tempo, as células que não aderiram ao anticorpo foram retiradas. Este processo de separação celular é descrito como *panning.* Adicionou-se meio de cultura enriquecido com TCGF e as células estimuladas pelo anticorpo foram cultivadas por 72 horas. Após este tempo, o sobrenadante foi retirado para a determinação de TGFβ (KUHNLEIN *et al.* 1994).

3.12. Obtenção da população enriquecida de linfócitos T TCR γδ + (linfócitos intraepiteliais da mucosa intestinal de rato Lewis)

Os linfócitos intraepiteliais da mucosa intestinal foram obtidos de acordo com FUJIHASHI *et al.* 1992. Os animais foram sacrificados imediatamente retirado o intestino delgado e colocado em placa de Petri contendo meio de Hank's. O intestino foi cortado em pedaços de 1 cm e lavados com o auxílio de uma pipeta Pasteur. Após retirar-se as placas de Peyer, os pedaços de intestino foram abertos longitudinalmente para remoção do excesso de muco interno e com ajuda de um êmbolo foram macerados para desprender as células do tecido. Nesta etapa, verificou-se a presença dos linfócitos ao microscópio. Após este processo, as células foram filtradas em

um funil forrado com uma fina capa de lã de vidro com a finalidade de reter o muco e posteriormente as células foram centrifugadas por 20 minutos a 1500 r.p.m.. O botão celular foi lavado e ressuspendido em meio RPMI enriquecido com 5% de SFB e 4,25 mg/ml de gentamicina, as células foram separadas em gradiente de Percoll e recolhidas na interface de 44/67%. A concentração celular foi ajustada para 1 x 10^7 cél/ml. A porcentagem das células que foram usadas na transferência adotiva, foi determinada por análise de citometria de fluxo.sendo que essas preparações celulares continham cerca de 60% de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ (apêndice figura 11).

3.13. Transferência adotiva de células

Para o ensaio da tranferência adotiva de células, cada um dos recipientes recebeu 1 ml/animal de linfócitos intraepiteliais, a uma concentração de 1 x 10^7 cél/ml via intraperitoneal, em três doses administradas em dias alternados,sendo a última dose 24 horas antes da imunização com GP-MBP/ CFA. Os animais controles foram imunizados com a mesma dose de antígeno. Foram estudados pelo menos 5 animais por grupo.

3.14. Determinação de Apoptose

Para determinação de apoptose, foi utilizado um kit da Pharmingen, APO-DIRECT, que consiste em marcar DNA fragmentado com nucleotídeo trifosfato deoxiuridine conjugado com FITC (FITC-dUTP), reação catalisada

pelo enzima Terminal desoxinucleotidil Transferase (TdT). As células apoptóticas se coram com FITC, enquanto que as não apoptóticas, por apresentar o DNA íntegro, não incorporam o FITC-TdT. Procedeu-se a leitura em Citômetro de fluxo.

Suspensões de células obtidas de acordo com o ítem 3.6 foram incubadas em placas de 24 poços, numa concentração de 3 x 10^6 células/ml e estimuladas com GP/MBP (25 μg/ml), TGF-β (20 ng/ml), ou sem estímulo, por 96 horas, em estufa com sistema de CO_2 a 37^{0}C. Após esse período, as células foram colhidas para tubos *eppendorf* e foram ressuspendidas em 0,5 ml de PBS. Essa suspensão de células, foi fixada adicionando-se 5 ml de solução de PBS + paraformaldeído a 1% e colocadas em banho de gelo por 15 minutos. Após esse período, as células foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM e o sobrenadante descartado. As células foram lavadas com PBS por duas vezes e ressuspendidas novamente com PBS a qual se adicionou 5 ml de etanol gelado e guardadas na geladeira, pelo menos, por 24 horas. Após esse procedimento de fixação das células, iniciou-se o processo de coloração das mesmas.

Para o processo de coloração, as células dos controles positivo e negativo, e as amostras experimentais foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 RPM, para remover o etanol e ressuspendidas em PBS, as quais foram lavadas 2 vezes. Após esse processo de lavagem, 50 μl da solução de coloração foi incorporado às amostras e aos controles positivo e negativo e incubados por 60 minutos a 37^{0}C. Ao final da incubação,as células foram lavadas por duas vezes e ressuspendidas na solução PI/RNase e incubadas

no escuro por 30 minutos em temperatura ambiente. As células foram analisadas na solução de PI/RNase, por Citometria de Fluxo, no Citômetro de Fluxo B/D Scalibur no Hemocentro da UNICAMP.

IV. RESULTADOS

Encefalomielite Experimental Autoimune Induzida em Ratos Lewis

Os animais (pelo menos 5 por grupo) foram imunizados com GP-MBP/CFA e a evolução clínica da EAE foi acompanhada durante 30 dias (apêndice). A **figura I** e a **tabela I** (no apêndice) mostram que os sinais clínicos da doença, começam a aparecer em torno do 9^0 dia após indução da EAE e atingem o pico máximo em torno do 15^0 dias após a indução da mesma. A partir daí a doença regride aos poucos e desaparece completamente por volta do 20^0 dia, não voltando a apresentar picos de exacerbação. Temos , portanto, um único e severo pico da doença durante toda a vida do animal.

Porcentagem de Linfócitos T TCR $\gamma\delta$ nas diferentes fases clínicas da EAE

Este grupo de experimentos foi conduzido no sentido de verificar se há associação entre a atividade clínica da doença e a porcentagem de linfócitos T TCR $\gamma\delta$. Assim, a população de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ foi verificada nos diferentes dias após a imunização.

Na **figura 2** e **tabela II** (no apêndice) podemos observar a variação na porcentagem das células T TCR $\gamma\delta$ de ratos Lewis 10, 20, 30 dias após imunização. Mesmo considerando a variabilidade entre os diferentes indivíduos, pode-se observar o aumento gradativo da população de células T TCR $\gamma\delta$, atingindo os valores máximos na fase de recuperação da doença,

sendo que nessa fase esse aumento atinge níveis estatísticamente significativos ($p < 0,01$), quando se compara com a porcentagem de células T $\gamma\delta$ do grupo de ratos Lewis normais (**tabela III**).

Efeito da Tranfêrencia Adotiva de Linfócitos T TCR $\gamma\delta$ na severidade da EAE

Uma vez que estamos pesquisando a atividade supressora das células T $\gamma\delta$ na EAE, estes experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se os linfócitos T TCR $\gamma\delta$ adotivamente transferidos, modificam a severidade da doença. Os resultados apresentados na figura 3 e tabela VI do apêndice mostram que a tranferência de 1×10^7 linfócitos/animal, contendo acima de 50% de células T TCR $\gamma\delta$ (figura 11-Apêndice) antes da imunização com GP-MPB/CFA, leva à significativa redução da severidade da EAE ($p< 0,05$).

Níveis de TGFβ nas diferentes fases clínicas da EAE induzida em ratos Lewis

A participação do TGFβ na redução da severidade da EAE foi previamente demonstrada (MILLER *et al.* 1993). Este grupo de experimentos foi conduzido no sentido de se quantificar os níveis de TGFβ nas diferentes etapas clínicas da EAE.

A molécula de TGF β é constituída de tal forma, que essa citocina pode ser encontrada no organismo, na forma ativa e inativa. Os efeitos biológicos do TGF β são observados quando a molécula é ativada e esse

processo pode ser conseguido através da acidificação, contato célula -célula, efeito enzimático, etc. Em termos de quantificação, sabe-se que a forma inativa da molécula não se liga aos anticorpos, sendo necessária a pré-acidificação do meio, que muitas vezes ativa *in vitro* a molécula, sem que esse fenômeno esteja ocorrendo *in vivo.* O método biológico traduz o estado de ativação da molécula de TGF β. No entanto, tem as desvantagens dos métodos biológicos, que é a grande variabilidade nas determinações.

O TGF β pode ser produzido, entre outras células, por macrófagos e linfócitos T CD4, T CD8, desta forma as células dos ratos Lewis imunizados com GP-MBP/CFA foram estimuladas tanto por LPS como Con A e os níveis de TGF β, posteriormente dosados. Na **figura 4** e na **tabela IV** (no apêndice) pode-se observar que os níveis de TGFβ dos animais com EAE no pico da doença, apresentaram sensível diminuição da produção de TGF β quando as células foram estimuladas por LPS e Con A. Apesar de no 20^0 dia os animais já estarem clinicamente recuperados, não se observou aumento significativo da produção de TGF β, tanto pelas células T como pelos macrófagos ($p< 0,05$). A produção de TGF β aumenta no 30^0 dia após imunização (aproximadamente 10 dias após a recuperação clínica) e é significativamente maior que os níveis apresentados pelos animais normais tanto quando as células foram estimuladas por LPS ou Con A ($p >0,05$).

Produção de TGFβ pelas células T TCR γδ

No sentido de verificarmos qual a participação das células T TCR γδ no aumento dos níveis de TGFβ observados, linfócitos T TCR γδ foram

estimulados com Mt., com o objetivo de aumentar esta população celular. Posteriormente, a população enriquecida de células T γδ do baço de animais normais e imunizados com GP-MBP/CFA foi cultivada sobre anticorpo monoclonal anti-TCR γδ imobilizado na placa de cultura. Este procedimento leva à ativação das células T γδ com consequente produção de TGF β. O meio de cultura onde estas células foram cultivadas estava enriquecido de 20% de TCGF, contendo IL-2.

Quanto a produção de TGFβ pela população de células T γδ a **figura 5** mostra que a ligação dos receptores TCR γδ ao anticorpo específico imobilizado na microplaca, foi suficiente para ativar a produção de significativa quantidade de TGFβ pelas células T γδ obtidas de baço de ratos Lewis normais.

Quando se quantificou a produção da citocina das células T γδ de animais imunizados, no entanto, o padrão observado foi semelhante ao apresentado pelas células T e macrófagos apenas no que se refere ao 20^0 dia após a imunização, quando se verifica acentuado decrescimo da produção de TGF β ($p<0,05$). Os níveis observados no 10^0 dia (doença em atividade) e no 30^0 dia (doença em regressão) não diferem em termos estatísticos ($p>0,05$).

Indução da Apoptose dos Clones Auto-reativos à MBP nas diferentes fases clínicas da EAE

Com o intuito de explicar os mecanismos pelo qual o TGFβ, liberado, pelo menos em parte, pelas células T TCR γδ protege os animais da EAE,

estudamos, o efeito dessa citocina, sobre os clones autorreativos. Na **figura 6** apresentamos os níveis de apoptose de animais normais e imunizados com GP-MBP/CFA acompanhados ao longo da evolução clínica da EAE.

As células esplênicas de ratos Lewis normais ou imunizados com GP-MBP/CFA foram retiradas nas diferentes fases da doença e estimuladas *in vitro* com MBP. Os níveis de apoptose foram quantificados. Quando se analisa os níveis de apoptose das células esplênicas normais (c e d) pode-se verificar um discreto aumento da porcentagem de apoptose pelas células normais cultivadas em presença de MBP (6,15%). Células retiradas no décimo dia, quando a severidade da EAE é máxima, apresentaram moderada porcentagem de apoptose (5,63%) na ausência do estímulo com MBP *in vitro* (e / f). Quando se analisa a porcentagem de apoptose das células retiradas no vigésimo dia, com tudo, significativo aumento dos níveis (14,4%) se observou, quando as células foram estimuladas *in vitro* com MBP (g e h). Praticamente não se observa apoptose nas células esplênicas que foram retiradas no trigesimo dia, ou seja, 10 dias após a recuperção clínica da EAE (e / h).

Níveis de apoptose de células esplênicas de animais imunizados com GP-MBP e animais normais cultivados na presença de TGFβ e MBP.

Este grupo de experimentos foi realizado com o objetivo de estudar a participação do TGFβ, secretado em maior quantidade na fase de recuperação da EAE, sobre a indução de apoptose dos clones autorreativos. Na figura 8

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

mostramos os dados referentes às culturas de células de animais imunizados com GP-MBP/CFA, retirados na fase de recuperação da doença, cultivados na presença de TGFβ (a), onde se verifica significativo aumento da porcentagem de apoptose (33%) quando se compara ao controle do experimento (11%). Na figura 10, os dados estão apresentados como a diferença entre as porcentagens (a – c) ou seja, 22%. A figura b, contida na figura 8, mostra que há redução dos níveis de apoptose quando as células sensibilizadas à MBP, são cultivadas tanto na presença de TGFβ como do neuro-antígeno.

No entanto, considerando-se a diferença entre o experimento base (13%), ainda se tem uma resposta aumentada em relação a população de células sensibilizadas estimuladas com MBP (c) ou seja, 7%. Esta diferença se torna mais expressiva quando é comparada aos resultados obtidos em animais normais. Nas figuras 9 e 10 podemos observar que as células normais quando cultivadas na presença de MBP *in vitro* não apresentam apoptose, quando se considera a diferença entre as porcentagens e os níveis de base (0% - a – d). Quando se compara os níveis de apoptose das células normais e células sensibilizadas à MBP cultivadas na presença de TGFβ mostramos que essa citocina foi capaz de induzir consideravel aumento da morte celular em imunizados, na fase de recuperação da doença. Os dados são significativos quando se compara com os níveis de apoptose obtidos quando as células são cultivadas a´penas na presença do neuro-antígeno. Muito interessante foi observar que na presença do neuro-antígeno e TGFβ houve redução dos níveis de apoptose nas células dos animais imunizados, mas pôde-se observar aumento discreto dos níveis nas células de indivíduos normais (figura 10).

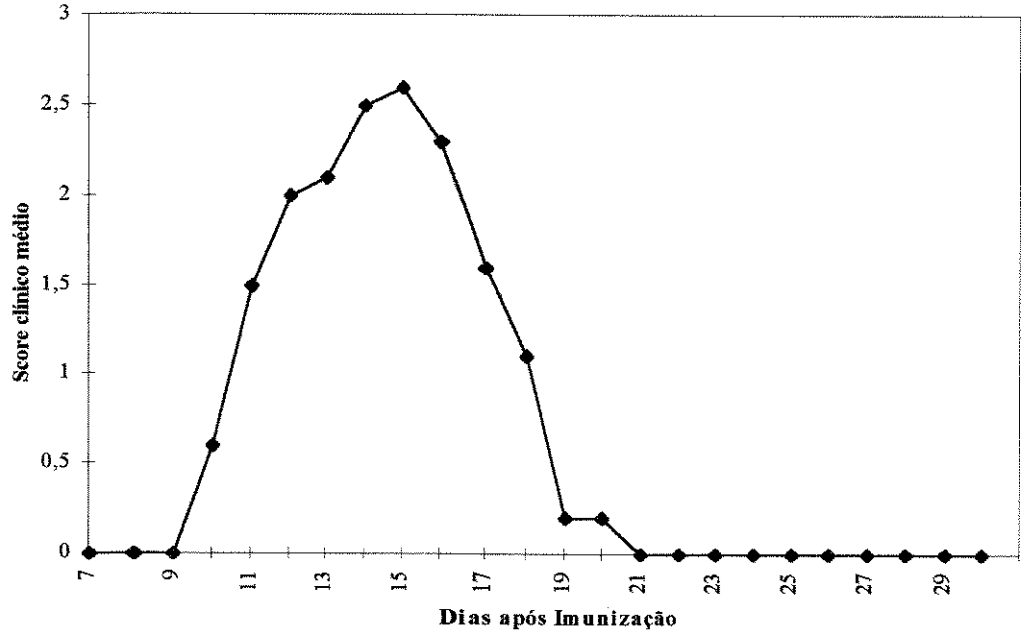


Figura 1. Evolução clínica da EAE em ratos Lewis imunizados com GP-MBP/CFA.

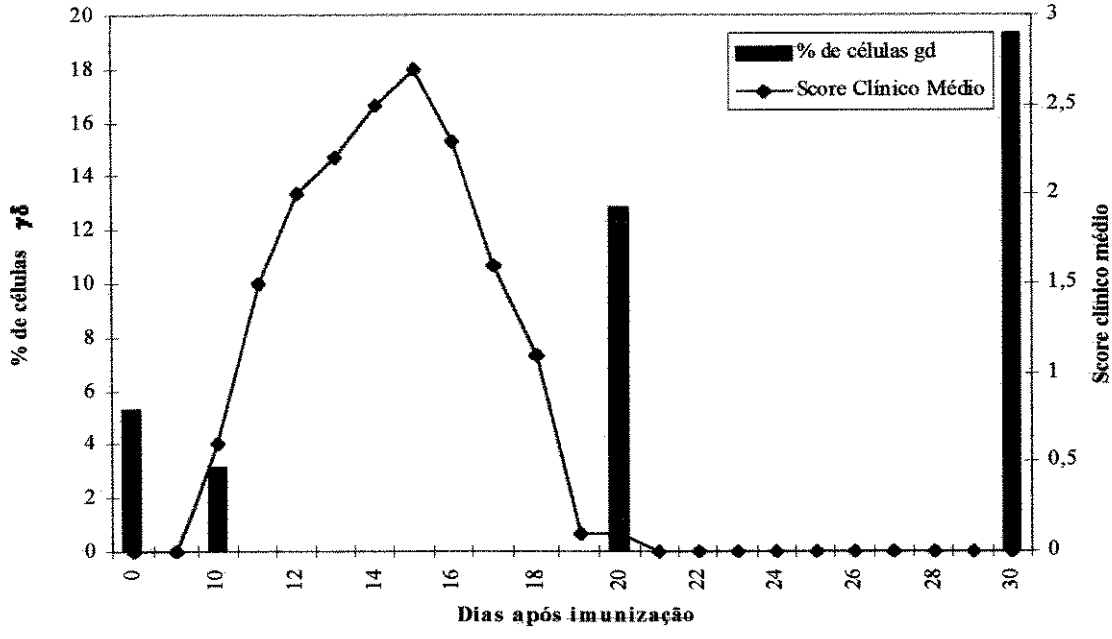


Figura 2. Evolução clínica da EAE e a porcentagem de células T TCR γδ de ratos Lewis imunizados com GP-MBP/CFA.

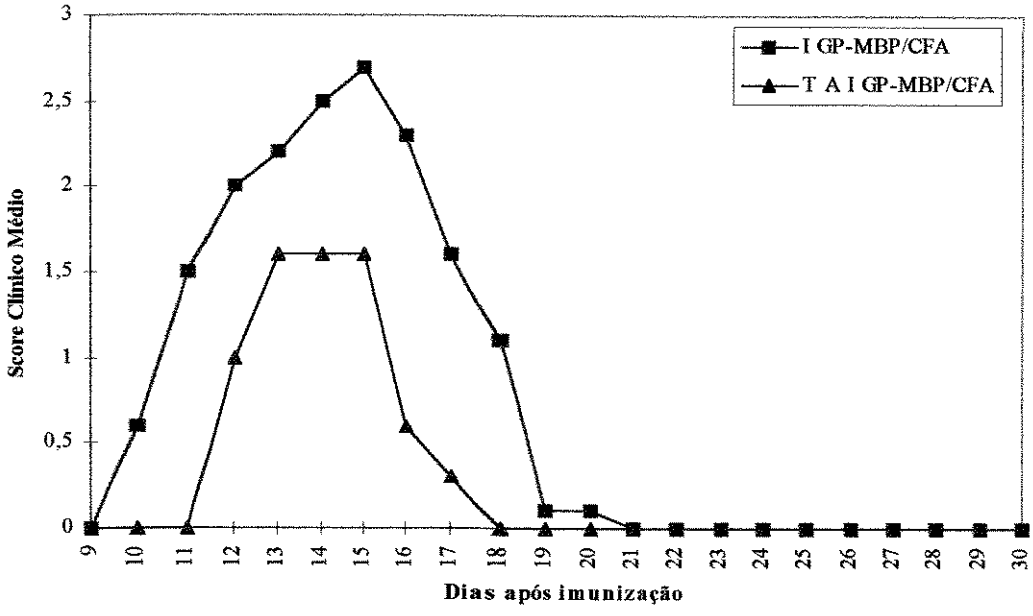


Figura 3. Evolução clínica da EAE induzida em ratos Lewis que receberam tranferência adotiva de linfócitos T TCR γδ (T A I GP-MBP/CFA) antes da imunização com o neuroantígeno, comparada com o grupo controle (I GP-MBP/CFA).

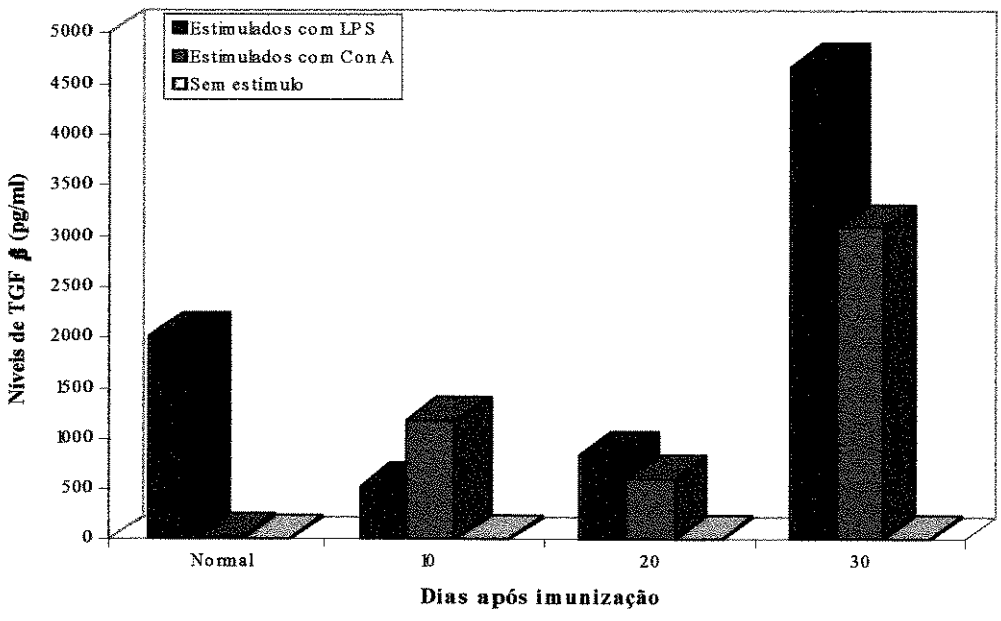


Figura 4.Níveis de TGFβ obtidos do sobrenadante de cultura de linfócitos de ratos Lewis normais e imunizados com GP-MBP/CFA, estimulados com LPS, Con A ou sem estímulo, 10, 20, e 30 dias após a imunização.

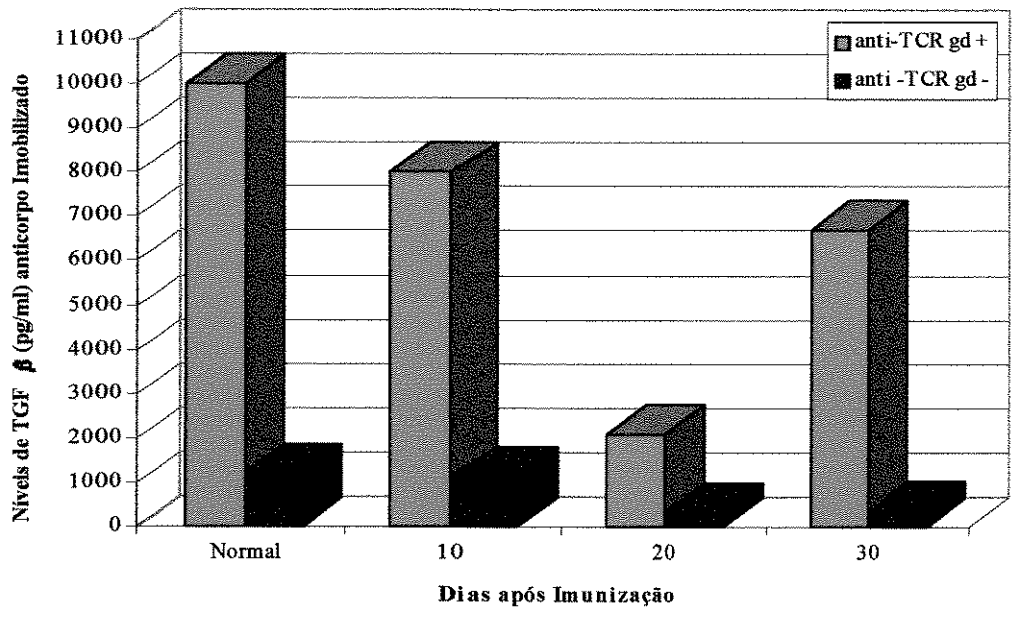
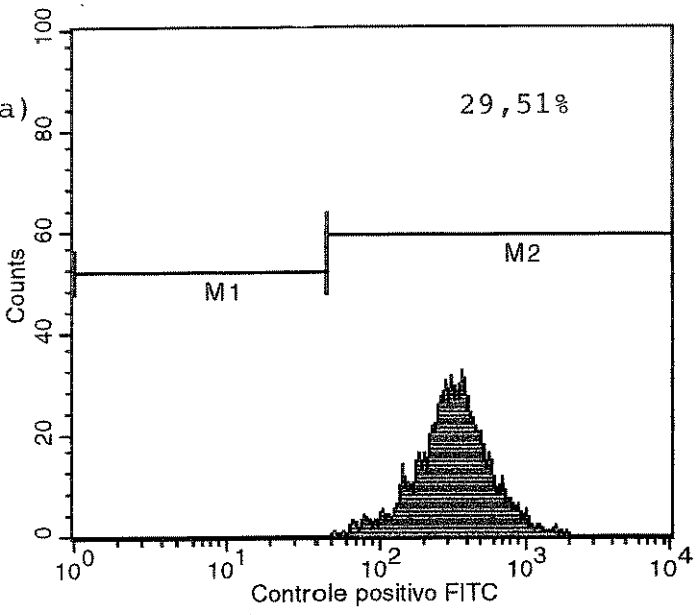
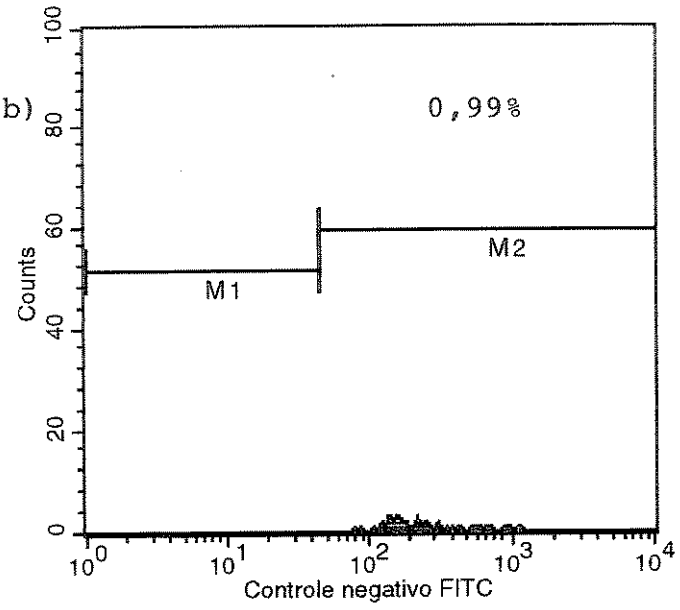
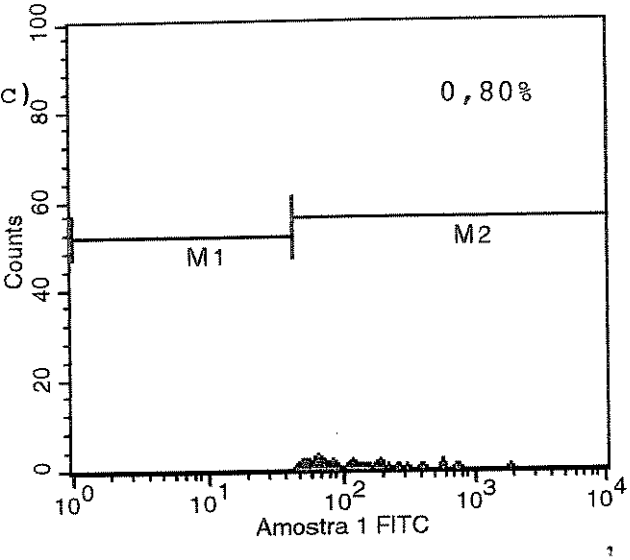
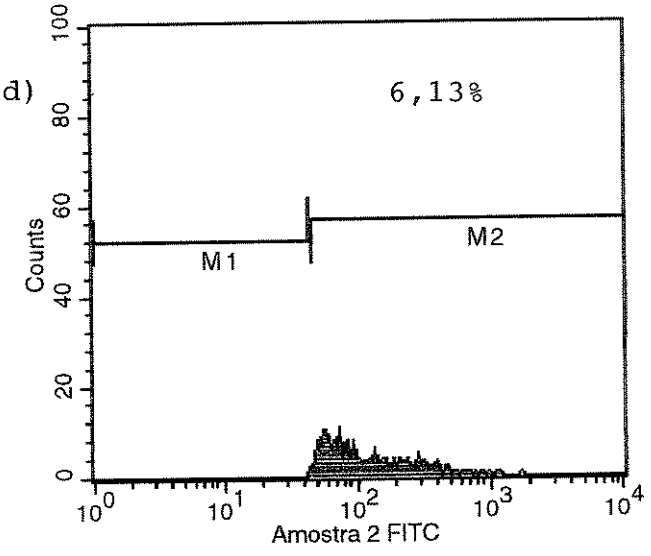


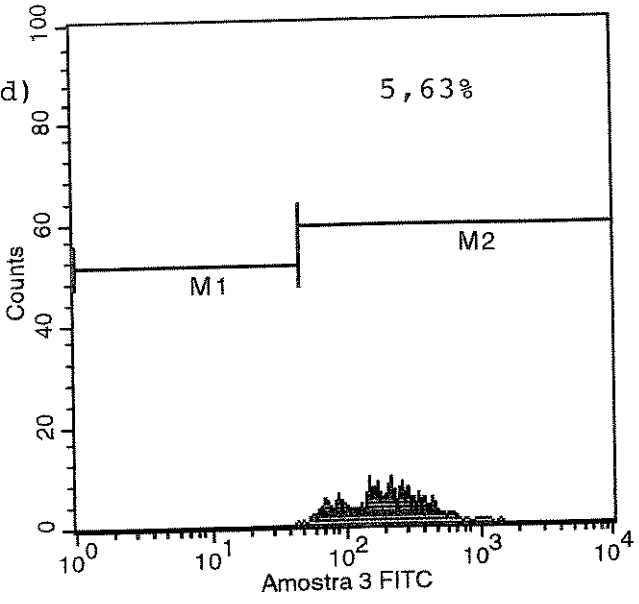
Figura 5. Produção de TGF β pelas células T TCR γδ de ratos Lewis. As células foram cultivadas sobre anticorpo monoclonal anti-γδ imobilizado nas microplacas e os níveis de TGFβ quantificados.

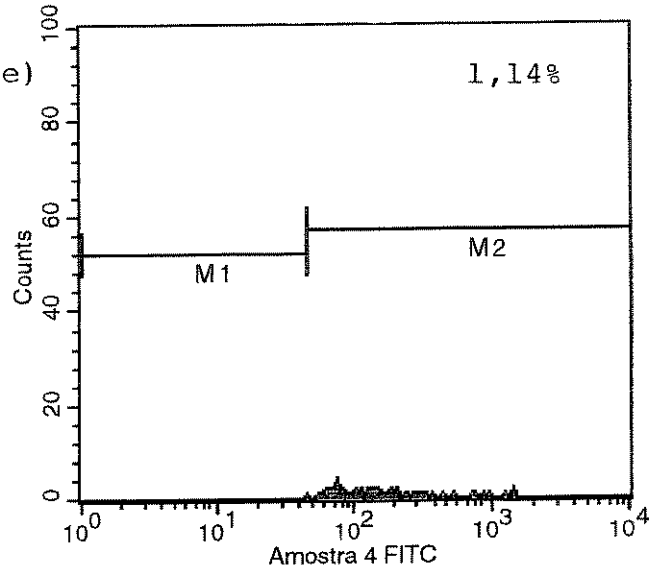

a)
29,51%
M1
M2
Counts
Controle positivo FITC


b)
0,99%
M1
M2
Counts
Controle negativo FITC


c)
0,80%
M1
M2
Counts
Amostra 1 FITC


d)
6,13%
M1
M2
Counts
Amostra 2 FITC


d)
5,63%
M1
M2
Counts
Amostra 3 FITC


e)
1,14%
M1
M2
Counts
Amostra 4 FITC

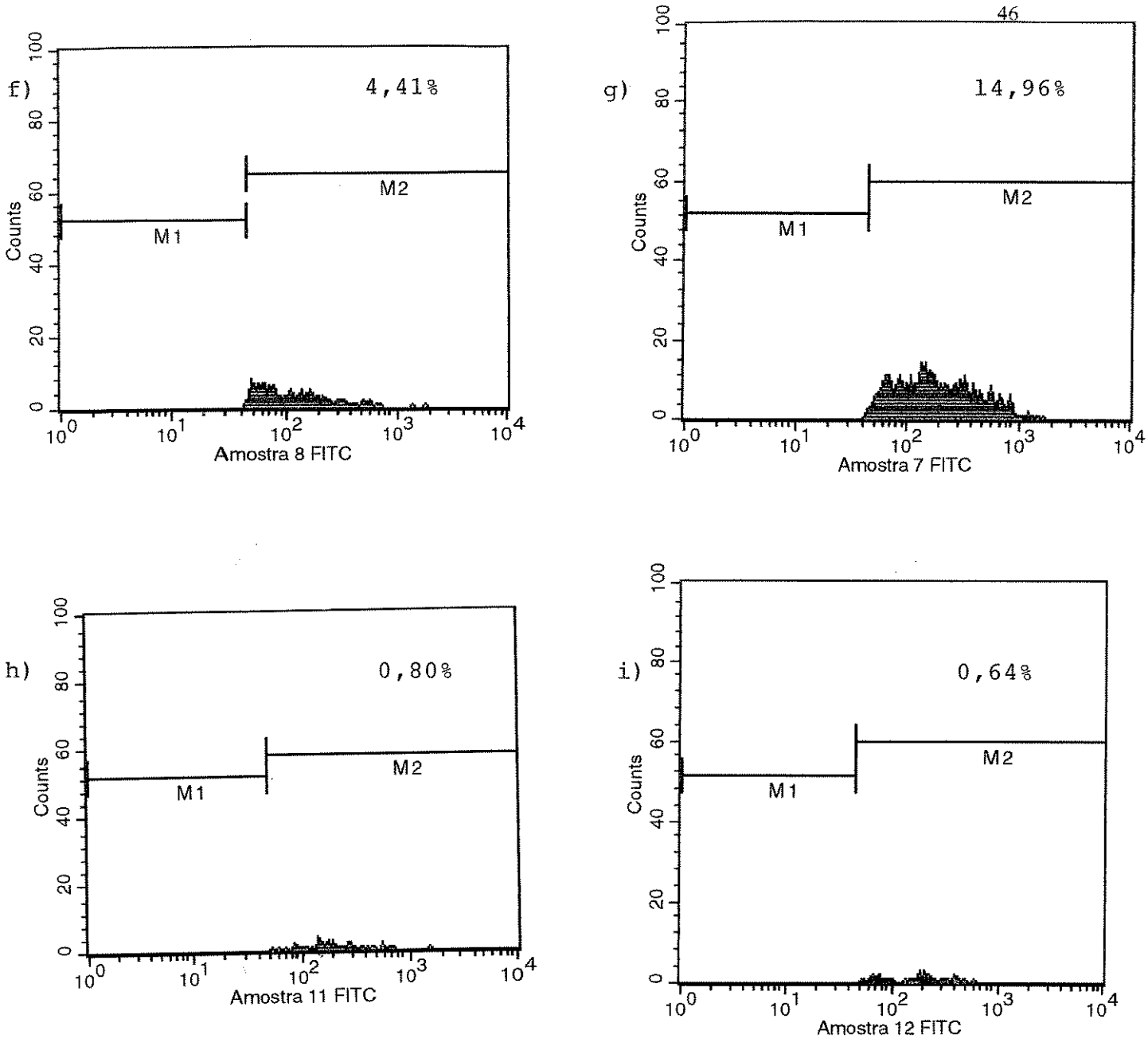


Figura 6. Níveis de apoptose dos clones de linfócitos autorreativos à MBP de animais normais e imunizados com GP-MBP/CFA, 10, 20 e 30 dias após imunização: (a) Controle positivo; (b) Controle negativo; (c) Baço normal sem estímulo; (d) Baço normal estimulado com MBP; (e) Baço de animal imunizado (10 dias) sem estímulo; (f) Baço de animal imunizado (10 dias) estímulados com MBP; (g) Baço de animal imunizado (20 dias) sem estímulo; (h) Baço de animal imunizado (20 dias) estímulados com MBP; (i) Baço de animal imunizado (30 dias) sem estímulo; (j) Baço de animal imunizado (30 dias) estímulados com MBP.

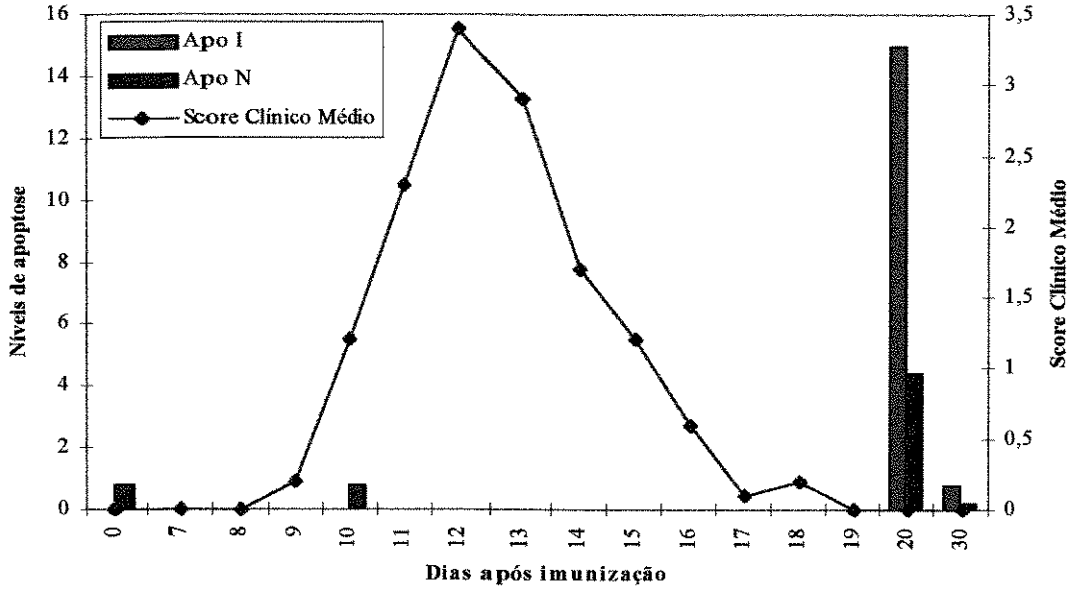


Figura 7. Evolução clínica da EAE e a porcentagem de apoptose de linfócitos de ratos Lewis normais (Apo N) e imunizados com GP-MBP/CFA (Apo I).

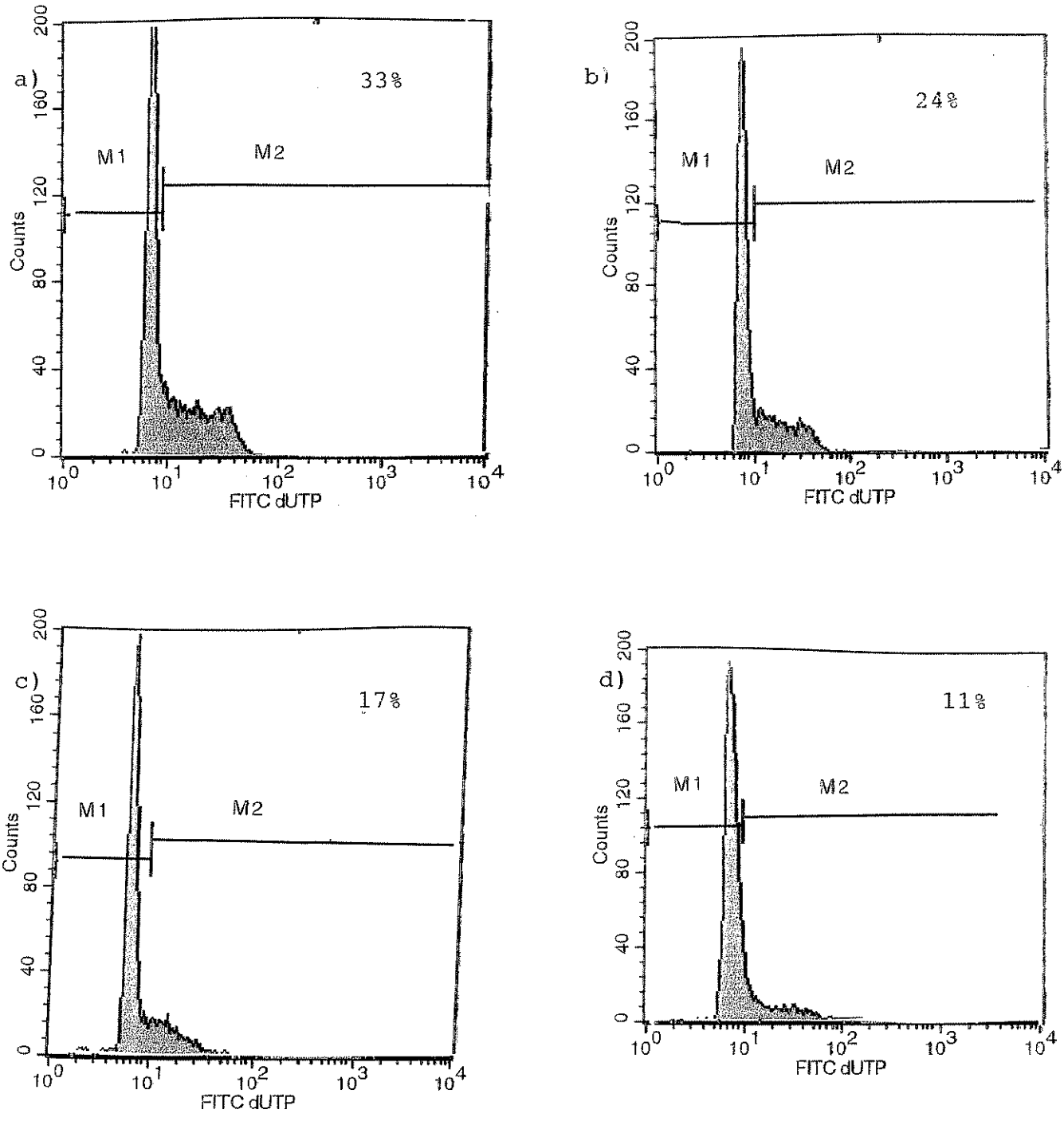
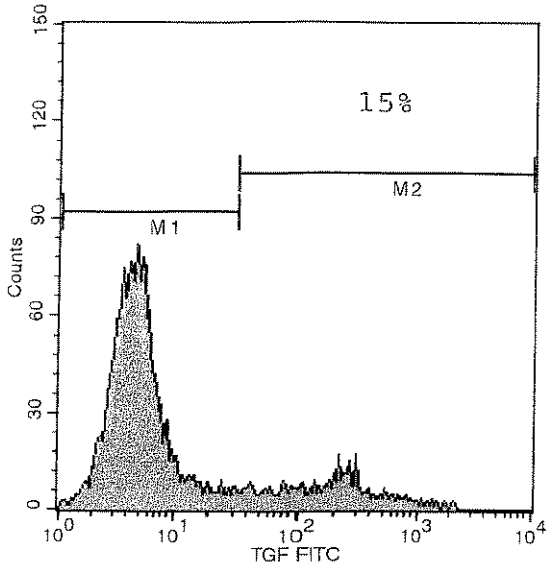
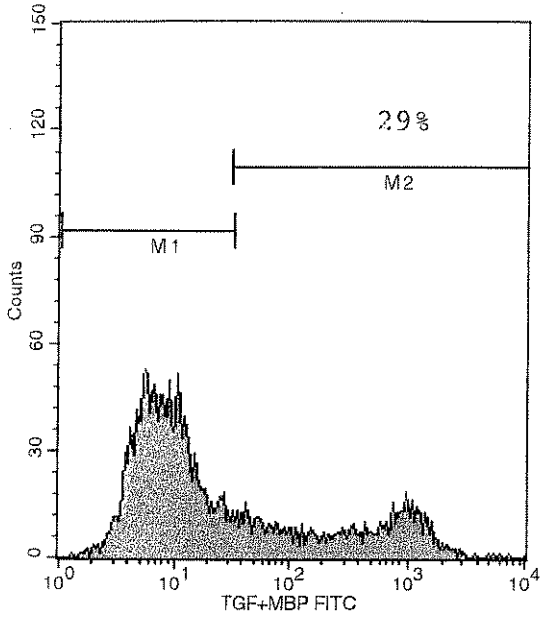
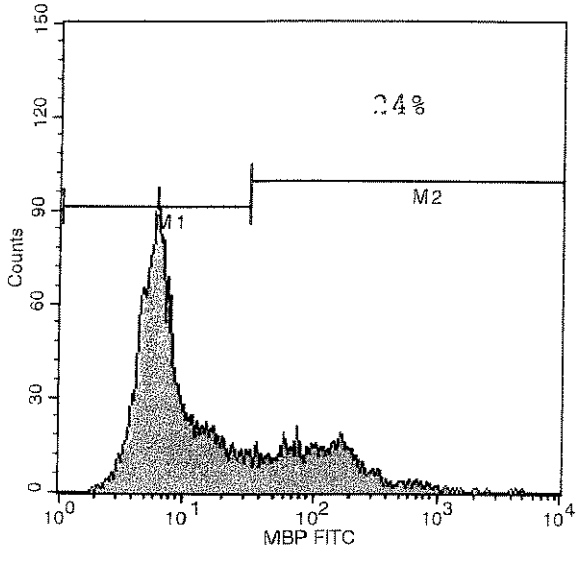


Figura 8. Níveis de apoptose de células esplênicas de animais imunizados com GP-MBP/CFA, retirados na fase de recuperação da doença e cultivados na presença de TGFβ e MBP: (a) TGFβ ; (b) TGFβ + MBP; (c) MBP; (d) sem estímulo.







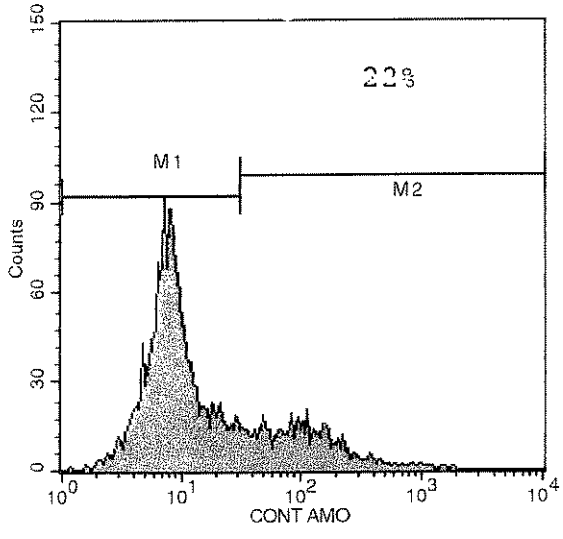


Figura 9. Indução de apoptose de células esplênicas de animais normais cultivados na presença de TGFβ e MBP.

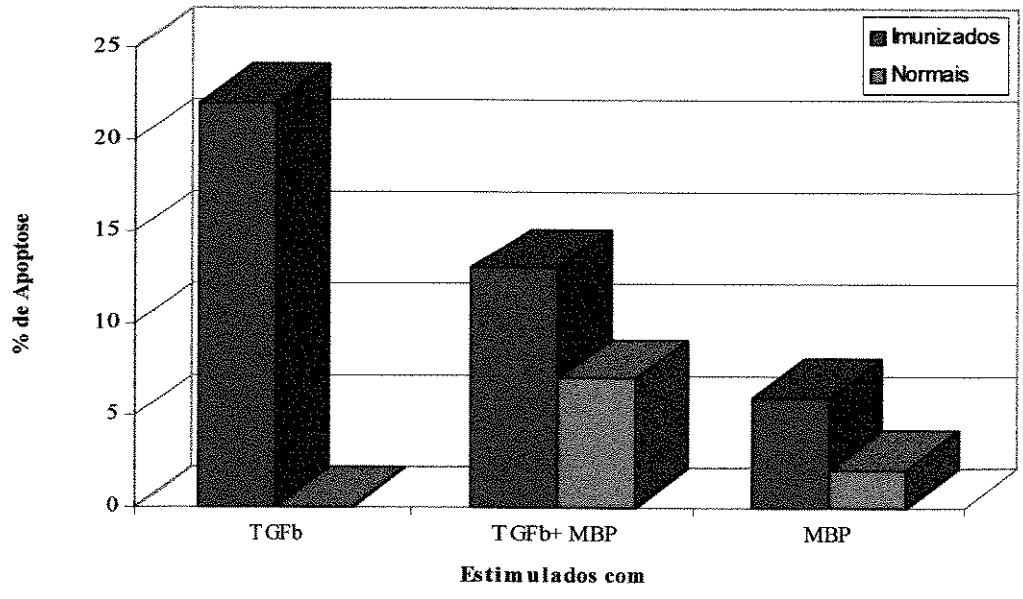


Figura 10 . Níveis de apoptose de células esplênicas de ratos Lewis imunizados com GP-MBP/CFA e de animais normais cultivados na presença de TGFβ (20ng/ml) e MBP (25μg/ml).

V.DISCUSSÃO

A Encefalomielite Experimental Autoimune induzida em ratos Lewis é caracterizada por um período monofásico de exacerbação da doença. Como mostramos na figura 1, após a inoculação do neuro-antígeno, o animal apresenta um surto muito severo e se recupera completamente, não voltando a apresentar a exacerbação, mesmo que se faça outro desafio com o neuro-antígeno (WELCH *et al.* 1980; WILLENBORG, 1979).

Os mecanismos responsáveis pela recuperação da EAE ainda não estão totalmente entendidos, mas a importância do conhecimento dos mesmos é óbvia, uma vez que o controle dos surtos na Esclerose Múltipla, tem sido o motivo de estudo de quase todos os grupos de pesquisa preocupados com esta doença.

A maioria dos autores concorda que o período de exacerbação, tanto da EAE como da Esclerose Múltipla está relacionado com a perda da função supressora, que o sistema imune normalmente exerce sobre os clones de linfócitos reativos à mielina e/ou aos seus componentes. A correlação entre o período de recuperação da EAE e ativação da função supressora ou a deleção dos clones autorreativos, tem sido proposta por alguns grupos de pesquisadores. Com o melhor entendimento das interações celulares e a biologia das citocinas ficou muito difícil entender os resultados desses complexos mecanismos, que resultam na tolerância aos próprios componentes, como função de uma única célula supressora. Assim, entende-se atualmente, que os mecanismos de tolerância aos antígenos próprios

resultam de complexas interações entre o antígeno, a forma como o mesmo e apresentado e os produtos celulares decorrentes dessa apresentação.

Vários mecanismos foram propostos para explicar a tolerância aos autoantígenos, que leva à redução da severidade da EAE, no modelo experimental ou no homem. A imunorregulação através da polarização da produção de determinadas citocinas, a anergia e deleção dos clones autorreativos são os melhores estudados.

Está bem aceito na literatura, que a EAE é causada por linfócitos T CD4 do tipo Th1 (KUCHROO *et al.* 1993). Na administração oral de derivados da mielina, que visa induzir tolerância aos neuroantígenos, foi demonstrado que a administração de MBP levava a ativação de células T CD8+ associada à redução da severidade da EAE em ratos Lewis (LIDER, *et al.* 1989). Eventualmente, demonstrou-se que essa supressão se devia à maior produção de TGFβ (MILLER *et al.* 1993). Em trabalho recentemente realizado em nosso laboratorio, observou-se que a indução de tolerância oral à MBP inibe a produção de citocinas pelas células Th1, não interferindo com a produção de citocinas pelos linfócitos Th2 (OLIVEIRA, 1997).

A inibição da EAE está associada também com a anergia dos clones autorreativos. Foi demonstrado que a inibição da ligação das moléculas co-estimulatórias B7.1 (CD80) e B7.2 (CD86) com o receptor CD28, induzia um estado de anergia clonal, resultando na proteção contra a doença. Os autores mostraram que este estado de anergia, favorecia a produção de citocinas Th2, que estão envolvidas na redução da severidade da EAE (KUCHROO & NICKOLSON, 1996).

Esses mecanismos podem estar agindo simultaneamente. Na indução de tolerância oral, a ativação de mais de um mecanismo foi descrito. CHEN *et al* (1996) mostraram que altas doses do antígeno ativam tanto anergia como a apoptose dos clones autorreativos. MC COMBE *et al.* (1996) mostraram que a recuperação espontânea da fase aguda da EAE em ratos Lewis estava associada com a perda de linfócitos T do sistema nervoso central, visualizando no local da inflamação a presença de células apoptóticas, sugerindo que a eliminação de células T por apoptose poderia contribuir para a recuperção do animal.

Paralelamente às atividades atribuídas aos linfócitos T TCR $\alpha\beta$, nos últimos cinco anos, mais e mais autores vêm descrevendo a possível função supressora exercida pelas células T $\gamma\delta$ tanto nos modelos de tolerância como na autoimunidade. Nas doenças autoimunes do sistema nervoso central, a participação das células T $\gamma\delta$ tem gerado dados conflitantes na literatura. Devido à presença de células T $\gamma\delta$ nas lesões desmielinizantes, o envolvimento dessa população celular na patogenia da doença foi proposto por alguns estudiosos. No modelo experimental, RAJAN *et al.* (1996) mostraram que a depleção dos clones de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ de camundongos com EAE leva a uma acentuada melhora clínica, implicando essas células na patogenia da doença. Na Esclerose Múltipla, SELMAJ *et al.* 1991) demonstraram a presença de linfócitos T TCR $\gamma\delta$ ao redor dos oligodendrócitos, em pacientes na fase ativa da doença. Em estudo posterior foi demonstrado que esses linfócitos eram predominantemente do tipo TCR Vδ1 ou TCR Vδ2 (WUCHERPFENNIG *et al.* 1992).

A simples presença das células T γδ nas lesões desmielinizantes, no entanto, não necessariamente implica estas células na gênese da doença, Deve-se levar em conta, que embora o repertório da população de linfócitos T γδ, seja mais restrito que o das células T αβ, as subpopulações de T γδ existem, inclusive, com padrão de migração diferentes. PETERMAN *et al.* (1993) mostraram que o padrão de células T γδ envolvidas na destruição tecidual da articulação de pacientes com Artrite Reumatóide, era diferente da população circulante.

Dados obtidos em nosso laboratório, assim como no de outros grupos, apontam para importante função supressora exercida pelas células T γδ. DOMENICI, I997 mostrou que a depleção *in vivo* de linfócitos T TCR γδ, na EAE induzida em camundongos SJL, levava a significativo aumento da gravidade da EAE. Demonstrou também que a depleção das células T γδ levava a aumento da síntese de anticorpos anti-MBP e à proliferação de linfócitos específicos para a MBP mostrando que a retirada dessa população celular, aumentava a resposta blastogênica de clones autorreativos. Paralelamente, a retirada das células T γδ induzia aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como TNF α e redução da síntese das citocinas com efeito anti-inflamatório, no caso o TGFβ. Dando continuidade a essas observações, fomos capazes de demonstrar que a ativação das células T TCR γδ, por antígenos derivados de Micobactérias, levava a aumento da população das células T γδ com acentuada redução da severidade da EAE (DIAZ BARDALES *et al.* 1997). Em concordância com essas observações, KOBAYASHI *et al.* (1996) mostraram o agravamento da doença pela

administração *in vivo* de anticorpo monoclonal anti-T TCR γδ, com concomitante aumento dos níveis de IFN γ, citocina com efeito pró-inflamatório, implicada na gênese da EAE. Todos estes dados concordam com a atividade supressora das células T γδ no modelo da EAE, e mostram a coêrencia dos dados que apresentamos na Figura 2 e 3, onde pode ser observado significativo aumento da população de células T γδ no período de recuperação da doença. Observa-se também redução da severidade da EAE quando as células T γδ foram transferidas adotivamente, antes da indução da doença.

Diante dessas observações, nossa próxima preocupação foi estudar a produção de TGFβ tanto nas diferentes fases clínicas da doença, como pela população de linfócitos T TCR γδ +.

A produção de TGFβ, no modelo da EAE, não tem seu efeito benéfico somente no sentido de suprimir a resposta imune dos clones auto-reativos aos neuro-antígenos mas está envolvida na diferenciação dos oligodendrócitos participando, portanto, nos mecanismos de remielinização (BENVENISE *et al.* 1997). Os dados apresentados na figura 4, portanto, estão coerentes com a literatura, pois mostram significativo aumento da produção de TGFβ na fase de recuperação da EAE induzida nos ratos Lewis. O TGFβ pode ser produzido por uma variedade de células. Os macrófagos quando ativados produzem considerável quantidades de citocinas (ASSOIAN *et al.* 1987). A produção de TGFβ tanto pelos linfócitos T CD4+ (CHEN et al. 1994) como CD8+ foi demonstrada após a indução de tolerância, com administração oral de MBP (MILLER *et al.* 1993). Nos dados apresentados, as células tanto foram

estimuladas *in vitro* com lipopolissacáride para ativar a produção de TGFβ pelos macrófagos, como por mitógeno de célula T (ConA), analisamos também a produção espontânea, ou seja a produção fisiológica, que independe de estímulo *in vitro*. Tivemos como resultado o aumento significativo dessa citocina, na fase de recuperação da doença, quando as células foram estimuladas pelos dois tipos de mitógeno. Vale a pena mencionar que este aumento foi gradativo, ou seja, o pico de produção de TGFβ foi observado dez dias após a recuperação clínica dos animais.

No sentido de confirmar a participação das células T γδ na produção de TGFβ, foram retirados os baços de ratos Lewis nas diferentes fases da doença, as células T γδ foram separadas por *panning* e estimuladas através de *crosslinking*, do receptor γδ com o anticorpo monoclonal anti T TCR γδ imobilizado na placa de cultura. Este procedimento é normalmente utilizado para a ativação das células T através de estímulo dos receptores para o antígeno e foi previamente descrito tanto para os receptores de células T TCR αβ positivas, como para os linfócitos que expressam os receptores T TCR γδ (KUHNLEIN, *et al.* 1994). Verificamos que a estimulação com o anticorpo específico levou a aumento da produção de TGFβ tanto no grupo de animais imunizados com a MBP como nos animais controle. Os níveis de TGFβ do grupo de animais em recuperação não diferiram em termos estatísticos, do grupo de animais normais. Células que produzem altos níveis de TGF β *in vitro*, normalmente têm sua atividade e proliferação inibida pela própria liberação dessa citocina (SANTOS *et al.* 1994), desta forma é necessário

esclarecer que nesse grupo de experimentos as células foram cultivadas em meio enriquecido com IL-2.

Esse grupo de experimentos mostra que mesmo as células T γδ de animais normais têm capacidade de produzir níveis aumentados de TGF β, justificando desse modo a função supressora que exerce no modelo da EAE. Esses dados estão em concordância com os achados de SUZUKI *et al.* 1995 que verificaram que os linfócitos intraepiteliais TCR γδ da mucosa uterina, produzem elevados níveis de TGF β, no sentido de suprimir a resposta imune na interface mãe-feto. São dados que explicam também os resultados da figura 3 onde mostramos que a transferência adotiva de linfócitos intraepiteliais do intestino delgado, podem reduzir a severidade da EAE. Nossas observações são reforçadas pelas de GORCZYNSKI *et al.*(1996), que mostraram que a transferência adotiva de linfócitos T TCR γδ levava à maior aceitação de transplante de pele, devido a aumento da produção de TGF β por essa população celular.

Paralelamente à síntese de citocinas com efeito imunorregulador, a deleção de clones autorreativos à MBP, por apoptose, pode resultar na recuperação da EAE (MC COMBE *et al.* 1996; PENDER *et al.*, l991; PENDER *et al.*, l992; SCHMIED *et al.* 1993, TABI *et al.* 1994; TABI *et al.* 1995). Na **figura 7** estão os dados referentes à nossa experiência no estudo desse mecanismo. Fomos capazes de mostrar, a exemplo dos demais autores, que há significativo aumento da apoptose dos clones sensibilizados à MBP na fase

de recuperação da EAE. Nosso próximo passo foi associar a deleção dos clones autorreativos com o aumento da produção de TGF β.

Sabe-se que a apoptose pode ser induzida ativamente pela ação dos glicocorticóides (NGUYEN *et al.* 1997), pela ação de toxinas bacterianas, *heat shock protein* e estimulação dos receptores de antígeno, ação de vírus, por insulto, como pela ação de baixas doses de radiação; as células podem ainda morrer pela privação de fatores de crescimento e pela ação das citocinas (LEITE *et al.* 1996).

Mais e mais a literatura vem mostrando o envolvimento das citocinas na indução ou resgate da apoptose (GOLD *et al.* 1997). Com relação ao TGFβ, há uma série de evidências da participação dessa citocina na indução de apoptose em vários tipos celulares inclusive os linfócitos(GOLD *et al.* 1997). Desta forma, conduzimos nossos experimentos no sentido de verificar *in vitro* se a produção aumentada de TGFβ, observada na fase de recuperação da EAE, estava envolvida na deleção de clones de linfócitos autorreativos à MBP. Na figura 10 mostramos que linfócitos de animais previamente imunizados com MBP/CFA, retirados na fase de recuperação da doença, quando cultivados tanto na presença de TGFβ como do auto-antígeno têm aumentada, de forma signficativa, a morte celular.

Nossos dados mostram que a adição exógena de TGFβ às culturas de células esplênicas de animais imunizados com GP-MBP/CFA leva a um significativo aumento dos índices de apoptose, quando comparado aos níveis apresentados pelas células normais. Muito interessante foi observar que a

adição do neuro-antígeno (MBP) à essas céluals, resultam na redução dos níveis de apoptose, quando comparada à observada com a adição de TGFβ . Sabe-se que a IL-2 é responsável pelo resgate da morte celular programada dos linfócitos T. Trabalhos clássicos mostram que a retirada de IL-2 leva clones de linfócitos T a entrarem em apoptose (COHEN, 1991). È possível que a IL-2, produzida na fase de ativação das células T pelo neuro-antígeno, seja responsável pela redução dos níveis de apoptose, induzida pelo TGFβ . É importante notar que mesmo levando-se em consideração esses mecanismos, a adição do neuro-antígeno também foi capaz de induzir a apoptose em níveis superiores aos observados para células normais. Fomos capazes de observar também, que mesmo células normais quando estimuladas por MBP na presença de TGFβ apresentam níveis discretos de células no processo de apoptose. É possível que algumas células autorreativas à MBP, que normalmente circulam mesmo em indivíduos normais, possam, explicar este fenômeno. No entanto, a maior importância fisiológica para o mecanismo de apoptose deve ser a deleção dos clones autorreativos à MBP.

Os dados aqui apresentados não são suficientes para estabelecer uma relação direta entre as células T γδ e a deleção dos clones autorreativos. É possível que outros mecanismos estejam envolvidos, uma vez que a função citotóxica dessa população celular também foi descrita (HAAS *et al.* 1993). No entanto, mostramos que as células T γδ contribui para maior produção de TGFβ e essa citocina por sua vez, esteja envolvida na deleção dos clones autorreativos à MBP.

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que as interações entre as células e os produtos secretados são extremamente complexos e diferentes mecanismos podem estar atuando simultaneamente, resultando tanto na estimulação como na deleção dos clones autorreativos. A polarização de determinados mecanismos podem resultar no controle ou deleção desses clones muitas vezes refletindo clinicamente na recuperação dos indivíduos. São observações que eventualmente poderão ser utilizadas no entendimento dos surtos observados na Esclerose Múltipla humana.

VI. CONCLUSÕES

Os dados apresentados no presente trabalho nos permitiram concluir que:

1. A população de linfócitos T TCR γδ está significativamente aumentada no período de recuperação da EAE, quando comparada com a porcentagem do período inicial da doença ou com a apresentada pelos indivíduos normais.

2. Os níveis de TGFβ quantificados também variam. Verificamos aumento significativo dessa citocina no período de recuperação da EAE.

3. Os linfócitos T TCR γδ secretam TGFβ, tanto de animais normais como dos animais imunizados com GP-MBP/CFA *in vitro*, quando ativados por anticorpo anti-TCR γδ.

4. A deleção dos clones autorreativos à MBP, por apoptose, é um dos processos de eliminação de linfócitos que ocorre no período de recuperação da EAE induzida em ratos Lewis.

5. Células sensibilizadas à MBP, quando cultivadas *in vitro* na presença de TGF β, apresentam aumento dos níveis de apoptose.

APÊNDICE

TABELA I. Evolução clínica da EAE em Ratos Lewis.

dias após imunização	animais						
	I	II	III	IV	V	VI	SCM
9	0	0	0	0	0	0	0
10	1	1	0	0	0	2	0,6
11	2	2	2	-	3	-	1,5
12	3	3	3	-	3	-	2
13	3	4	3	-	3	-	2,2
14	3	4	4	-	4	-	2,5
15	4	4	4	-	4	-	2,7
16	4	3	3	-	4	-	2,3
17	4	2	2	-	2	-	1,6
18	4	1	1	-	1	-	1,1
19	-	0	0	-	1	-	0,1
20	-	0	0	-	1	-	0,1
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
27	-	0	0	-	0	-	0
28	-	0	0	-	0	-	0
29	-	0	0	-	0	-	0
30	-	0	0	-	0	-	0

TABELA II. Porcentagem dos linfócitos T TCR γδ de ratos Lewis imunizados com GP-MBP/CFA (50 μg/ml) 10, 20 e 30 dias após imunização.

Dias aós imunização	animais	% células T TCR γδ	Média e Desvio Padrão
10	I	2,2	3,1/ 1,4
	II	2	
	III	3,6	
	IV	2,4	
	V	6,2	
	VI	2,3	
20	I	5,2	12,8/6,6
	II	4,8	
	III	11	
	IV	19	
	V	22,8	
	VI	14,2	
30	I	16,6	19,3/9,5
	II	8,7	
	III	30,12	
	IV	22,4	
	V	31,2	
	VI	6,6	

TABELA III. Porcentagem de linfócitos T TCR γδ de ratos Lewis normais.

animais	% células T TCR γδ
I	2,8
II	3,5
III	6,6
IV	10,5
V	4,8
VI	3,6
Média e Desvio Padrão:	5,3/2,6

TABELA IV. Níveis de TGFβ (pg/ml) obtido no sobrenadante de cultura de linfócitos de ratos Lewis normais e imunizados com GP-MBP/CFA, estimulados com LPS, ConA ou sem estímulo 10, 20 e 30 dias após a imunização.

N.D. = Não detectável

Dias após imunização	Animais	Estimulados com LPS	Estimulados com ConA	Sem estmimulo
Normais	I	N.D.	N.D.	N.D.
	II	10	50	N.D.
	III	5000	50	50
	IV	5000	10	50
	V	1000	50	N.D.
	VI	1000	50	N.D.
		M=2001	M=35	M=16,6
10	I	1000	N.D.	N.D.
	II	50	50	10
	III	100	1000	N.D.
	IV	500	5000	10
	V	500	50	10
	VI	1000	1000	10
		m=525	m=1183	m=6,6
20	I	1000	N.D.	50
	II	1000	10	N.D.
	III	N.D.	1000	10
	IV	1000	1000	50
	V	1000	1000	N.D.
	VI	1000	100	N.D.
		M=833,3	M=604	M=18,3
30	I	1000	500	10
	II	1000	1000	10
	III	10000	10000	N.D.
	IV	1000	1000	N.D.
	V	10000	5000	N.D.
	VI	5000	1000	N.D.
		M=4666,6	M=3083,3	M=3,3

TABELA V. Níveis de TGFβ obtidos no sobrenadante de cultura de linfócitos totais de ratos Lewis normais e imunizados com GP-MBP/CFA, 10, 20 e 30 dias após imunização, estimulados com o anticorpo monoclonal anti TCRγδ, imobilizado na placa de cultura.

dias após imunização	Animais	TGFβ (pg/ml)	
		anti TCR γδ +	anti TCR γδ -
Normal	I	20000	500
	II	5000	N.D.
	III	20000	1000
	IV	N.D.	N.D.
	V	10000	5000
	VI	5000	1000
		M = 10000	M = 1175
10	I	1000	1000
	II	5000	N.D.
	III	20000	1000
	IV	20000	5000
	V	1000	N.D.
	VI	1000	N.D.
		M = 8000	M =1166,6
20	I	500	50
	II	5000	1000
	III	1000	10
	IV	5000	10
	V	N.D.	N.D.
	VI	1000	1000
		M = 2083,3	M = 345
30	I	100	50
	II	5000	N.D.
	III	10000	100
	IV	10000	1000
	V	10000	1000
	VI	5000	10
		M = 6683,3	M = 360

TABELA VI. Evolução clínica da EAE de ratos Lewis que receberam adotivamente os linfócitos T TCR γδ.

Transferência adotiva de células				
Imunizados com GP-MBP/CFA				
dias após imunização	número de ratos			
	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

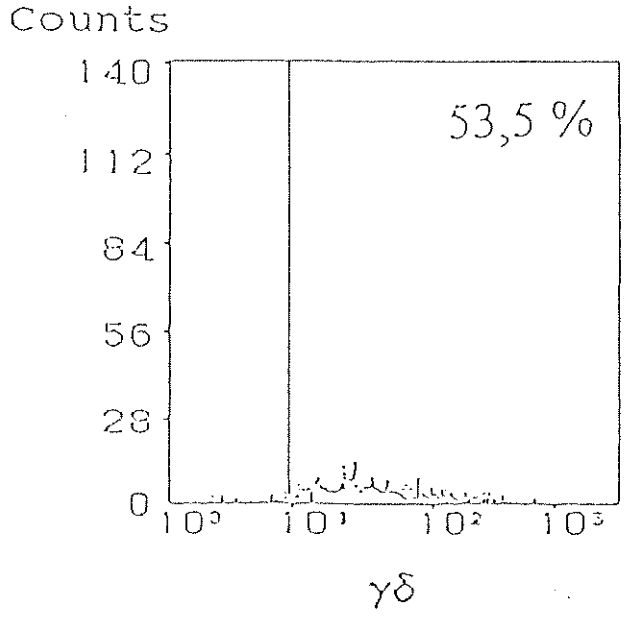


Figura 11. Porcentagem de linfócitos T TCR γδ da mucosa intestinal (IEL)de ratos Lewis usados no experimento de tranfêrencia adotiva de células.

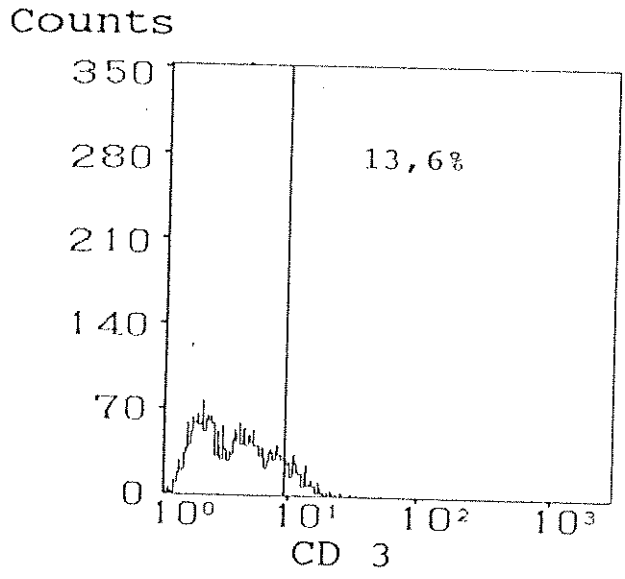


Figura 12 . Porcentagem de linfócitos T TCR γδ antes e após estímulo com Mt.

VII. RESUMO

A EAE é uma doença autoimune causada por linfócitos T CD4 +. Pode ser induzida em animais geneticamente susceptívies através da imunização com mielina ou seus componentes, ou ser transferida passivamente para animais normais através de clones autorreativos aos componentes da mielina. É utilizada como modelo para o estudo da Esclerose Múltipla Humana. A EAE induzida em ratos Lewis é caracterizada por se apresentar como doença monofásica, isto é, após a inoculação com o neuroantígeno, o animal apresenta um único e severo pico da doença, se recupera e não volta mais a apresentar períodos de exacerbação. Vários autores têm demonstrado o envolvimento das células T TCR $\gamma\delta$, citocinas como o TGFβ, e deleção dos clones autorreativos por apoptose no modelo de EAE. Desta forma, no presente trabalho demonstramos que as células T TCR $\gamma\delta$ estão significativamente aumentadas no período de recuperação da doença e que esta população celular secreta TGFβ, citocina que também esta envolvida na recuperação da mesma por seu efeito regulador do sistema imune. Foi também demonstrado que a recuperação do animal é devido a deleção dos clones autorreativos por apoptose.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDA, D.H.; BERAUD, E,; & DEPIEDS, R. Evidence for suppressor cells in Lewis rats experimental allergic encephalomyelitis. *EUR. J. Immunol.*, **7**:620-623, 1977

ALLISON, J.P. γδ T cell development. Current Opin. Immunol., **5**: 241-246, 1993.

ALVORD, E.; KIES, M. & SUCKING. Experimental Allergic Encephalomyelitis- A useful Model for Multiple Sclerosis. Alan R. Liss, New York, 1984.

ASSOIAN, R.K.; FLEWIDELYS, B.E.; STEVENSON, H.C.; MILLER, P.J.; MADTES, D.K.; RAINES, E.W.; ROSS,R. & SPORN, M.B. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrofages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 6020-6024, 1987.

BACHMAIER, K.; PUMMERER, C.; SHAHINIAN, A.; IONESCU, J.; NEU, N.; MAK. & PENNINGER, J.M. Induction of Autoimmunity in the Absence of CD28 Costimulation. J. Immunol. **157**: 1752-1757, 1996.

BARRET,T.A.; GAJEWSKI, T.F.; DANIELPOUR, D.;CHANG, E.B.;BEAGLEY,K.W. & BLUESTONE, J.A. Differential function of intestinal intraepithelial lymphocyte subsets. J. Immunol. **149**:1124-1130, 1992.

BENVENISE, E.N. Cytokines: Influence on glial cell gene expression and function. ***In:*** Blalock, J.E **(ed).** Neuroimmunoendocrinolgy . Chem. Immunol. **69**: 31-75, 1997.

BOISMENU, R. & HAVRAN, W.L. Modulação of epithelial cell growth by intraepithelial γδ T cells. Science, **266:**1253,1994.

BORN, W.; _L, L.; DALLAS, A.; BOYMEL, J.; SHIMIC,T.; YOUNG, D.; BRENNAN, P. & O'BRIEN, R. Recognition of a Peptide antigen by heat shock reative γδ T lymphocytes. Science,**249:** 67-69, 1990.

BOURDETTE, D.N.; WHITHAM, R.H.; CHOU, Y.K.; MORRISON, W.J.; ATHERTON, J.; KEMY, C.; LI_ELD, D.; HASHIM, G.A.; OFFNER, H. & VANDENBARK, A.A. Immunity to TCR Peptides in Multiple Sclerosis. I Successful Immunization of pacients With Synthetic Vβ5.2 and Vβ6.1 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. An age-related γδ 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. & 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**: 338-392, I996

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 Vβ 5.2 and Vβ6.1 CDR2 Peptides. J. Immunol. **152:** 2520-2529, 1994.

COHEN, J.J. Programmed cell death in the immune system. Adv.immunol. **50**:55-85, 1991.

COSTA, P.M. Estudo das citocinas produzidas por células do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Múltipla nos surtos e remissões. Tese de Mestrado - UNICAMP 76 f. - 1997.

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.

DIAZ BARDALES, B.M. Modulação da EAE por antígenos derivados de Micobactérias. Tese de Mestrado - UNICAMP 77 F. 1998.

DOMENICI, E.L. Modulação da Encefalomielite Experimental Autoimune pelos linfócitos T γδ Tese de Mestrado. UNICAMP.71 f. 1997.

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

FREEDMAN, M.S.; RUIJS, T.C.G.; SELIN, L.K. & ANTEL, J.P. Peripheral Blood γδ 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 biologicaly 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 γδ T cells. J. Immunol. **153**: 3101-3115, 1994.

FUJIHASHI, K.; TAGUCHI, T.; AICHER, W.K.; McGHee, J.R.; BLUESTONE, J. A.; ELDRIDGE, J.H. & KIYONO, H. Immunoregulatory functions for Murine Intraepithelial lymphocytes: γδ T cell receptor positive (TCR+) T cells abrogate oral tolerance,while γδ TCR+ T cells provide B cell help. J. Exp Med. **175**: 695-707, 1992.

GOLD, R., HARTUNG, H-P & H. LASSMANN T-cell apoptosis in autoimmune diseases: termination of inflammation in the nervous system and other sites with specialized immune-defense mechanisms. Trends Neurosci.**20**: 399-404, I997

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

HACKER, G.; ADAM,S. & WAGNER, H. Interaction between γδT cells and B cells lating IgG proon. Immu84: 105-110, 1995.

HAFLER, D.A., & WEINER, H.L. MS : A CNS and Sytemic 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 Vβ8 receptor Peptide Suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. J. Immunol. **144:** 4621- 4627, 1990.

HEMPEL, K.A.; FREINTAG, B.; ENDRES, B.; MAI, B. AND LIEBALDT, G.. Unresponsiveness to experimental allergic Encephalomyelitis in Lewis rats pretreated with complete Freund's adjuvant. Int. Archs Allergy appl. Immunol. **76:**193-. 1985.

HISAEDA, H.; SAKAI, T.; NAGASAWA, H.; ISHIKAWA, H.; YASUTOMO, K.; MAEKAWA, Y. & HIMENO, K. Contribution of extrathymic γδ T cells to the expression of heat-shock protein and to protective immunity in mice infected with *Toxoplasma gondi.* Immunology, **88**: 551-557, 1996.

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.

KABELITZ, D.; BENDER, A.; SCHONDELMAIER, B.S.; SCHOEL, B. & KAUFMANN, S.H. A large fraction of human peripheral blood γδβ+ T cells is activated by *Mycobacterium tuberculosis* but not by its 65 - KD heat shock protein. J. Exp.Med. **171**: 667-679, 1990.

KAUFMANN, S.H.E.; BLUM, C. & YAMAMOTO. Crosstalk between γδ T responses after γδ T cell modulation with the monoclonal antibody GL3. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **90**: 9620-9624, 1993.

KHOURY S.; HANCOCK, W.W., &, H.L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with down-regulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of Transforming Growths Factor β, interleukin-4 prostaglandin E expression in the brain. J. Exp. Med. **176**: 1355-1364, 1992.

KOBAYASHI, Y.; KAWAI, K.; ITO, K.; HONDA, H.; SOBUE, G. & YOSHIKAI Y. Aggravation of murine experimental allergic encephalomyelitis by administration of T cell receptor γδ-specific antibody. J. Neuroimunol. **73**: 169-174, 1997.

KRONENBERG, M. Antigens recognized by γδ 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 in-specific T cells clones to mediated experimental allergic encephalomyelitis. J. Immunol. **151**: 4371-4382,1993.

KüHNLEIN, P.; PARK, J. H.; HERRMANN, T.; ELBE, A. & HUNIG, T. Identification and characterization of rat γδ T lymphocytes in peripheral lymphoid organs, small intestine, and skin with a monoclonal antibody to a constant determinant of the γδ T cell receptor . J. Immunol. **153:** 979-986, 1994.

LEITE, C.M.G. Avaliação de técnicas de Detecção e Quantificação de Morte Celular em Células Leucêmicas Humanas. Tese de Mestrado 1996.

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. & RANDEL, R.J. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem. **193**: 265-275, 1951.

McCOMBE, P.; NICKSON, I.; TABI,Z. & PENDER, M.P. Apoptosis of V β 8.2 T lymphocytes in the spinal cord during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced in Lewis rat by inoculation with myelin basic protein. J. Neurol. Sci **139**: 1-6, 1996.

Mc MENAMIN, C.; McKERSEY, M.; KUHNLEIN, P.; HUNIG, T. & HOLT, P.G.γδ cells downregulate primary IgE responses in rats to inhaled soluble protein antigens. J. Immunol. **154:** 4390-4394, 1995.

McPHEE, I.A.M.& MASON, D.W. Studies on the refractoriness to reinduction of experimental allergic encephalomyelites in Lewis rats that have recovered from one episode of disease. J. Neuroimmunol. **27**: 9- 1990.

MILLER, A.; LIDER, O.; ROBERTS, A.; SPORN, M.B. & WEINER, H.L. Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein supress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor (after antigen-specific trigering. 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-β release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. J. Immunol. **151**: 7307-7315, 1993.

MOSMANN, T.R.; CHERVINSKI, H.; BOND, M.W.; GIDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L.Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphocytes activities and secreted proteins. J.Immunol. **136**: 2348-2357, 1986.

NAVIKAS, V.& LINK, H. Cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. J Neurosc. Res. **45**: 322-333, 1996.

NGUYEN, K.B.; McCOMBE, P.A.& PENDER, M.P. Increased apoptosis of T lymphocytes and Macrofages in the Central and Perpheral Nervous System of Lewis rats with Experimental Autoimmune Encephalomyelites treated with Dexamethasone. J. Neuropathol.& Exp. Neurol. **56**:58-69, 1997.

NICHOLSON, L.B.& KUCHROO, V. Manipulation of the Th1/Th2 balance of autoimmune diseases. Curr.Op. Immunol. **8**:837-842, 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 γδ by an antigen derived from *Mycobacterium tuberculosis*. Cell, **57**: 667-674, 1989.

OFFNER, H.; HASHIM, G.A. & VANDENBARK, A.A. T cell receptor peptide therapy triggers autoregulation of experimental encephalomyelitis. Science, **251**: 430-432, 1991.

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 nRNA, and transfer of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. J. Immunol. **153:** 4988 - 4996, 1994.

OKRAGLY, A.J.; HANBY-FLARIDA, M. & BALDWIN, C.L. Monocytes control γδ T-cell responses by a secreted product. Immunology **86**: 599-605, 1995.

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.

OTA, K., MATSUI, M.; MILFORD, E.L.; MACKIN, G.A.; WEINER, H.L. & HAFLER , D.A. T-cell recognition of an immunodominant Myelin Basic Protein Epitope in Multiple Sclerosis. Nature **346**: 183-187, 1990

PENDER, M.P.; NGUYEN,K.B.; McCOMBE, P.A. & KERR, J.F.R. Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelites. J. Neurol. Sci. **104**: 81-87, 1991.

PENDER, M.P.; McCOMBE, P.A.; YOONG, G.& NGUYEN,K.B. Apoptosis of Vβ 8.2 lymphocytes in the nervous system in experimental autoimmune encephalomyelites: its possible implications for recovery and acquired tolerance. J. Autoimmun. 5: 401-410, 1992.

PETERMAN, G.M.; SPENCER, CH.; SPERLING, A.I.; BLUESTONE, J.A. Role of γδ T cells in Murine Collagen-Induced Arthritis. J. Immunol. **151:** 6546-6558, 1993.

PTAK, W. & ASKENASE, P.W. γδ T cell assist αβT cells in adoptive transfer of contact sensitivity. J. Immunol. **149**: 3503-3508, 1992.

RAJAN, A.J.; GAO, Y.L.; RAINE, C.S. & BROSNAN, C.F. A pathogenic role for γδ T cells in relapsing-remiting experimental allergic encephalomyelitis in the SJL mouse. J. Immunol. **157**: 941-949, 1996.

SANTOS, L.M.B., AL-SABBAGH, A.;LONDONO, A. & WEINER, H.L. Oral tolerance to Myelin Basic Protein induces Regulatory TGF-β Secreting T cells in Peyer's patches of SJL mice. Cell. Immunol.**157**: 439-447, 1994.

SELMAJ, K.; BROSNAN, C.F. & RAINE, C.S. Colocalization of lymphocytes bearing γδ 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 γδ 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 γδ 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. & YOSHIKAI, Y. Regulatory role of γδ 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.

TABI, Z., McCOMBE, P.A. & PENDER, M.P. Apoptotic elimination of Vβ 8.2+ cells from the central nervous system during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced by the passive transfer of Vβ8.2+ encephalitogenic T cells. Eur. J. Immuol. **24:**2609-2617, l994

TABI, Z.; Mc COMBE, P.A. & PENDER, M.P. Antigen-specific down-regulation of myelin basic protein reactive T cells during spontaneous recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis further evidence of apoptotic deletion of autoreactive T cells in the central nervous system. Int. Immunol. **7**: 967-973, l995.

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.

VACCHIO, M.S., ASHWELL, J.D. T cell Tolerance. Chelmmunol-**59**, 1994.

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-, CDγδ T cell subset in the spleens of mice during blood-stage Malaria. J. Immunol. 151: 6311-6317, 1993.

WAKSMAN, B. Mechanisms in Multiple Sclerosis. Nature **318:** 104-105, 1985.

WEINER, H.L.; FRIEDMAN, A.; MILLER, A.; KHUORS,J.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.; SAYEGH, M.; NUSSENBLATT, R.B.; TRENTHAM, 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 γδ T cell receptor repertoire in acute multiple sclerosis lesion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**: 4588-4592, 1992.

YUUKI, H.; YOSHIKAI, Y.; KISHIHARA, K.; IWASAKI, A.; MATSUZAKI, G.; TAKIMOTO, H.; & NOMOTO, K. Clonal anergy in self-reactive αβ T cells is abrogated by heat-shock protein reactive γδ T cells in aged athymic nude mice. Eur. J. Immunol. **20**: 1475-1482, 1990.