



ELAINE CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**EFEITO DA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA, OBTIDA PELA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA, NA
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS LINFÓCITOS Th1 e Th2**

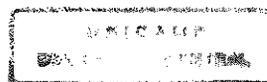
Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a)
*Elaine Conceição
de Oliveira*
e aprovada pela Comissão Julgadora.

27/11/97
[Signature]

**CAMPINAS
1997**

OL4e

37201/BC



ELAINE CONCEIÇÃO DE OLIVEIRA

**EFEITO DA INDUÇÃO DE TOLERÂNCIA, OBTIDA PELA
ADMINISTRAÇÃO ORAL DE PROTEÍNA BÁSICA DE MIELINA, NA
PRODUÇÃO DE CITOCINAS PELOS LINFÓCITOS Th1 e Th2**

*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 M. B. SANTOS

**Departamento de Microbiologia e Imunologia- Instituto de Biologia-
Universidade Estadual de Campinas- UNICAMP.
CAMPINAS-SÃO PAULO**

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

Oliveira, Elaine Conceição de

OL3e Efeito da indução de tolerância, obtida pela administração oral de proteína básica de mielina, na produção de citocinas pelos linfócitos Th1 e Th2/ Eliane Conceição de Oliveira. -- Campinas, SP:[s.n.],1997.
82f. ilus.

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

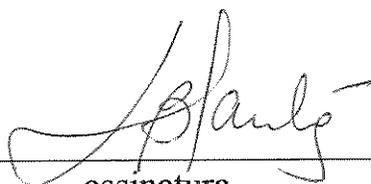
1. Linfócitos. 2. Tolerância. 3. Auto - Anticorpos.
I. Santos, Leonilda Maria Barbosa. I. Universidade Estadual de
Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 27 de novembro de 1997

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

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



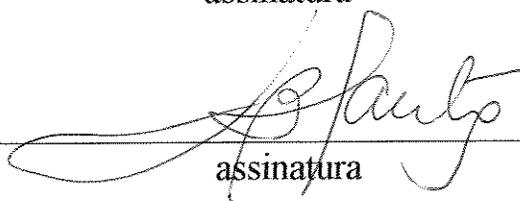
assinatura

Prof. Dr. Benito Pereira Damasceno



assinatura

Prof. Dr. Morton Aaron Scheinberg



assinatura

SUPLENTES:

Profa. Dra. Julia Keiko Sakurada

assinatura

**‘Toda honra e toda glória seja dada a Jesus Cristo filho de Deus,
porque sem ele eu nada seria’**

**...“Seja bendito o nome de Deus para todo o
sempre; porque dele é a sabedoria e a força.
Ele muda os tempos e as horas; Ele remove
os reis e estabelece os reis: Ele dá sabedoria
aos sábios e ciência aos entendidos.”**

Dn. 2: 20-21

À minha mãe Marilene, por ter dedicado toda a sua vida em nos fazer vencedores, sobretudo com honestidade e justiça, sendo exemplo em todo tempo.

Ào meu pai Laercio, por todo amor, dedicação e incentivo.

À Angela, Reusa , Rose e Saraí minhas preciosas irmãs pelo amor, amizade, dedicação e todas as coisas mais, que não cabem aqui.

Àos sobrinhos Leonardo, Laercinho e Jorginho, prova da fidelidade e do amor de Deus por nossas vidas.

Àos meus irmãos José Laercio e Jorge Luis (*in memoriam*)
...“Temos que agradecer a Deus por nos amarmos tanto, muitos no mundo não sabem o que é isso... À alegria ou a dor de um é a dor de todos”.

Ào Cesar, Ana e a Giovana, presença constante em todos os momentos

À orientadora Dra Leonilda por todos os momentos em que convivemos e pelos ensinamentos passados no dia a dia, mas principalmente pela amizade. Obrigado por tudo.

À Eloisa pela amizade e colaboração, presença importante desde o início.

À amiga Célia por toda ajuda, mas principalmente pela amizade profunda que se desenvolveu entre nós.

À Dona Inês, por sempre estar orando por mim.

Ao grupo Alvo minha Segunda família.

Agradecimentos

À Instituições Financeiras CAPES e FAPESP, que possibilitaram a realização deste trabalho.

À Blanca, Silvia, Cristiane, Luciana, Patrícia, Paula e Clarissa companheiras de trabalho e amigas, as quais pude contar ao longo deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia pelos cursos ministrados.

Aos professores Benito Pereira Damasceno, Morton Aaron Scheinberg, Julia Keiko Sakurada, Paulo Maria de Araújo, Irineu J. B. Camargo, que fizeram a análise prévia deste trabalho, pelas valiosas sugestões, que muito contribuíram para o aperfeiçoamento do manuscrito.

Aos funcionários do D. M. I. da UNICAMP, que direta ou indiretamente participaram da elaboração deste trabalho.

À Dirce e à Cristina pela disposição e pela contribuição com ensinamentos de técnicas para realização deste trabalho.

À Ana e a Fúvia do xerox da Biologia pela amizade e colaboração.

Aos amigos Vanderlei e Elaine pela amizade e incentivos constantes.

À Mônica, Helenice e Janete amigas para sempre.

À família Tin, Chininha, Lucilene e Murilo por todo amor e amizade.

**Trabalho realizado com apoio recebido da Fundação de Amparo à
Pesquisa - FAPESP**

ÍNDICE

I -	INTRODUÇÃO.....	01
II -	OBJETIVOS.....	09
III -	MATERIAIS E MÉTODOS	
	3.1- Animais de experimentação.....	11
	3.2- Neuro-antígenos.....	11
	3.3- Anticorpos.....	11
	3.4- Expansão do clone celular 11B11.....	12
	3.5- Produção do anticorpo monoclonal anti-IL4.....	12
	3.6- Indução de EAE.....	12
	3.7- Avaliação clínica da EAE.....	13
	3.8- Indução de tolerância oral a MBP.....	13
	3.9- Obtenção de células mononucleares do baço e linfonodos.....	13
	3.10- Ensaio de proliferação celular.....	14
	3.11- Produção de citocinas	14

3.12- Depleção das sub-populações de linfócitos do baço de camundongos.....	15
3.13- Quantificação de anticorpos anti-MBP e dos isotipos de IgG pelo método ELISA.....	15
3.14- ELISA de captura	16
3.15- Indução de tolerância oral a MBP e administração “ <i>in vivo</i> ” do anticorpo monoclonal anti- IL4	16
3.16- Testes estatísticos.....	17

IV - RESULTADOS

4.1- Efeito da administração oral de MBP a camundongos SJL/J na severidade da EAE.....	19
4.2- Resposta proliferativa de linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP e estimulados “ <i>in vitro</i> ” com MBP.....	21
4.3- Níveis de anticorpos anti-MBP (IgG total) no soro de camundongos oralmente tolerizados com o neuro-antígeno.....	23
4.4- Quantificação das subclasses de IgG em camundongos oralmente tolerizados com MBP	25
4.5- Citocinas produzidas pelas sub-populações de linfócitos T CD4 e T CD8 de camundongos oralmente tolerizados com MBP, sem posterior imunização.....	30

4.6- Níveis de IFN γ no sobrenadante de cultura dos linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP, e posteriormente imunizados com MBP/CFA.....	35
4.7- Níveis de IL4 no sobrenadante de cultura dos linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP, e posteriormente imunizados com MBP/CFA.....	37
4.8- Níveis de anticorpos (IgG-total) anti-MBP do soro de camundongos tolerizados ou não com MBP e depletados “ <i>in vivo</i> ” com anticorpo monoclonal anti-IL4.....	39
4.9- Dosagem das sub-classes de IgG (IgG 1, IgG2a e IgG3) e IgE no soro de camundongos tolerizados ou não com MBP e depletados “ <i>in vivo</i> ” com anticorpo monoclonal anti-IL4.....	41
4.10- Níveis de IL4 no sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP e depletados “ <i>in vivo</i> ” com anticorpo monoclonal anti-IL4.....	45
4.11- Efeito “ <i>in vivo</i> ” da administração do anticorpo monoclonal anti-IL4 em camundongos oralmente tolerizados com MBP	47
V - DISCUSSÃO.....	50
VI - CONCLUSÃO.....	57
VII - APÊNDICE.....	59
VIII REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

IX - RESUMO..... 82

ABREVIACOES

BSA -	Soro Albumina Bovino
CFA -	Adjuvante Completo de Freund
EAE -	Encefalomielite Experimental Autoimune
IL-2 -	Interleucina 2
IL-4 -	Interleucina 4
IL-10 -	Interleucina 10
IFN γ -	Interferon Gama
MBP -	Proteína Básica de Mielina
PBS -	Solução Salina Tamponada
TGF β -	Fator Transformador de Crescimento- β

INTRODUÇÃO

I – Introdução

A característica que distingue os linfócitos das outras células do sistema imune é a propriedade de responder ao antígeno de forma específica. Os linfócitos T apresentam na superfície celular receptores (TCR) que reconhecem o peptídeo antigênico associado às moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC). Os linfócitos T têm origem na medula óssea e sofrem maturação no timo.

No timo, após o rearranjo dos genes que codificam o complexo TCR, as células são submetidas a dois processos de seleção: seleção positiva, que garante que o repertório de linfócitos T seja restrito ao complexo principal de histocompatibilidade e a seleção negativa que elimina ou inativa clones potencialmente auto-reativos garantindo, desta forma, a maturação de células tolerantes aos componentes do organismo. Células potencialmente auto-reativas , no entanto, podem deixar o timo e circularem normalmente na periferia, onde, graças aos mecanismos de tolerância periférica, não causam maiores danos ao organismo, salvo nas situações onde a tolerância é quebrada e há o surgimento das doenças auto-imunes (VACCHIO & ASHWELL,1994).

Os estudos da indução de tolerância periférica tiveram início nos meados deste século, quando OWEN em 1945, estudando rejeição de transplantes em bezerros gêmeos dizigotos, que compartilhavam do mesmo suprimento sanguíneo, observou que a exposição à células alogênicas de um gêmeo, levava a maior aceitação do transplante no segundo. Estes dados mostravam que, em determinadas circunstâncias, o sistema imune poderia aceitar células alogênicas como próprias. Posteriormente, BURNET em 1949, expande o termo de discriminação do “self” e não “self” pelo sistema imune, sugerindo que a exposição de um antígeno durante a fase de desenvolvimento, torna o organismo tolerante ao mesmo, pelo resto da vida (WEINER et al, 1994).

Vários mecanismos são responsáveis pela manutenção da tolerância periférica,

entre os mais estudados podemos citar a, deleção de clones auto-reativos, anergia clonal ou a imuno regulação por produtos celulares, como as citocinas (VACCHIO & ASHWELL, 1994; YANG et al., 1995).

A deleção clonal, principalmente através da apoptose, é o principal mecanismo de eliminação dos clones autoreativos no timo. No entanto, mecanismos de destruição de clones autoreativos também são observados na periferia, normalmente devido à morte celular programada. Os mecanismos que levam à indução da morte celular programada ainda não estão bem conhecidos, mas sabe-se que altas doses do antígeno ou mesmo super-antígenos podem causar a deleção de linfócitos maduros na periferia (KRUISBEEK & ANSEN, 1996).

A possibilidade de existir outros mecanismos envolvidos em manter a tolerância periférica, além da deleção clonal foi considerada, uma vez que indivíduos sadios apresentavam células T e B que reconheciam os antígenos próprios. Na anergia clonal, observa-se que linfócitos T imunocompetentes que conseguiram escapar à seleção negativa no timo, migram para a periferia mas não respondem ao antígeno específico. Para a célula T ser ativada não é suficiente a ligação do TCR com o antígeno específico complexado às moléculas do MHC de classe I ou II, mas são necessários outros sinais co-estimulatórios provenientes da interação de moléculas acessórias da superfície dos linfócitos T que se ligam às outras complementares, localizadas nas células apresentadoras de antígeno.

Os receptores CD28/CTLA4, são glicoproteínas expressas na superfície de linfócitos T de humanos e de murinos, e sua função, entre outras, é estimular o contato das células T com as células apresentadoras de antígeno, desempenhando papel importante no desenvolvimento e ativação das células T. Trabalhos recentes mostram que estas moléculas têm papel fundamental no desenvolvimento e diferenciação dos subtipos Th1 e Th2 (LENSCHOW et al., 1996). As moléculas complementares B7-1 e B7-2 estão presentes nas células que desempenham a função de apresentar antígenos aos linfócitos T, assim como nas células B ativadas, células de Langerhans, células dendríticas, macrófagos ativados, células T e em uma variedade de células tumorais. Estudos revelam que a expressão e regulação de B7-

1 e B7-2 são dependentes de citocinas (LINSLEY & LEDBETTER, 1993). A interação destas moléculas CD28/CTLA-4 com B7-1 ou B7-2 significa o segundo sinal necessário para iniciar uma resposta imune (KHOURY et al., 1995). A secreção de citocinas que eventualmente participarão da ativação linfocitária, normalmente ocorre após a ligação do antígeno-MHC e células T, complementada pela ativação das moléculas co-estimulatórias. Portanto, a interrupção da ligação de CD28/B7 pode inibir a proliferação de células T, e em alguns casos induzir a não resposta antígeno específica ou anergia. Assim, anergia clonal é entendida atualmente como um estado de não resposta dos linfócitos T, caracterizada pela ausência de proliferação, produção de IL2 e diminuição da expressão de receptores para IL2 (GILBERT, 1994).

Citocinas são polipeptídeos solúveis que controlam o crescimento, diferenciação e função da maioria dos tipos celulares e desempenham papel importante como mediadores da inflamação. Com seus sinais interativos, às vezes são estimulatórias e outras vezes inibitórias; as citocinas são responsáveis pela comunicação entre as células do sistema imune e agem ligando-se a receptores de alta afinidade existentes nas células. Com o melhor entendimento da biologia das citocinas, vários aspectos da indução de tolerância periférica estão sendo elucidados.

A maturidade do sistema imune, a concentração, a natureza do antígeno, se solúvel ou particulado, e a via de administração parenteral ou oral parece favorecer um ou outro mecanismo de indução de tolerância. Foi demonstrado que altas doses do antígeno favorecem os mecanismos de anergia, para a indução de tolerância, enquanto o mesmo antígeno em pequenas doses induzem imunoregulação através da liberação de citocinas com efeito imunossupressor (FRIEDMAN et al., 1994).

A indução de tolerância, pela administração oral do antígeno, foi descrita pela primeira vez por WELLS em 1911, com a prevenção de reações anafiláticas em cobaias, pela prévia administração oral da proteína de ovo. Em 1946, CHASE suprimiu reações de sensibilidade de contato, também em cobaias, administrando oralmente dinitrofluorbenzeno (DNFB) (WEINER et al., 1994). Nos anos 70, e início dos anos 80, a tolerância oral foi

estudada, geralmente através da administração de altas doses de ovoalbumina ou hemácias de carneiro. Recentemente, o estudo da indução de tolerância a auto-antígenos volta a despertar interesse nos pesquisadores, diante do fato de servir como alternativa terapêutica, em certas doenças autoimunes como a Esclerose Múltipla, Diabetes Mellitus, Artrite Reumatóide, Tireoidites de origem autoimune e Encefalomielite Experimental Autoimune (WEINER et al., 1993; WEINER et al.,1994).

A Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE) é um dos modelos mais estudados de doença autoimune experimental. A EAE é uma doença mediada por linfócitos T CD4+, que podem ser ativados pela imunização com mielina ou seus componentes como a Proteína Básica de Mielina (MBP), peptídeos derivados de MBP, proteolipoproteínas e seus componentes, ou pode ser passivamente transferida para animais normais, por linfócitos T CD4+ específicos para MBP e PLP (ZAMVIL et al., 1985; BEN NUN & COHEN, 1982; HOLOSHITZ et al., 1993). O estudo da EAE tem se mostrado extremamente útil, pois tem servido de modelo experimental para o entendimento da Esclerose Múltipla humana.

A Esclerose Múltipla (E.M.) é uma doença que normalmente acomete adultos jovens, sendo caracterizada patologicamente pela inflamação e desmielinização de múltiplas áreas do cérebro resultando clinicamente em disfunção neurológica, normalmente na forma de surtos e remissões, que progridem para a incapacidade física e eventualmente a morte. A causa da E.M. é desconhecida, estudos imunológicos, no entanto, sugerem que a mesma seja causada por processos autoimunes (McFARLIN & McFARLAND, 1982; WAKSMAN, 1985). Como a maioria das doenças autoimunes de etiologia desconhecida, não se sabe como a resposta imune aos antígenos próprios tem início, embora infecção viral, em indivíduos geneticamente sensíveis, acontecida durante a infância e adolescência, possa ser responsabilizada (WUCHERPFENNING & STROMINGER, 1995).

Com relação ao modelo experimental, a EAE pode ser facilmente conseguida em ratos e camundongos através da imunização com mielina e seus componentes. O modelo obtido em ratos, apresenta a doença de forma monofásica, ou seja, o animal imunizado apresenta um episódio da doença, mas em duas semanas consegue se recuperar e dificilmente

volta a apresentar novos surtos. A EAE induzida em camundongos, apresenta períodos de exacerbação e remissão estando, portanto, muito próxima da doença manifestada em humanos (ORTIZ-ORTIZ & WEIGLE, 1976; FRITZ et al., 1983).

Os mecanismos imunológicos envolvidos nos surtos e remissões não estão completamente entendidos e têm sido a motivação de estudo de vários centros de pesquisas, dada a sua importância no controle da doença no homem. A explicação mais aceita pelos especialistas é que durante a fase de exacerbação o indivíduo apresenta deficiência da função supressora, que normalmente atua sobre os linfócitos T CD4 auto-reativos para os componentes da mielina.

Utilizando o modelo de EAE em ratos Lewis e em camundongos SJL/J, foi demonstrado que a administração oral de MBP, induzia tolerância nos animais, suprimindo, de forma efetiva, o desenvolvimento da doença. Os autores mostraram que o mecanismo principal de indução de tolerância era devido à ativação de linfócitos T CD8+, uma vez que a transferência dessas células de animais que receberam MBP oralmente, protegia os animais recipientes do desenvolvimento da EAE (LIDER et al., 1989). Dando continuidade a esse trabalho, os autores fizeram uma importante observação que denominaram de “bystander suppression”. Ainda no modelo de ratos Lewis, foi demonstrado que a ligação do tolerógeno, com os linfócitos T era antígeno específica, mas a supressão observada era resultado da liberação de citocinas supressoras como TGFβ (Transforming Growth Factor) (MILLER et al., 1992; MILLER et al., 1993; AL-SABBAGH et al., 1994).

O TGFβ é citocina com conhecido efeito imunossupressor, produzido por uma variedade de células incluindo linfócitos B, T CD4 e CD8, células NK e macrófagos ativadas. Além da atividade supressora, o TGFβ inibe a adesão das células T e neutrófilos às células endoteliais, limitando assim o recrutamento e a migração de células inflamatórias através da barreira hemato-encefálica. Foi observado que, após a tolerização oral com MBP, ratos Lewis apresentam diminuição significativa de células e citocinas supressoras como TGFβ, IL4 e PGE2 (KHOURY et al., 1992).

Uma vez que o antígeno administrado por via parenteral, não leva aos mesmos resultados que o administrado por via oral, os autores decidiram estudar a participação das células linfóides das placas de Peyer de animais oralmente tolerizados com MBP. Verificou-se, então, que as células epiteliais da mucosa intestinal constitutivamente expressam antígenos de classe II do complexo principal de histocompatibilidade, podendo apresentar a MBP a clone de linfócitos especificamente sensibilizados. Os autores mostraram ainda que as células epiteliais do intestino delgado exercem importante função supressora da resposta imune através da produção aumentada de prostaglandinas E2 (SANTOS et al., 1990). Dando continuidade a esse estudo, foi demonstrado também que os linfócitos das placas Peyer, de animais oralmente tolerizados com MBP, liberam níveis aumentados de TGF β quando em contato com o tolerógeno. Mostrou-se ainda, que estes linfócitos quando adotivamente transferidos, protegiam os animais recipientes do desenvolvimento da EAE (SANTOS et al., 1994).

Embora a supressão da EAE nos animais oralmente tolerizados com MBP seja uma realidade, ficava a pergunta de como um antígeno protéico solúvel passava a barreira gástrica para ativar a função supressora dos linfócitos. Assim, foi investigado o efeito dos diferentes peptídeos da molécula de MBP, em relação a produção de TGF β . Foi demonstrado que o fragmento não encefalitogênico da molécula de MBP (21-40) suprime a EAE quando administrado oralmente, estimulando a produção de TGF β . Por outro lado, os epítomos encefalitogênicos da molécula de MBP, principalmente o peptídeo 71-90, não induziam função supressora (MILLER et al., 1993).

Esta série de evidências, somada às de outros autores, sugere a importância das células supressoras ou citocinas com ação supressora, no controle dos surtos e remissões na EAE. O modelo Th1/Th2 para diferenciação dos linfócitos T CD4 propõe que após a ligação com antígeno, células T helper diferenciam-se em duas sub-populações, que são caracterizadas pelo padrão de citocinas secretadas. Os linfócitos Th1 secretam principalmente IL2 e IFN γ , ativam macrófagos e mediam reações de hipersensibilidade do tipo tardio. Os linfócitos CD4 Th2 produzem IL4, IL5 e IL10, são importante na síntese de IgE e podem suprimir a resposta imune celular. As citocinas produzidas por cada um dos subgrupos de

linfócitos T atuam como seu próprio fator de crescimento, assim como podem regular negativamente o desenvolvimento e função do subtipo oposto. Este modelo de regulação cruzada tem sido utilizado, com sucesso, para explicar vários fenômenos imunológicos, principalmente a resposta imune a agentes infecciosos (MOSMANN et al., 1986; SEDER& PAUL,1994). A polarização de um ou outro fenótipo também parece ser extremamente relevante nos mecanismos de autoimunidade.

Recentemente foi descrito que linfócitos T CD4, específicos para os componentes da mielina, do subtipo Th1 e não Th2, podem causar EAE (RACKE et al., 1994). Estes achados, entre outros, apoiam a conclusão de que a EAE, assim como outras doenças autoimunes órgão-específicas, são causadas por clones de linfócitos auto-reativos que apresentam o padrão Th1. Com base nessas observações, supõe-se que nos modelos de doenças autoimunes órgão-específicas, as células Th2, com a mesma especificidade para o antígeno, deveriam ter efeito oposto no desenvolvimento da doença. Os resultados obtidos em vários laboratórios, no entanto, foram conflitantes (KHORUTS et al., 1995). No modelo para EAE, a transferência de clones Th2, específicos para os neuro-antígenos, não foi capaz de proteger contra a doença. Estudiosos somente conseguiram proteção contra EAE quando clones Th2, específicos para componentes da mielina foram transferidos juntamente com clones Th3 (produtores de TGF β) (CHEN et al., 1994). A administração, “*in vivo*”, de citocinas produzidas pelos linfócitos Th2, como a IL4, IL10 e IL13, no entanto, resultou na melhora clínica, diminuição da desmielinização e indução de células Th2 (RACKE et al., 1994).

Diante da importante contribuição das citocinas, no controle das doenças autoimunes, o presente trabalho teve como objetivo, verificar como a administração oral da MBP, modifica o padrão das citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2.

OBJETIVOS

II- Objetivo

No presente trabalho estudamos como a administração oral de neuro-antígenos pode modificar a produção de citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2

MATERIAIS E MÉTODOS

III- Materiais e Métodos

3.1 - Animais de experimentação

Foram utilizados camundongos da linhagem SJL/J, fêmeas de 8 a 12 semanas, obtidos dos laboratórios Harlan Sprague Dawley - USA. Os camundongos imunodeficientes “nude” utilizados foram provenientes do Centro Multidisciplinar de Bioterismo (CEMIB) do Campus da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). Durante a fase de experimentação os animais foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, sob condições convencionais.

3.2 - Neuro- antígeno

Foi utilizado MBP (Proteína Básica de Mielina), purificada de cérebro bovino. A MBP foi preparada segundo o método de DEIBLER et al., 1972. Os níveis protéicos foram quantificados segundo indicações de LOWRY et al., 1951 a leitura realizada em espectrofotômetro a 650 nm.

3.3 – Anticorpos

Para os ensaios de ELISA de captura, foram utilizados os seguintes anticorpos monoclonais : purificados Rato anti-camundongo IFN γ (clone R4- 6A2), anti- IL2 (clone JES-1A12), anti- IL4 (clone BVD4- 1D11) e anti- IL10 (clone JES5- 2A5) . Biotinilados : Rato anti-camundongo IFN γ , IL2, IL4 e IL10 com os respectivos recombinantes. Para detecção de anticorpos anti- MBP e isotipos da IgG através do método ELISA, foram utilizados anticorpos anti-camundongos conjugados com peroxidase IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE. Todos os anticorpos foram obtidos comercialmente da Pharmingen CA, USA. Anticorpos anti CD4+ e CD8+ anti - camundongos marcados com FITC foram obtidos da Pharmingen CA, USA.

3.4 - Expansão do clone celular 11B11 produtor do anticorpo monoclonal anti- IL4

O clone celular 11B11 foi cultivado em meio de RPMI 1640(Sigma Chemical Co,USA), enriquecido com 10% de soro fetal bovino (Microbiológica, RJ), 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina a 0,2mM e 2 Mercaptoetanol (2ME) diluído 1:100. As células foram colocadas em garrafas para cultura de células de 50 ml (Costar, USA), com repiques a cada 48 horas.

3.5 - Produção do anticorpo monoclonal anti- IL4

Foram utilizados animais imunodeficientes (“nude mice”), machos e fêmeas de 8 a 12 semanas de idade, obtidos junto ao Centro de Bioterismo da UNICAMP. O clone 11B11 na concentração de 1×10^6 células/ml em meio de RPMI 1640, foi inoculado em camundongos nude por via intraperitoneal. Após 10 a 15 dias recolheu-se o líquido ascítico dos animais e procedeu-se a precipitação do anticorpo, utilizando uma solução saturada de sulfato de amônio. As amostras foram diluídas 10 vezes e dialisadas com tampão PBS até que o excesso de sal fosse completamente removido. Finalizando o processo, as amostras foram filtradas em membrana Millipore, e os níveis de proteína quantificados através do método de Lowry com leitura a 650 nm. As amostras de concentração conhecida foram separadas em alíquotas de 1ml e acondicionadas em freezer -80° C.

3.6 – Indução de EAE

Camundongos da linhagem SJL/J foram imunizados por via subcutânea com 0,4 mg de MBP emulsificados em igual volume de CFA (Sigma Chemical Co., USA). Cada animal recebeu duas doses de 0,2 ml em intervalo de sete dias (dia 0 e dia 7), inoculados em quatro pontos distintos da região do flanco. Após 48 horas, os animais foram inoculados com 200ng de *Bordetella pertussis* via intravenosa pelo plexo ocular, os sinais clínicos foram observados após 15 dias da imunização.

3.7 – Avaliação Clínica

Os camundongos foram observados diariamente, a partir do décimo quinto dia após a imunização, para os sinais clínicos da EAE. A avaliação foi feita atribuindo-se graus de 0 a 5 de acordo com os seguintes critérios: grau 0 = não doente; 1= perda do tônus da cauda; grau 2= paralisia parcial dos membros posteriores e dificuldade de voltar a posição inicial quando colocados de decúbito dorsal; grau 3= paralisia severa dos membros posteriores, 4= paralisia severa dos membros anteriores e posteriores; grau 5= morte. As observações seguiram-se por 60 dias após a imunização.

3.8 – Indução de tolerância oral a MBP

Foram administradas em dias alternados, cinco doses de 0,25 mg de MBP em 0,25 ml de PBS, e nos controles foi administrado a mesma dosagem de OVA. Utilizou-se o método de “cavage” com auxílio de agulha apropriada para esses fins. Após 24 horas da última dose oral do antígeno, os animais foram imunizados com 0,4 mg de MBP emulsionados em igual volume de CFA por via subcutânea. Após 12 dias da imunização, os animais foram sacrificados e retirou-se o baço e linfonodo para cultura de linfócitos e sangue para determinação dos níveis de anticorpos anti-MBP.

3.9 - Obtenção de células mononucleares do baço e linfonodo

Baço e linfonodos, após 12 dias da imunização, foram removidos assepticamente e colocados em placas de Petri contendo meio de Hanks. Suspensões simples de células foram preparadas usando uma malha de inox. No caso de células esplênicas, após a primeira centrifugação, o botão celular foi tratado com tampão de lise (solução de cloreto de amônio a 0,82%), para eliminação das hemácias. As células foram lavadas três vezes com solução balanceada de Hanks e ressuspensas em meio de RPMI 1640, enriquecido com soro fetal bovino a 5%, 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina a 0,2 mM e 2ME 1:100. Para determinação da viabilidade celular, utilizou-se o método de exclusão com Azul Trypan.

3.10 – Ensaio de proliferação celular

Linfócitos obtidos de baço ou linfonodo, como descrito, foram ajustados para as concentrações de 4×10^6 células/poço para estimulação com MBP. As células foram cultivadas em meio de RPMI 1640 enriquecido com Soro Fetal Bovino a 5% (Microbiológica- RJ), 4,25 mg/ml de gentamicina, 1% de glutamina 0,2 mM e 2-ME na concentração de 1:100. Em microplacas de 96 poços (Costar, USA), foi colocado 0,2 ml/poço da suspensão de célula em meio enriquecido; os ensaios foram realizados em triplicata. Avaliou-se a transformação blástica de linfócitos estimulados por diferentes concentrações de MBP, sendo que as concentrações ótimas variam entre 25µg e 40µg/ml. As células foram incubadas em estufa de CO₂, a uma tensão constante de 5% e temperatura de 37°C, sendo que o tempo de incubação foi de 96 horas. Aproximadamente 18 horas antes do término da incubação, cada poço recebeu 1µCi de Timidina Triteriada (Dupont, NEN Research-Boston, MA). 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., USA), as células foram recuperadas em papel filtro de fibra de vidro (Cambridge Technology Inc., USA) e colocadas em tubos padronizados na presença de 2ml de líquido de cintilação (3,0 g/l de PPO em Toluol). A leitura foi realizada em Cintilador Beta (Beckman LS 6000 Series Liquid Scintillation System). Os resultados estão expressos em contagens por minuto (CPM), sendo considerada a média das triplicatas.

3.11 - Produção de citocinas

Células de linfonodos ou baço foram obtidas de acordo com o item 3.9, a concentração de células foi ajustada para 2×10^6 / ml em meio de RPMI + SFB+ gentamicina+ glutamina e 2ME 1:100, e cultivadas em placas de 24 poços. Cada poço contendo 1 ml da suspensão celular foi estimulado com 25µg/ml de MBP, a mesma concentração para proteína controle (OVA) ou as células não foram estimuladas. Os tempos de incubação foram de 18 horas para IL2, 40 horas para IL4 e IL10 e 60 horas para obtenção de IFN γ . Após o período de incubação ótima para cada citocina, retirou-se os sobrenadantes e centrifugou-se os mesmos a 1200 rpm por 10 minutos. Os níveis de citocinas foram quantificados em cada

sobrenadante através do método de ELISA de captura.

3.12 - Depleção das sub-populações de linfócitos do baço de camundongos

Para a depleção das sub-populações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ utilizou-se o método de micro-colunas Collect.plus obtidos da Bio-tex – Toronto – Canadá. Os linfócitos separados, como já descrito, foram incubados por 1 hora com os anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 na concentração de 1:100, a -4^o C. Durante este período as micro colunas de polipropileno foram sensibilizadas com anticorpo policlonal de cabra anti camundongo IgG e policlonal de carneiro anti rato IgG, uma vez que o anticorpo monoclonal anti CD4 e CD8 foi obtido em ratos, sendo do isotipo IgG2. Após este período as colunas foram lavadas, para a retirada de excesso de anticorpos, com solução de PBS/BSA a 2% e o fluxo da coluna ajustado para oito gotas por minuto. Uma vez estabilizadas, as células foram lavadas 3 vezes com solução de Hanks e ajustadas a 50 X 10⁶ em meio de cultura contendo 5% de soro fetal bovino. As células foram cuidadosamente passadas através da coluna e as células depletadas foram lavadas 3 vezes com solução de Hanks. Este método permite depleção das populações celulares acima de 80% de pureza. O grau de pureza foi verificado marcando-se as populações separadas, com anticorpos monoclonais marcados com FITC e identificados através de Citometria de Fluxo (Ortho Citometro).

3.13 – Quantificação de anticorpos anti-MBP e Isotipos de IgG pelo método de ELISA

Para quantificação dos níveis de anticorpos anti- MBP utilizou-se a técnica de ELISA, já empregada em trabalho anterior(LIDER et al.,1989). Microplacas para ensaios enzimáticos (Costar, USA) foram cobertas com 25µg/ml de MBP (100µl/poço) por 18 horas e em seguida lavadas com PBS Tween 20 a 0,05%. Utilizou-se leite em pó desnatado (caseína) a 5% em PBS (200µl/poço) por duas horas para bloquear as reações inespecíficas, lavou-se as microplacas com PBS/Tween. Depois disso, foram adicionadas as amostras de soro (100µl/poço). Utilizou-se um “pool”de soros, em diluições que variavam de 1:100 até 1:1600, as amostras foram analisadas em duplicata. Após uma hora, lavou-se novamente a placa com PBS/Tween e adicionou-se o anticorpo anti- IgG de camundongo marcado com

peroxidase (Sigma Co., USA), diluído a 1:40.000 em leite a 2% em PBS (100µl/poço) e incubou-se por uma hora. Para identificar os isotipos, adicionou-se anti- IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgE na concentração de 1:10.000, por uma hora. Após este tempo, lavou-se a placa e adicionou-se o substrato da enzima (10 ml de tampão citrato pH- 5,6 + 10µl de H₂O₂ + 10 mg de OPD) (OPD Sigma Co, USA), e incubou-se a placa por 20 minutos. Ao final deste tempo, adicionou-se uma solução de H₂SO₄ 4N (20µl/poço), com a finalidade de bloquear a reação. A leitura foi realizada em leitor Multiskan Biochromatic (Labsystem), utilizando o filtro de 492 nm.

3.14 - ELISA de captura

Microplacas para ensaios enzimáticos foram cobertas com diferentes anticorpos monoclonais, dependendo da citocina a ser analisada, na concentração de 2µg/ml em PBS por 18 horas. As microplacas foram lavadas com PBS/Tween e como solução bloqueio utilizamos PBS/SFB 10%, por duas horas. Nova lavagem foi realizada com PBS/Tween, e os sobrenadantes colocados (100µl/poço). Para construção da curva foram utilizados recombinantes (IFN γ , IL2, IL4 e IL10) em diferentes concentrações. As placas foram lavadas, e o segundo anticorpo marcado com biotina na concentração de 2µg/ml em PBS/SFB a 10% foi incubado por 1 hora. Após este tempo as placas foram novamente lavadas e adicionado o complexo avidina- peroxidase (Sigma Co, USA), diluído 1:400 em PBS/SFB 10% por 30 minutos. Após as devidas lavagens o substrato (tampão citrato pH- 5,6 + 10µl de H₂O₂ a 30% + 10mg de OPD) foi adicionado e o desenvolvimento de cor avaliado em leitor de ELISA a 492 nm.

3.15 - Indução de tolerância oral a MBP e administração “*in vivo*” do anticorpo anti-IL4

Camundongos da linhagem SJL/J foram divididos em quatro grupos. Foram administradas três doses de 500µg do anti-IL4 em 200µl de PBS, via intraperitoneal, sendo a última dose 24 horas antes de iniciarmos a tolerização oral a MBP. Para a tolerização procedeu-se da seguinte forma: em dias alternados administrou-se, cinco doses de 0,25 mg de

MBP em 0,25 ml de PBS, segundo método utilizado por AL- SABBAGH et al.,1994 e SANTOS et al.,1994. Utilizou-se o método de “cavage” com auxílio de agulha apropriada. Após 24 horas da última dose oral do antígeno, os animais foram imunizados com 400µg de MBP em igual volume de CFA, por via subcutânea, em quatro pontos do flanco. Sete dias após a última dose de anti- IL4 administrou-se uma dose reforço. Após 10 dias os animais foram sacrificados, o linfonodo e baço retirados para ensaios celulares e produção de citocinas, e sangue para dosagem de anticorpos anti- MBP e isotipos de IgG.

3.16- Análise estatística

Foram utilizados o teste de Wilcoxon para as amostras não paramétricas e o teste “t” de Student para as amostras paramétricas

RESULTADOS

IV- Resultados

4.1- Efeito da administração oral de MBP a camundongos SJL/J na severidade da EAE

A figura 1 e anexo 1 mostram que a administração oral de proteína irrelevante (OVA) no esquema de 5 vezes de 0,25 mg por animal, em dias alternados, com posterior imunização com 200 ug de MBP/CFA , não altera o quadro clínico da EAE, sendo o grau máximo 3, que representa paralisia grave dos membros posteriores. A doença é caracterizada por discreta remissão e reagudização. Quando o grupo de animais recebeu MBP bovina, de acordo com o mesmo protocolo descrito para proteína irrelevante, foi observada significativa redução da severidade da doença, sendo que nenhum animal atingiu o grau clínico acima do “score” 0,5. Foram estudados pelo menos 5 animais por grupo, sendo estes resultados a média da avaliação clínica feita diariamente.

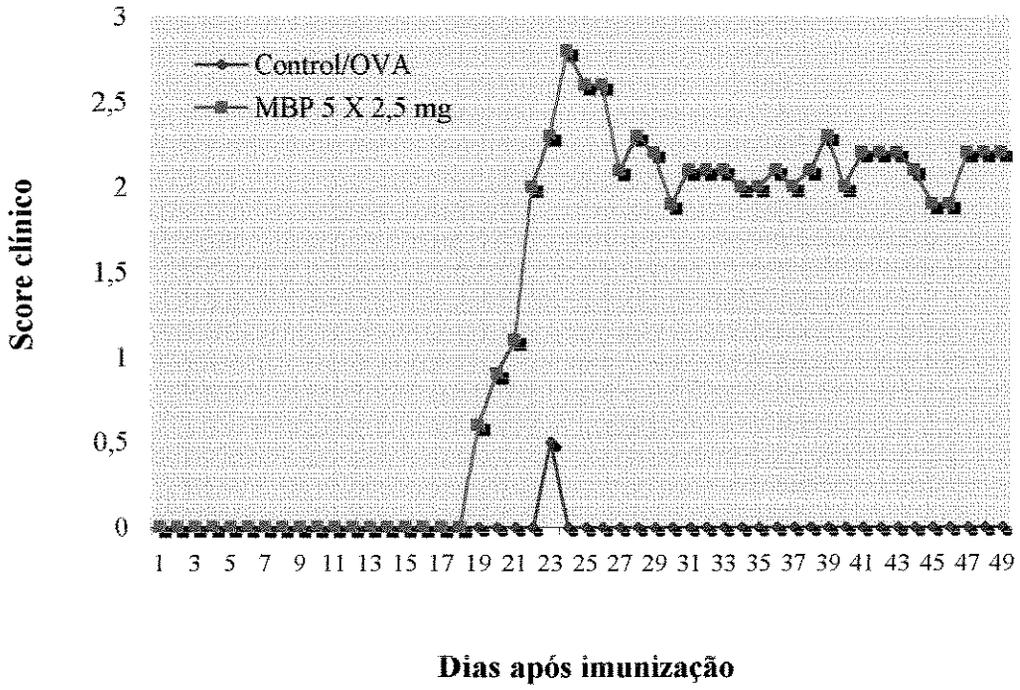


Figura 1. Efeito da administração oral de MBP e OVA na severidade da EAE induzida em camundongos SJL/J

4.2- Resposta proliferativa de linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP e estimulados “in vitro” com MBP

A indução de tolerância pode ser avaliada “in vitro” pelo estudo da transformação blástica de linfócitos. Desta forma, camundongos SJL/J que receberam oralmente MBP ou OVA (5X de 0,25 mg), ou não receberam nenhum tipo de tratamento, foram imunizados com 200 ug de MBP/CFA. Cerca de 12 dias após a imunização os linfonodos foram extraídos e os linfócitos foram estimulados “in vitro” com MBP na concentração de 25µg/ml. Os resultados estão demonstrados na figura e anexo 2, onde observamos significativa redução da resposta proliferativa de linfócitos do grupo de animais que receberam oralmente o neuro-antígeno ($P < 0.001$). Enquanto o grupo que recebeu OVA não apresentou diferença estatisticamente significativa ($p > 0.05$). A figura representa o resultado de 3 grupos de experimentos e os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm), sendo considerado a média entre as triplicatas.

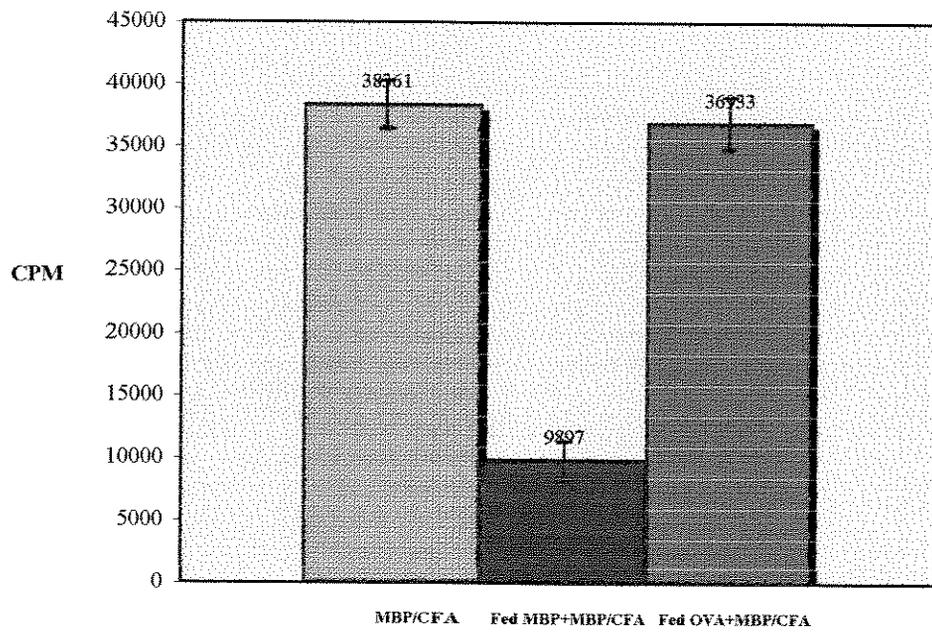


Figura 2. Resposta proliferativa de linfócitos de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP ou OVA e imunizados com MBP/CFA

4.3- Níveis de anticorpos anti-MBP no soro de camundongos oralmente tolerizados com neuro-antígeno

A indução de tolerância pode ser avaliada “*in vitro*” através da quantificação de anticorpos específicos para o antígeno. A figura 3 e anexo 3 mostram os níveis séricos de anticorpos anti-MBP de animais que previamente receberam oralmente 5x 0,25 mg de MBP ou OVA com posterior imunização com MBP/CFA. Pode-se observar que o grupo oralmente tolerizado com MBP, apresentou significativa redução dos níveis de anticorpos ($p < 0.001$) quando comparado ao grupo controle, foram realizados pelo menos 3 determinações dos níveis de anticorpos.

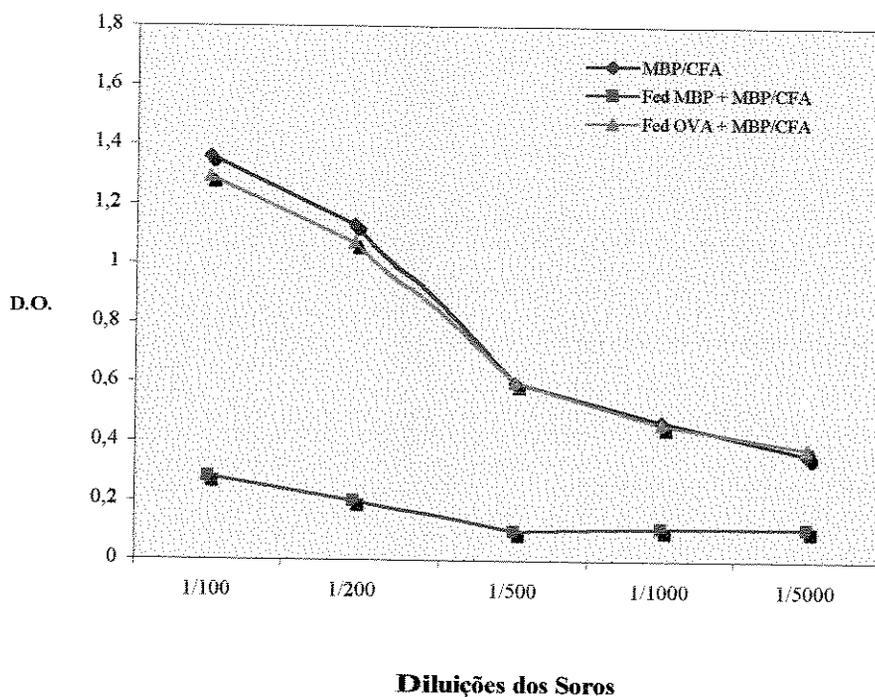


Figura 3. Níveis de anticorpos anti-MBP no soro de camundongos SJL/J tolerizados oralmente com MBP ou OVA e posteriormente imunizados com MBP/CFA

4.4 - Quantificação das subclasses de IgG em camundongos oralmente tolerizados com MBP

Dados da literatura mostram que as citocinas produzidas pelos linfócitos Th1, como é o caso do IFN γ , estão envolvidas na síntese de IgG2a, enquanto a IL4, produzida pelos linfócitos Th2, está relacionada com a síntese de IgG1 e IgE. Com o objetivo de entender quais as subclasses de IgG que foram suprimidas pela indução de tolerância oral a MBP, foram estudadas as subclasses do soro de animais tolerizados, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3.

Enquanto a síntese dos isotipos de IgG2a, IgG2b e IgG3, principalmente a classe IgG2b foi observada significativa redução (figura 4b, 4c e 4d) pela tolerização com o neuro-antígeno, não foi observada redução nos níveis de IgG1 (figura 4a).

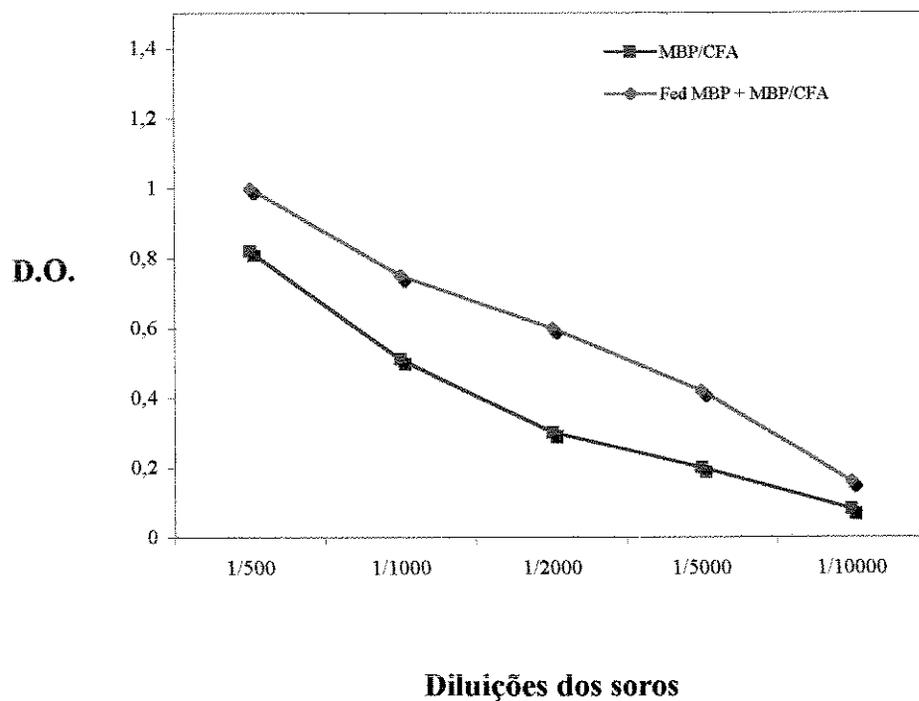


Figura 4a - Quantificação da subclasse IgG1 no soro de camundongos oralmente tolerizados com MBP e imunizados com MBP/CFA

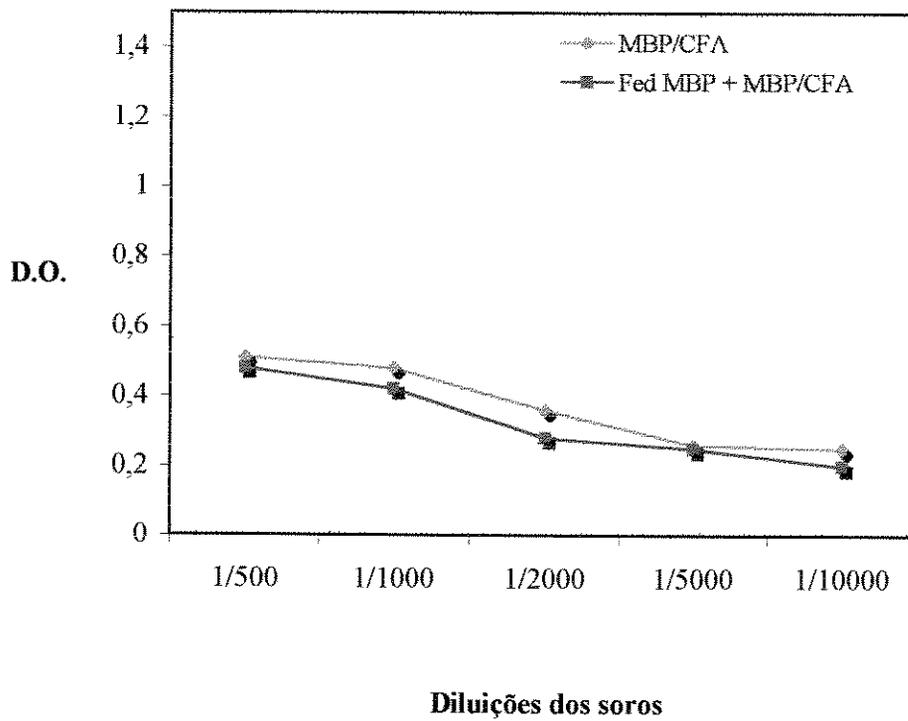


Figura 4b. Quantificação da subclasse IgG2a no soro de camundongos oralmente tolerizados com MBP e imunizados com MBP/CFA

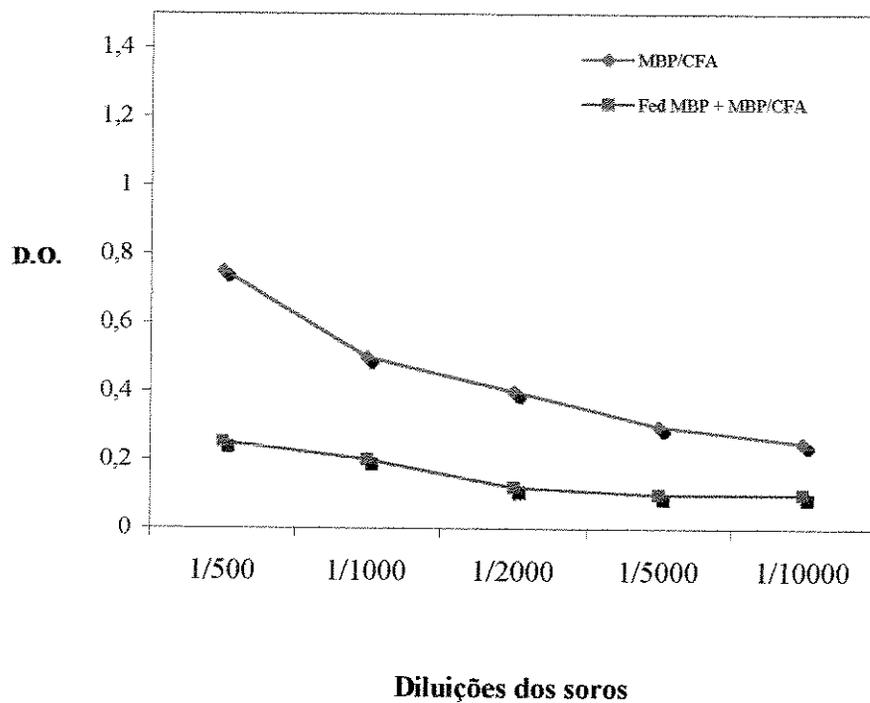


Figura 4c. Quantificação da subclasse IgG2b no soro de camundongos oralmente tolerizados com MBP e imunizados com MBP/CFA

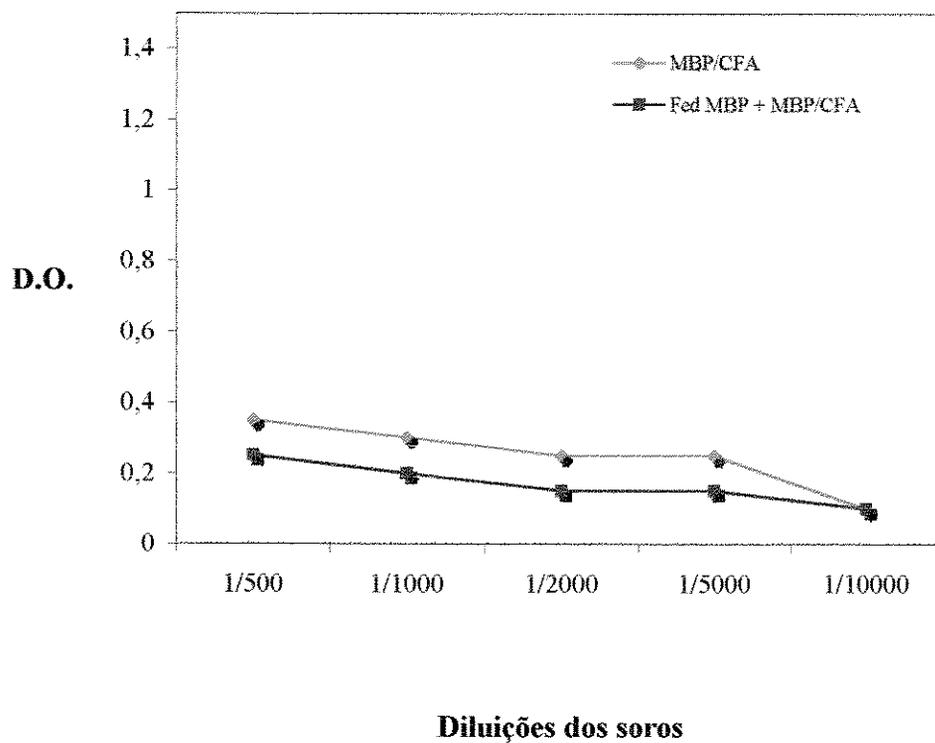


Figura 4d. Quantificação da subclasse IgG3 no soro de camundongos SJL/J oralmente tolerizados ou não com MBP e imunizados com MBP/CFA

4.5 - Citocinas produzidas pelas sub-populações de linfócitos T CD4+ e T CD8+ de camundongos oralmente tolerizados com MBP, sem posterior imunização

O efeito da indução de tolerância é normalmente observado após a imunização com o autoantígeno. Este grupo de experimento foi conduzido no sentido de se verificar o efeito da indução de tolerância, na ausência da imunização, sobre a produção das citocinas, pelas subpopulações de linfócitos T. Linfócitos do baço de animais oralmente tolerizados com MBP, sem posterior imunização, foram separados nas populações CD4 e CD8 e os níveis de IL2, IFN γ , IL4 e IL10 foram quantificados após estimulação com MBP e OVA “in vitro”, os resultados estão expressos nas figuras 5a, 5b, 5c e 5d e anexo 5. A figura 5c mostra níveis detectáveis de IL4 quando se analisou os linfócitos totais e no grupo enriquecido de linfócitos CD4, enquanto não se detectou níveis das demais citocinas.



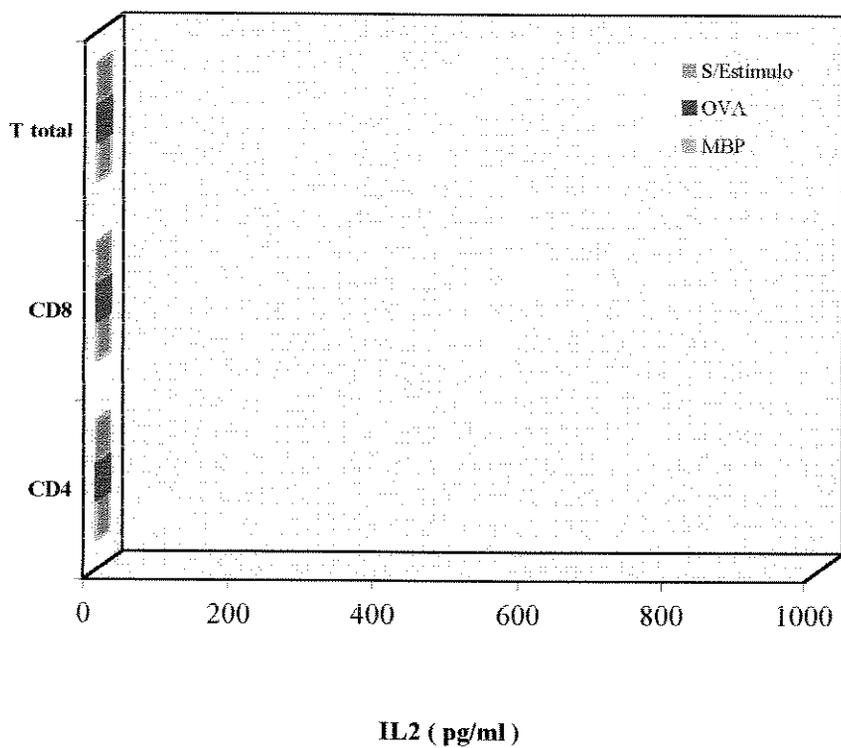


Figura 5a. Níveis de IL2 produzida por linfócitos T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP estimulados "in vitro" com MBP, OVA e não estimulados

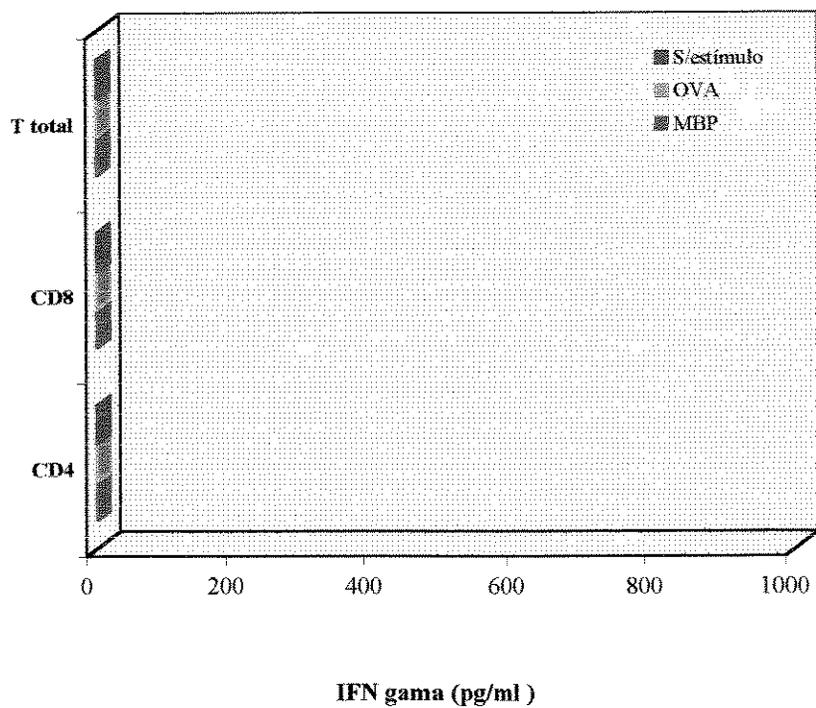


Figura 5b. Níveis de IFN gama produzido por linfócitos T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP estimulados com MBP, OVA e não estimulados

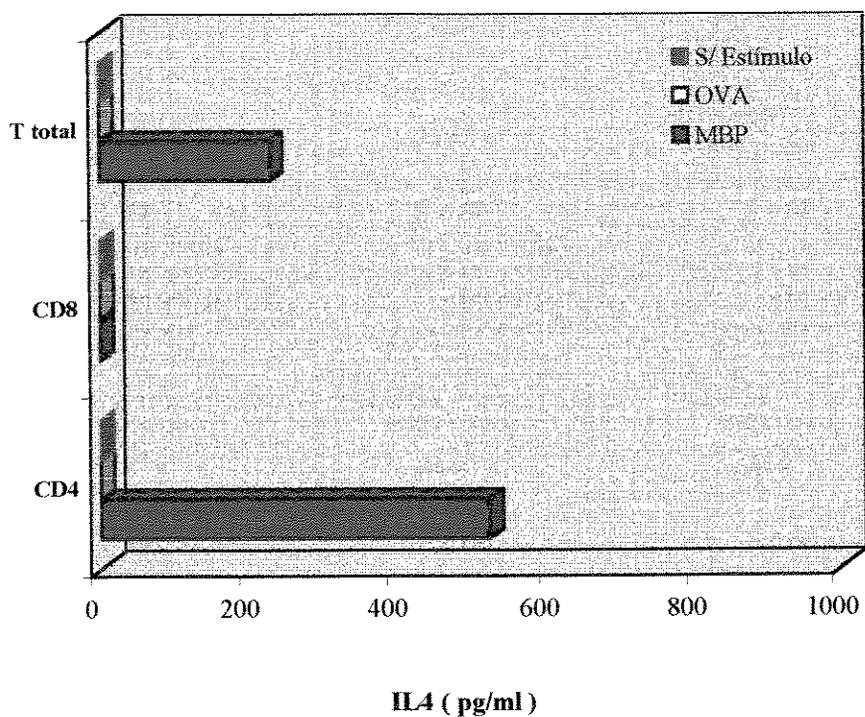


Figura 5c. Níveis de IL4 produzido por linfócitos T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP e estimulados "in vitro" com MBP, OVA e não estimulados

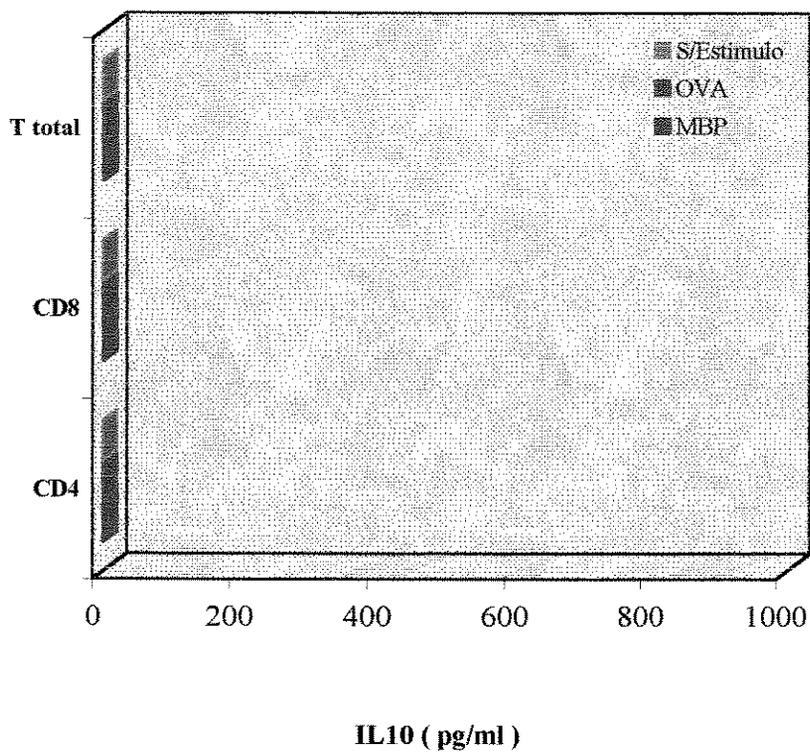


Figura 5d. Níveis de IL10 produzida por linfócitos T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP, estimulados com MBP, OVA e não estimulados

4.6- Níveis de IFN γ no sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongo tolerizados ou não com MBP e posteriormente imunizados com MBP/CFA

Os resultados anteriores mostraram as determinações de citocinas, na ausência da imunização com MBP/CFA. Como o protocolo que normalmente se emprega envolve a imunização, caso contrário não se observa a ativação linfocitária, os níveis de anticorpos específicos ou ainda a indução da doença estes experimentos foram realizados no sentido de se estudar a produção de citocinas após a imunização com MBP/CFA.

A figura e anexo 6 mostram que não há níveis detectáveis de IFN γ quando as células não foram estimuladas “*in vitro*” (1). Em (2) mostra que células de animais imunizados com MBP/CFA quando estimulados “*in vitro*” pelo antígeno específico, libera níveis consideráveis de IFN γ . Quando as células foram estimuladas “*in vitro*” com a proteína irrelevante (OVA) os níveis detectados são significativamente inferiores ($p < 0,01$). Em (3) observamos significativa redução dos níveis de IFN γ , quando os animais foram previamente tolerizados. Em (4), foi possível detectar pequena quantidade de IFN γ , quando os animais foram tolerizados oralmente. Estes níveis comparados ao do grupo imunizado, contudo, não são expressivos.

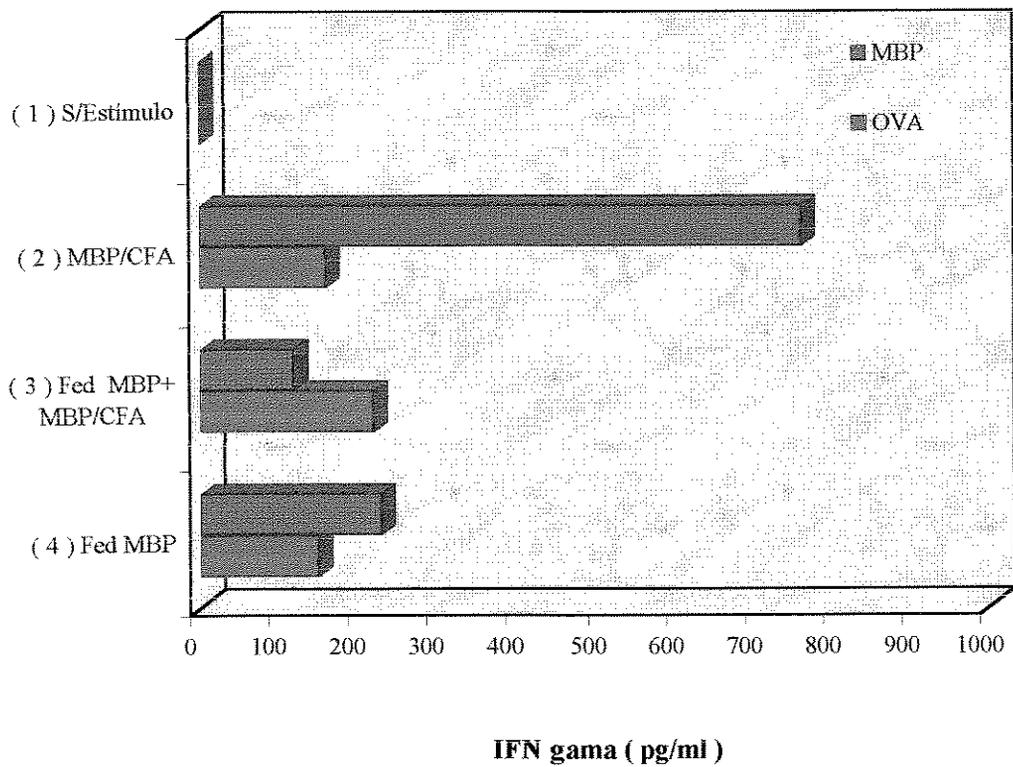


Figura 6. Níveis de IFN gama no sobrenadante de linfócitos de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP, posteriormente imunizados com MBP/CFA e estimulados "in vitro" com MBP e OVA

4.7- Níveis de IL4 no sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP e posteriormente imunizados com MBP/CFA

Os níveis de IL4 foram quantificados no sobrenadante de células de animais oralmente tolerizados com MBP e com posterior imunização. Linfócitos de animais imunizados com MBP/CFA e estimulados “in vitro” com MBP produziram níveis aumentados de IL4, quando se comparou ao grupo de células não estimulados “in vitro” . Estes níveis atingiram valores estatisticamente significativos ($p = 0,01$). A produção de IL4 de animais que foram previamente tolerizados com MBP foi muito superior ao grupo de células não estimulados “in vitro” ($p = 0,001$) e ao grupo de células provenientes de animais imunizados e não tolerizados ($p = 0,001$). Células de animais que foram apenas tolerizados, quando estimulados “in vitro” com o tolerógeno, produziram níveis moderados de IL4, que não foi estatisticamente significativos quando se comparou ao grupo de células não estimulados ($p > 0,05$).

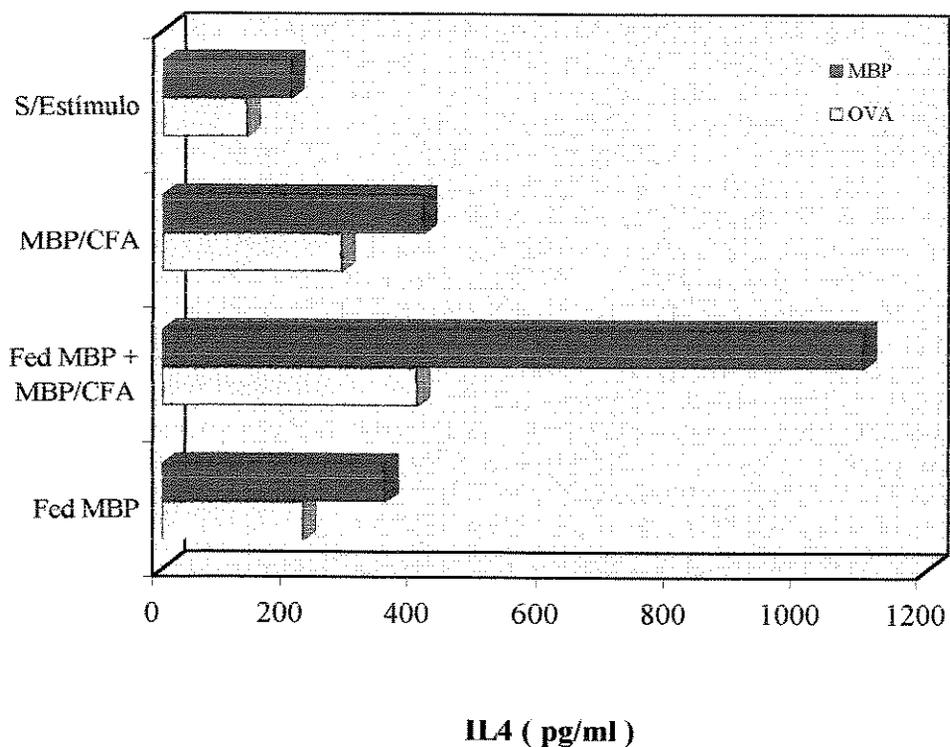


Figura 7. Níveis de IL4 no sobrenadante de linfócitos de camundongos oralmente tolerizados com MBP, posteriormente imunizados com MBP/CFA e estimulados "in vitro" com MBP ou OVA e não estimulados

4.8- Níveis de anticorpos (IgG total) anti-MBP do soro de camundongos tolerizados ou não com MBP e depletados “in vivo” com anticorpo monoclonal anti-IL4

Os dados anteriores mostraram que a tolerização oral com MBP, não alterou de forma significativa, a produção de IL4 e do isotipo de IgG que é sintetizada sob a ação dessa citocina. Os experimentos seguintes foram realizados no sentido de confirmar a importante participação da IL4 nos mecanismos de indução de tolerância oral.

Assim, os níveis de IgG total anti-MBP foram quantificados no soro de animais que foram depletados “in vivo” com anticorpo monoclonal anti-IL4. Como foi previamente demonstrado, a tolerização com MBP leva a redução dos níveis dos anticorpos específicos. A administração “in vivo” de anticorpo anti-IL4, reduziu de forma dramática a síntese de anticorpos anti-MBP. No entanto, quando os animais foram tolerizados oralmente e ao mesmo tempo tratados “in vivo” com o anticorpo anti-IL4, tivemos reversão parcial da supressão.

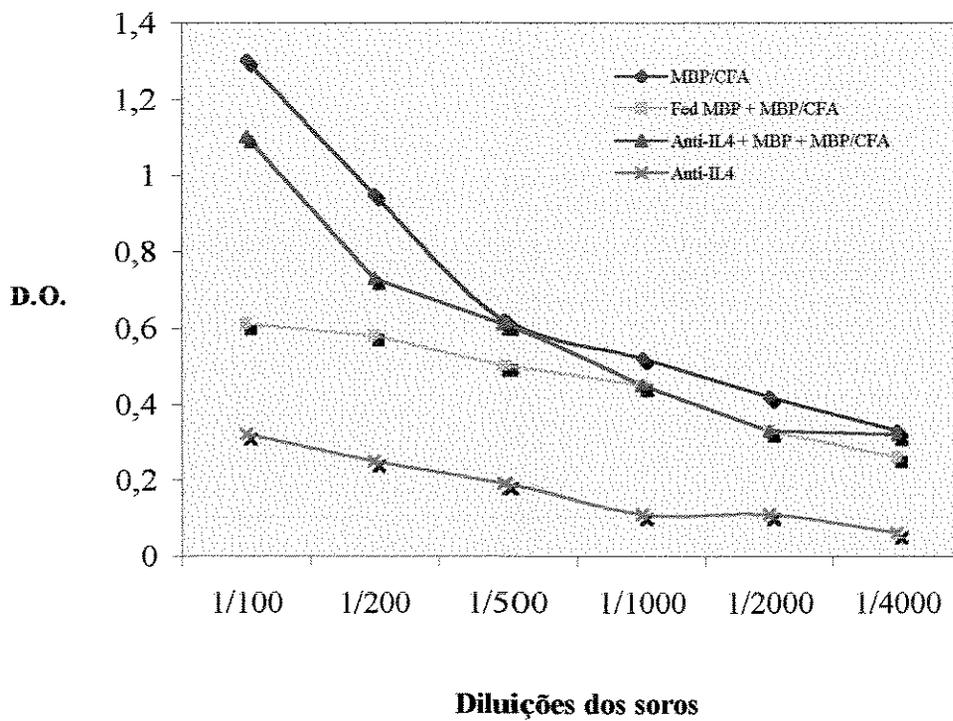


Figura 8. Níveis de anticorpos anti-MBP no soro de camundongos tolerizados ou não com MBP, depletados "in vivo" ou não depletados com anticorpo anti-IL4

4.9- Dosagem das sub-classes de IgG (IgG1, IgG2a e IgG3) e IgE no soro de camundongos tolerizados ou não com MBP e depletados “*in vivo*” com anticorpo monoclonal anti-IL4

A figura 9a mostra os níveis de anticorpos (IgG1, IgG2a, IgG3 e IgE) no soro de animais imunizados com MBP/CFA. A figura 9b apresenta níveis dos isotipos de IgG quando os animais foram oralmente tolerizados com MBP. Como já havíamos demonstrado anteriormente, a tolerização com MBP leva a aumento da IgG1 e mais discretamente de IgE, subclasses sintetizadas com a função de helper da IL4. A administração de anticorpos monoclonais anti-IL4 “*in vivo*”, reduz (0.9 para 0.6) os níveis de IgG1 e de IgE na concentração de 1/200 (figura 9c).

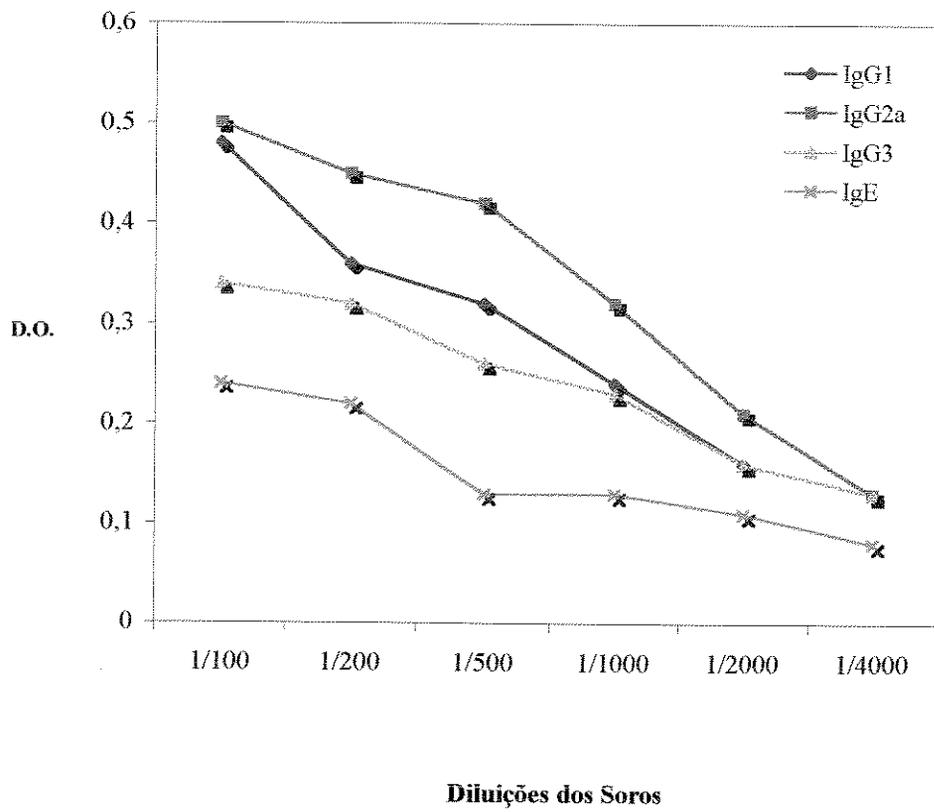


Figura 9a. Quantificação dos isotipos de IgG em camundongos SJL/J imunizados com MBP

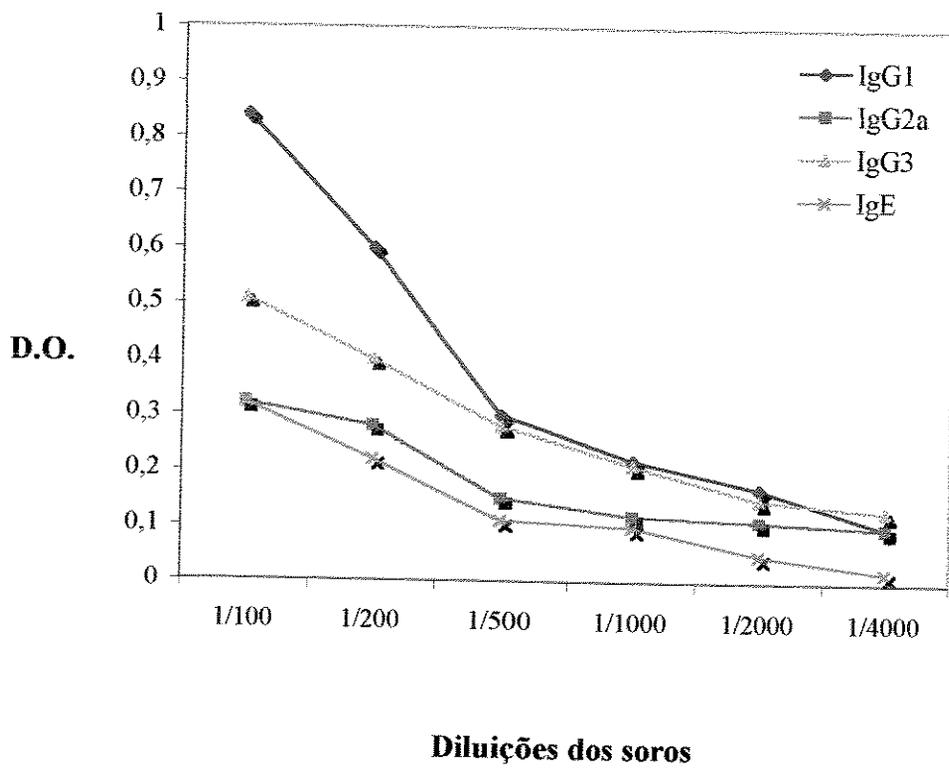


Figura 9b. Quantificação dos isotipos de IgG em camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP e imunizados com MBP/CFA

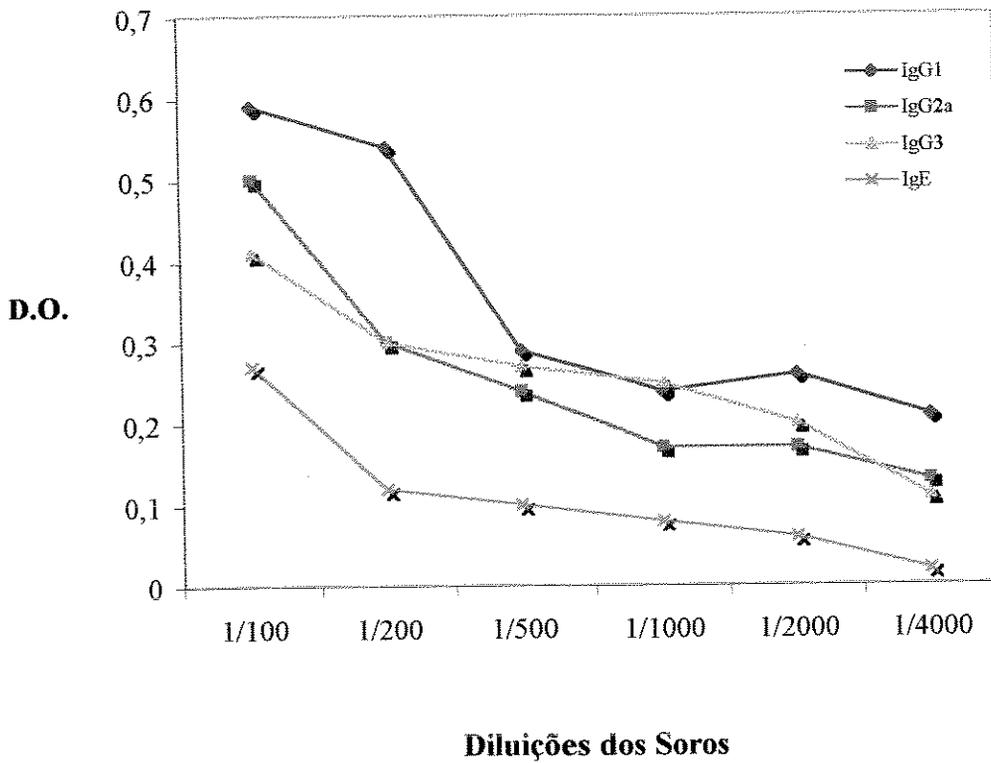


Figura 9c. Quantificação dos isotipos de IgG em camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP e depletados "in vivo" com anticorpo monoclonal anti-IL4 e imunizados com MBP/CFA

4.10- Níveis de IL4 no sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongo tolerizados ou não com MBP e depletados “*in vivo*” com anticorpo monoclonal anti-IL4

Os resultados obtidos apontam para importante participação da IL4 após a indução de tolerância oral. Assim, administraram-se anticorpo monoclonal anti-IL4 “*in vivo*” para reforçar os dados encontrados.

Na figura 10 mostramos níveis elevados de IL4 após a indução de tolerância oral à MBP, níveis estes que foram reduzidos com a administração “*in vivo*” de anticorpo monoclonal anti-IL4.

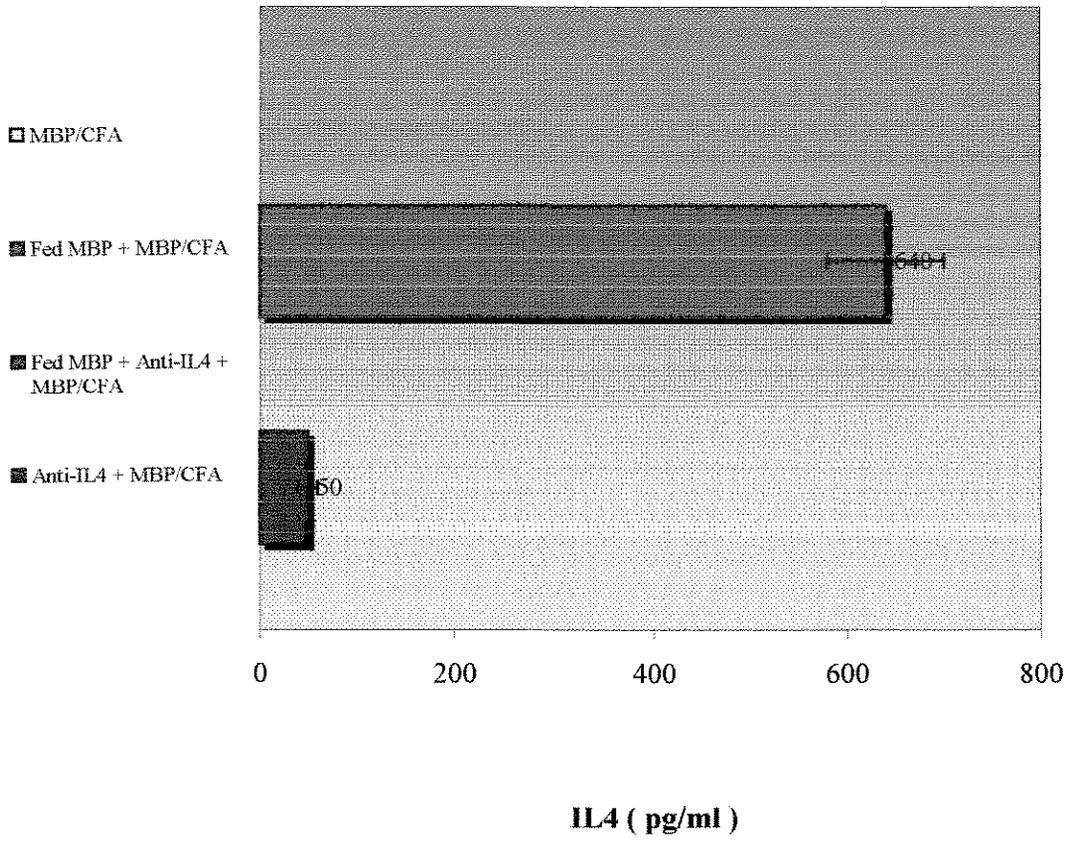


Figura 10. Níveis de IL4 no sobrenadante de cultura de linfócitos de camundongos tolerizados ou não com MBP, e depletados "in vivo" com anticorpo anti - IL4

4.11- Efeito da administração “in vivo” de anticorpo monoclonal anti-IL4 aos camundongos oralmente tolerizados com MBP

Com o objetivo de confirmar a participação da IL4 na redução da severidade da EAE, obtida pela administração oral da MBP, o anticorpo monoclonal anti-IL4 foi administrado aos camundongos que foram simultaneamente tolerizados com MBP oral. Observou-se que a administração de anti-IL4, reverte de forma parcial, a proteção induzida pela administração oral da MBP.

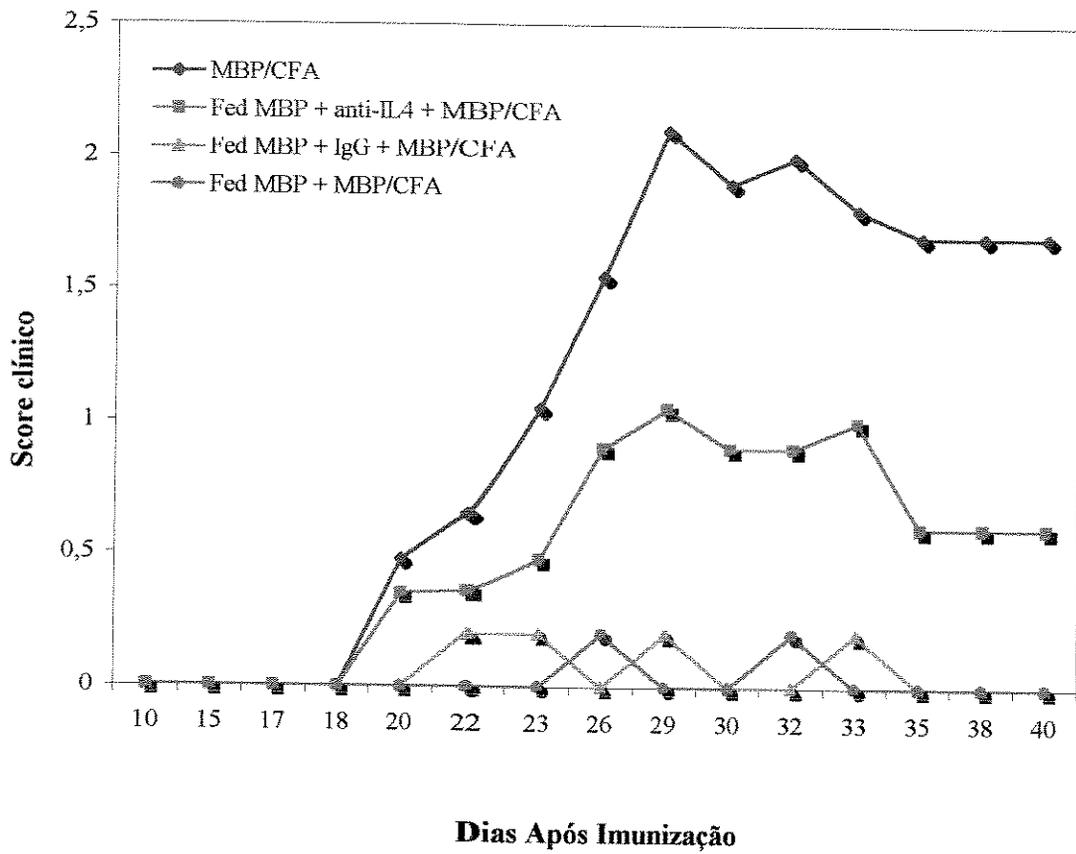


Figura 11. Efeito da administração de anticorpo monoclonal anti-IL4 "in vivo" na severidade da EAE, em camundongos oralmente tolerizados com MBP e imunizados com MBP/CFA

DISCUSSÃO

V- Discussão

O presente trabalho teve como objetivo, estudar como a indução de tolerância, obtida pela administração oral de proteína básica de mielina, influencia a síntese de citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2.

Várias evidências em humanos e modelos experimentais sugerem que as doenças autoimune podem desenvolver-se a partir de anormalidades nas citocinas produzidas por linfócitos T. Vários autores sugerem que as linfocinas produzidas pelos linfócitos Th1 estão envolvidas na gênese de doenças autoimune órgão-específica como a EAE (BROD et al., 1991; NICHOLSON & KUCHROO, 1996; LIBLAU et al., 1996). Clones de linfócitos derivados tanto de líquido céfaloraquidiano (CSF), como do sangue periférico de pacientes portadores de Esclerose Multipla apresentam o padrão de citocinas Th1. Assim, procedimentos que regulassem negativamente a expressão dos clones Th1 poderiam modificar o curso dessas doenças (NAVIKAS & LINK, 1996).

No presente trabalho, confirmando uma série de observações anteriores (HIGGINS & WEINER, 1988; LIDER et al., 1989; AL-SABBAGH et al., 1994; SANTOS et al., 1994), demonstramos que a administração oral de MBP reduz, de forma efetiva, a severidade da EAE (figura 1) . As observações clínicas foram confirmadas pelos dados laboratoriais, onde demonstramos que a administração oral de MBP reduz, significativamente, tanto a resposta proliferativa de linfócitos estimulados pelo auto-antígeno, como a produção de anticorpos específicos para a MBP (figuras 2 e 3). Administração oral do neuro-antígeno reduziu, de forma significativa os níveis de IgG total, no entanto, quando se analisou os isotipos de IgG, observou-se que os níveis de IgG1 não estavam diminuídos.

Está bem aceito na literatura atual que a população de linfócitos T helper é constituída de duas sub-populações distintas que são caracterizadas pelo padrão de citocinas que produzem , após a estimulação com o antígeno (PAUL & SEDER, 1994). Essas sub-

populações foram inicialmente identificadas clonando células de camundongos “in vitro”, mas fortes evidências sugerem que pelo menos três sub-populações existem “in vivo” tanto em camundongos, ratos e humanos. Nos camundongos, pelo menos três sub-populações foram identificadas: Th0, Th1 e Th2. A população Th0 é precursora das duas sub-populações, a população Th1 secreta IL2, IFN γ e TNF α , suporta a ativação de macrófagos, as reações de hipersensibilidade tardia e a conversão do isotipo IgG2a. A sub-população Th2 secreta IL4, IL5, IL6, IL10 e IL13, e é responsável pela função helper na ativação de células B e na conversão dos isotipos IgG1 e IgE (SNAPPER et al., 1988; O’GARRA & MURPHY, 1996). Nossos dados sugerem, portanto, que a administração oral de MBP, reduz a produção de citocinas produzidas pelos linfócitos Th1, uma vez que os isotipos produzidos pela ação principalmente da IL4 não sofreram alteração .

O próximo passo foi, portanto, quantificar os níveis das citocinas quando os animais receberam o antígeno oralmente, e as células foram estimuladas “in vitro” com o neuro-antígeno, e após a administração oral de MBP, seguido de imunização com a mesma. Observou-se que, mesmo na ausência da imunização, houve discreta produção de IL4 pelos linfócitos totais e sub-população CD4, quando as células foram estimuladas “in vitro” com MBP, o mesmo não acontecendo para a proteína irrelevante, e para as demais citocinas. A predominância das citocinas produzidas pelos linfócitos Th2 sobre Th1 foi observada também, após a imunização com a MBP. Estes dados estão em concordância com o grupo de Abul Abbas que mostrou que a indução de tolerância utilizando antígenos solúveis, suprime com maior facilidade a produção das citocinas pelos clones Th1, enquanto os Th2 são mais difíceis de tolerizar (BURSTEIN et al., 1992). Concorda também, com os autores que demonstraram que a indução de tolerância pela administração oral, em pequenas quantidades do auto-antígeno , ativava principalmente o mecanismo de supressão ativa, com a produção, em maior quantidade, de citocinas com efeito anti-inflamatório (FRIEDMAN E WEINER, 1994).

Estudos anteriores, empregando protocolo semelhante ao utilizado neste trabalho, mostraram que a administração oral de MBP ativa a função de células supressoras, ou que secretam citocinas com função imunossupressora, que podem ser adotivamente

transferidas para animais normais (LIDER et al., 1989; SANTOS et al., 1994). MILLER et al., 1991 mostraram que a interação do auto-antígeno com os linfócitos oralmente tolerizados é antígeno específica, a supressão observada, no entanto, é devida a maior produção de TGF β . O TGF β , por seu potente efeito imunossupressor levava à redução da severidade da EAE. Foi demonstrado também, que o TGF β pode regular negativamente a produção de citocinas pelos clones de linfócitos Th1, não alterando, contudo, as citocinas produzidas pelos linfócitos Th2. No modelo de infecção por *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* foi verificado que a produção de TGF β está associada à maior síntese de IL4 e redução da produção IFN γ (SEDER & PAUL, 1994; GARCIA, 1994).

Está bem aceito na literatura que a EAE é causada por clones de linfócitos Th1 específicos para os neuro-antígenos. Os resultados obtidos pela transferência dos clones Th2, também específicos para o auto-antígeno, com o objetivo de inibir o desenvolvimento da doença, no entanto, foram conflitantes (KHOURTS et al., 1995). Em trabalho recentemente realizado, os autores mostraram a supressão da EAE pela transferência adotiva das células específicas para o auto-antígenos, produtores de TGF β , clones que os autores denominaram Th3 (CHEN et al., 1994).

Se por um lado a transferência adotiva de clones Th2, específicos para o auto-antígeno mostrou resultados inconclusivos, a administração “in vivo” de citocinas produzidas por Th2, pode inibir o desenvolvimento e função das células Th1. Camundongos tratados com IL4 simultaneamente com a transferência de clones de células T encefalitogênicas, específicas para MBP, ficaram protegidos contra a EAE (RACKE et al., 1994; ROCKEN et al., 1996; NICHOLSON & KUCHROO, 1996). Estes autores sugeriram que tanto o fenótipo das células transferidas pode ser modificado pela IL4, como pode ter havido recrutamento de células para o sítio inflamatório dentro do cérebro, que foram desviadas para o fenótipo Th2, reduzindo dessa forma a EAE.

Diante da importância da IL4, e nossos dados mostrando o aumento dessa citocina e do isotipo IgG1, alguns experimentos, onde os animais receberam anticorpos anti-IL4 “in vivo”, foram conduzidos. Dessa forma, mostramos que administração oral de MBP

reduz a produção de IFN γ , não alterando o padrão de IL4. Os animais previamente tratados com os anticorpos anti-IL4, apresentaram redução dos níveis de anticorpos anti-MBP, quando os animais foram tolerizados, tratados com o anticorpo anti-IL4 e imunizado, no entanto, a supressão da síntese dos níveis de IgG foi menor, provavelmente diante da maior produção de IL4, a quantidade de anticorpo anti-IL4 não foi suficiente para neutralizar a citocina. Animais oralmente tolerizados com MBP, apresentaram níveis aumentados de IgG1 e IgE, que foram reduzidos pelo tratamento com anticorpo anti-IL4 “in vivo”, reforçando a idéia de que a síntese aumentada de IL4 pelos animais tolerizados, é responsável pela produção destes isotipos. Trabalhos anteriores, onde os autores mostram que a indução de tolerância a antígenos solúveis reduz os isotipos de IgG, IgG2a, IgG2b e IgG3, não reduzindo os níveis de IgG1 e IgE, dão adicional suporte a nosso estudo (DE WIT et al., 1992). A neutralização da IL4 pela administração “in vivo” do anticorpo monoclonal anti-IL4, revertendo os níveis obtidos pela indução de tolerância também foi verificado por BURSTEIN & ABBAS, 1993 .

Todas estas observações explicam os resultados expressos na figura 11, onde mostramos que a administração “in vivo” do anticorpo monoclonal anti-IL4 reverte, parcialmente, o efeito protetor obtido pela indução de tolerância oral ao neuro-antígeno, na EAE. Estes resultados mostram que a neutralizando a IL-4, retiramos o efeito regulatório exercido por essa citocina, sobre a expansão dos clones auto-reativos Th1 contra os componentes da mielina, revertendo a proteção obtida através da tolerância oral.

Outras abordagens, semelhantes à nossa, foram feitas, onde o sistema imune foi manipulado, com o deslocamento para ativação dos clones Th2, resultando na redução da severidade da EAE. Estudando a EAE induzida pela transferência adotiva de clones de células encefalitogênicas, os autores mostraram que, peptídeos específicos para esses clones protegiam os animais contra o desenvolvimento da doença. Neste sistema, peptídeos administrados na forma solúvel, resultava na regulação negativa da doença, com aumento da produção de IL-4 e profunda redução da reação inflamatória no sistema nervoso central (BROCKE et al., 1996).

Enquanto o balanço das citocinas, produzidas pelos clones Th1 e Th2 modulam

o curso clínico das doenças auto-imunes órgão-específicas, pouco se conhece sobre o micro-ambiente onde estas células se diferenciam. Algumas citocinas como a IL12 e IL4 estão envolvidas na diferenciação dos clones Th1 e Th2 respectivamente. (KAPLAN et al., 1996; SHIMODA et al., 1996).

A manipulação das moléculas co-estimulatórias expressas na superfície celular, tanto através da ativação como do bloqueio, pode afetar a diferenciação de determinados fenótipos de linfócitos T e modulam a severidade da EAE. As moléculas co-estimulatórias CD28/CTLA4 e B7.1 e B7.2 são extremamente importantes na relação do balanço das citocinas e diferenciação de linfócitos T. A administração “in vivo” de uma molécula homóloga de CTLA4 que bloqueia a interação com B7.1 e B7.2, inibe o desenvolvimento da EAE, aumentando a expressão de citocina Th2 no cérebro dos animais (KHOURY et al., 1995). Estudos “in vivo” utilizando anticorpos anti B7.1 e B7.2 mostram que essas moléculas parecem ter participação distintas na indução da EAE. A EAE ativamente induzida é inibida pelo tratamento com anticorpos monoclonais anti-B7.1, mas é exacerbada pela administração de anticorpos anti-B7.2 (RACKE et al., 1995; KUCHROO et al., 1995). A administração de anticorpos anti-B7.1 “in vivo” simultaneamente com a imunização não inibe a indução de células sensibilizadas ao auto-antígeno mas altera o padrão das células T, resultando na ativação de clones Th2, que uma vez transferidos, protegem o animal da EAE e reverte a doença já estabelecida (KUCHROO et al., 1995).

Nosso trabalho, somado ao de outros autores, suporta a hipótese de que o balanço das citocinas produzidas por linfócitos Th1/Th2 participam ativamente na indução e regulação da autoimunidade. As doenças autoimunes órgão-específicas mais destrutivas são provavelmente iniciadas pelos clones de linfócitos Th1. As citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 são amplificadoras das reações inflamatórias que resultam no dano tissular. Uma vez que as citocinas produzidas por clones Th2 têm efeito anti-inflamatório, elas podem inibir a função dos macrófagos e as reações de hipersensibilidade tardia, funcionando como reguladores naturais. Assim, em condições normais ou na presença de antígenos estimuladores das citocinas produzidas por clones Th2, como a IL-4 , pode ocorrer uma resposta imune normal havendo inibição da resposta patológica contra os auto-antígenos.

Quando as condições do micro-ambiente mudam, favorecendo a diferenciação dos clones auto-reativos do tipo Th1, o equilíbrio é quebrado e temos como resultado a auto-reatividade destrutiva.

CONCLUSÕES

Os resultados encontrados nos permitem concluir que:

1- A administração oral de MBP reduz, de forma efetiva, a severidade da Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE).

2- A administração oral de MBP a camundongos SJL/J reduz a resposta linfoproliferativa ao tolerógeno, assim como a resposta específica de anticorpos.

3- Células de linfonodos e esplênicas de animais oralmente tolerizados com MBP, com posterior imunização com MBP/CFA ou não, produzem níveis aumentados de IL4, com redução dos níveis de IFN γ .

4- A sub-classe de IgG (IgG1) e IgE, anticorpos produzidos pela ação de IL4, não sofrem redução significativa nos animais oralmente tolerizados com MBP. A depleção de IL4 “in vivo” , no entanto, diminui sensivelmente a síntese destas sub-classes.

5- A administração “in vivo” do anticorpo monoclonal anti-IL4, reverte parcialmente a proteção, contra EAE, conseguida pela administração oral de MBP.

APÉRIJCE

Anexo 1. Evolução clínica da EAE em camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP e OVA como controle

Dias após imuniz.	S.M.C Fed MBP + MBP/CFA	S.C.M. MBP/CFA
19	0	0,6
20	0	0,9
21	0	1,1
22	0	2,0
23	0,5	2,3
24	0	2,8
25	0	2,6
26	0	2,6
27	0	2,1
28	0	2,3
29	0	2,2
30	0	1,9
31	0	2,1
32	0	2,1
33	0	2,1
34	0	2,0
35	0	2,0
36	0	2,1
37	0	2,0
38	0	2,1
39	0	2,3
40	0	2,0
41	0	2,2
42	0	2,2
43	0	2,2
44	0	2,1
45	0	1,9
46	0	1,9
47	0	2,2
48	0	2,2
49	0	2,2

S.M.C – Média do grau da doença em cada dia

Anexo II – Resposta proliferativa de linfócitos de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP e OVA e imunizados posteriormente com MBP/CFA

Exp.nº	MBP/CFA	Fed MBP + MBP/CFA	Fed OVA + MBP/CFA
1	38 632	9 830	34 934
2	40 132	11 430	39 147
3	36 320	8 432	36 720
média	38 361± 1920	9 897 ± 1500	36 933 ± 2114

Anexo III – Níveis de anticorpos anti- MBP no soro de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP ou OVA e posteriormente imunizados com MBP/CFA

	Exp # 1			Exp # 2			Exp # 3			Média		
	MBP /CF A	FED MBP	FED OV A	MBP /CF A	FED MBP	FED OV A	MBP /CF A	FED MBP	FED OV A	MBP /CF A	FED MBP	FED OV A
1:100	1,34	0,26	1,30	1,36	0,28	1,28	1,38	0,30	1,28	1,36	0,28	1,29
1:200	1,10	0,20	1,00	1,12	0,22	1,09	1,18	0,19	1,12	1,13	0,20	1,07
1:500	0,60	0,12	0,58	0,62	0,09	0,60	0,56	0,10	0,60	0,60	0,10	0,60
1:1.000	0,48	0,12	0,46	0,50	0,10	0,48	0,44	0,10	0,44	0,47	0,11	0,46
1:5.000	0,36	0,12	0,38	0,38	0,10	0,36	0,36	0,10	0,39	0,36	0,11	0,38

Anexo IV – Quantificação dos níveis de IgG em camundongos oralmente tolerizados com MBP e posteriormente imunizados com MBP/CFA

	IgG1		IgG2a		IgG2b		IgG3	
	MB P/CF A	Fed MBP + MBP	MB P/CF A	Fed MBP + MBP	MB P/CF A	Fed MBP + MBP	MB P/CF A	Fed MBP + MBP
1:500	0,82	1,00	0,50	0,48	0,75	0,25	0,35	0,25
1:1.000	0,51	0,75	0,48	0,42	0,50	0,20	0,30	0,20
1:2.000	0,30	0,60	0,36	0,28	0,40	0,12	0,25	0,15
1:5.000	0,20	0,42	0,26	0,25	0,30	0,10	0,25	0,15
1:10.000	0,08	0,16	0,25	0,20	0,25	0,10	0,10	0,10

Anexo Va – Níveis de citocinas produzidas pelas populações T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP e estimulados “in vitro” com OVA. Resultados expressos em pg/ml.

OVA			
	T total	CD 4	CD 8
IL2			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IFNγ			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IL4			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IL10			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0

Anexo Vb – Níveis de citocinas produzidas pelas populações T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J não tolerizados e sem qualquer estímulo. Resultados expressos em pg/ml.

SEM ESTÍMULO			
	T total	CD 4	CD 8
IL2			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IFNγ			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IL4			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IL10			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0

Anexo Vc – Níveis de citocinas produzidas pelos linfócitos T CD4 e CD8 de camundongos SJL/J oralmente tolerizados ou não com MBP, e estimulados “in vitro” com MBP. Resultados expressos em pg/ml.

MBP			
	T total	CD 4	CD 8
IL2			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IFNγ			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0
IL4			
Exp#1	220	500	0
Exp#2	250	490	0
Exp#3	280	520	0
Exp#4	180	500	0
Total	230 \pm 40	520 \pm 10	0
IL10			
Exp#1	0	0	0
Exp#2	0	0	0
Exp#3	0	0	0
Exp#4	0	0	0
Total	0	0	0

Anexo VI – Níveis de IFN γ no sobrenadante de células esplênicas de camundongos SJL/J que receberam oralmente MBP e foram imunizados ou não com MBP/CFA e estimulados com MBP ou OVA

Exp. nº	Fed MBP (5X0,25mg)		Fed MBP (5x0,25) Imuniz		Imuniz MBP/CFA		Sem Estímulo	
	OVA	MBP	OVA	MBP	OVA	MBP	OVA	MBP
“In Vitro”								
1	160	210	140	120	120	740	ND	ND
2	140	160	160	90	220	920	ND	ND
3	160	320	240	160	140	620	ND	ND
Média	150	230	220	120	160	760		

Obs. Resultados expressos em pg/ml

Anexo VII – Níveis de IL4 no sobrenadante de cultura de linfócitos de animais tolerizados ou não com MBP, e não imunizados

Grupos de exp.	Estímulo "in vitro"		
	MBP	OVA	S/ESTÍMULO
Fed MBP	350	220	500
Fed MBP + MBP/CFA	1.100	400	860
MBP/CFA	410	280	500
S/Estímulo	200	130	270

Obs. Resultados expressos em pg/ml

Anexo VIII – Níveis de anticorpos anti-MBP nos soros de camundongos tolerizados ou não com MBP, e depletados “in vivo” ou não com anticorpo anti-IL4

Diluições dos soros	MBP/CFA	Fed MBP + anti-IL4 + MBP/CFA	Fed MBP + MBP/CFA	Anti-IL4 + MBP/CFA
1/100	1,3	1,1	0,61	0,32
1/200	0,95	0,73	0,58	0,25
1/500	0,62	0,61	0,50	0,19
1/1000	0,52	0,45	0,45	0,11
1/2000	0,42	0,33	0,33	0,11
1/4000	0,33	0,26	0,32	0,06

Anexo IX – Dosagem das diferentes classes de IgG (IgG1,IgG2a , IgG3) e IgE no soro de camundongos tolerizados ou não com MBP e depletados “in vivo” com anticorpo monoclonal anti IL4

Tabela 9a.

Diluições dos soros	IgG1	IgG2a	IgG3	IgE
	D.O			
1/100	0,48	0,58	0,34	0,24
1/200	0,36	0,45	0,32	0,22
1/500	0,32	0,42	0,26	0,13
1/1000	0,24	0,32	0,23	0,13
1/2000	0,16	0,21	0,16	0,11
1/4000	0,13	0,13	0,13	0,08

Tabela 9b.

Diluições dos soros	IgG1	IgG2a	IgG3	IgE
	D.O			
1/100	0,84	0,32	0,51	0,32
1/200	0,60	0,28	0,40	0,28
1/500	0,25	0,15	0,28	0,11
1/1000	0,21	0,12	0,21	0,10
1/2000	0,15	0,11	0,15	0,05
1/4000	0,10	0,10	0,13	0,02

Tabela 9c.

Diluições dos soros	IgG1	IgG2a	IgG3	IgE
	D.O			
1/100	0,59	0,50	0,41	0,27
1/200	0,54	0,30	0,30	0,12
1/500	0,29	0,24	0,27	0,10
1/1000	0,24	0,17	0,25	0,08
1/2000	0,26	0,17	0,20	0,06
1/4000	0,21	0,13	0,11	0,02

AnexoX1 – Referente à figura 11. Score clínico da EAE observando o efeito da administração “in vivo” de anticorpo monoclonal anti- IL4 aos camundongos SJL/J oralmente tolerizados com MBP

Dias após imuniz.	MBP/CFA	Fed MBP + anti-IL4 + MBP/CFA	Fed MBP + IgG + MBP/CFA	Fed MBP + MBP/CFA
		S.M.C		
19	0,48	0,35	0	0
21	0,65	0,36	0,2	0
22	1,05	0,48	0,2	0
23	1,55	0,9	0	0
26	2,1	1,05	0,5	0,2
27	2,05	1,3	0	0
30	1,9	0,9	0	0
33	2,0	0,9	0	0
35	1,8	1,0	0,5	0,2
40	1,7	0,6	0	0
42	1,7	0,6	0	0
45	1,7	0,6	0	0

Obs. S.M.C = Média do grau da doença em cada dia

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

VII- Referências Bibliográficas

- AL-SABBAGH, A.; MILLER, A.; SANTOS, L. M. B. & WEINER, H. L. Antigen-driven tissue-specific suppression following oral tolerance: orally administered myelin basic protein suppresses proteolipid protein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in the SJL/J mouse. **Eur. J. Immunol.** **24**: 2104 – 2109, 1994
- AL-SABBAGH, A. M.; GOAD, E. P.; WEINER, H. L. & NELSON, P. A. Decreased CNS inflammation and absence of clinical exacerbation of disease after six months oral administration of bovine myelin in disease SJL/J mice with chronic relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. **J. Neur. Res.** **45**: 424 – 429, 1996.
- 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.
- BROD, S. A.; BENJAMIN, D. & HAFLER, D. A. Restricted T cell expression of IL2/IFN γ mRNA in human inflammatory disease. **J. Immunol.** **147**: 810 - 815 , 1991.
- BURSTEIN, H. J.; SHEA, C. M. & ABBAS, A. K. Aqueous antigens induce “*in vivo*” tolerance selectively in IL2 and IFN γ producing (Th1) cells. **J. Immunol.** **148**: 3687 – 3691, 1992

BURSTEIN, H.L. & ABBAS, A. K. "*In vivo*" role Interleukin 4 in T cell tolerance induced by aqueous protein antigen. **J. Exp. Med.** **177**: 457 – 463, 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

DE WIT, D.; MECHELEN, M.V.; RYELANDT, M.; FIGUEIREDO, A. C.; ABRAMOWICZ, D.; GOLDMAN, M.; BAZIN, H.; URBAIN, J. & LEO, O. The injection of deaggregated gamma globulins in adult mice induces antigen-specific unresponsiveness of T helper type 1 but not type 2 lymphocytes. **J. Exp. Med.** **175**: 9-14, 1992.

DEIBLER, G.E., MARTERSON, 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.

FRIEDMAN, A. & WEINER, H. Induction of anergy or active suppression following oral tolerance is determined by antigen dosage. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **91**: 6688 – 6692, 1994.

FRIEDMAN, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L. M. B.; FISHMAN-LOBELL, F.; 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.

FRITZ, R. B.; JEN CHOU, C.H & McFARLIN, D. E. Induction of experimental allergic encephalomyelitis in PL/J and (SJL/J x PL/J)F₁ mice by myelin basic protein and its peptides localization of a second encephalitogenic determinant. **J. Immunol. 130:** 191 –194, 1983.

GARCIA, C. A. A. C. Suppressive and protective immunity in Chagas Disease induced by a *Trypanosoma cruzi* soluble extract antigen. The role of Transforming Growth Factor β 1 and IFN γ . **Tese de Mestrado – UNICAMP - 1994.**

GILBERT, K. M. T cell clonal anergy. **Chem. Immunol. 58:** 92 – 116, 1994.

HIGGINS, P. J. & WEINER, H. L. Suppression of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by oral administration of myelin basic protein and its fragments. **J. Immunol. 140:** 440 – 445, 1988.

HOLOSHITZ, J.; FRENKEL, A.; BEN-NUN & COHEN, I. R.. Autoimmune encephalomyelitis (EAE) mediated and prevented by the lymphocytes lines directed against diverse antigenic determinants of myelin basic protein: vaccination is determinant specific. **J. Immunol. 131:** 2810 - 2813 , 1983.

JEN CHOU, C.-H.; SHAPIRA, R. & FRITZ, R. B. Encephalitogenic activity of the small form of mouse myelin basic protein in the SJL/J mouse. **J. Immunol. 130:** 2183 – 2186, 1983.

- KAPLAN, M. H.; SUN, Y; HOEY, T. & GUSBY, M. J. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in STAT difference. **Nature** **382**: 174 – 177, 1996.
- KHOURY, S. J.; AKALIN, E.; CHANDRAKER, A.; TURKA, L. A.; LINSLEY, P. S.; SAYEGH, M. H. & HANCOCK, W. W. CD28-B7 Costimulatory blockade by CTLA41g prevents actively induced Experimental Encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the Central Nervous System. **J. Immunol.** **155**: 4521 – 4524, 1995.
- KHOURY, S. J.; HANCOCK, W.W. & WEINER, H. L. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from Experimental Autoimmune Encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of Transforming Growth Factor β , Interleukin 4, and Prostaglandin E expression in the brain. **J. Exp. Med.** **176**: 1355 – 1364, 1992.
- KHORUTS, A.; MILLER, S. D. & JENKINS, M. K. Neuroantigen-specific Th2 cells are inefficient suppressors of experimental autoimmune encephalomyelitis induced by effector Th1 cells. **J. Immunol.** **155**: 5011 – 5017, 1995.
- KRUISBEEK, A. M. & ANSEN, D. Mechanisms underlying T-cell tolerance. **Cur. Op. Immunol.** **8**: 233 – 244, 1996.
- KUCHROO, V. K.; PRABHU, DAS. M.; BROWN, J. A.; RANGER, A. M.; ZAMVIL, S. S.; SOBEL, R. A.; WEINER, H. L.; NABAVI, N. & GLINCHER, L. H. B7.1 and B7.2 co-stimulatory molecules activated differentially the Th1/Th2 developmental pathways: Application to autoimmune disease therapy. **Cell** **80**: 707 – 718, 1995.

- LIBLAU, R. S.; SINGER, S. M. & Mc DEVITT, H. O. Th1 e Th2 CD4 T cells in pathogenesis of organ-specific autoimmunity diseases. **Immunol Today** **16**: 34 – 38, 1995.
- LENSCHOW, D. J.; WALUNAS, T. L. & BLUESTONE, J. F. CD28/B7 System of T cell costimulation. **Annu. Rev. Immunol.** **14**: 233 – 258, 1996.
- LIDER, O; SANTOS, L. M. B.; LEE, C. S. Y.; HIGGINS, P. J. & WEINER, H. L. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by the oral administration of myelin basic protein.II. Suppression of disease and *in vitro* immune responses is mediated by antigen-specific CD8+ T lymphocytes. **J. Immunol.** **142**: 748 – 752, 1989.
- LINSLEY, P. S. & LEDBETTER, J. A. The role of the CD28 receptor during cell responses to antigen. . **Annu. Rev. Immunol.** **11**: 191 – 212, 1993.
- LOWRY, O. H.; ROSENBROUGH, N. J.; FARR, A. L. & RANDERL, R. D. Protein measurement with folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** **193**: 265 – 275, 1951.
- McFARLING, D. E. & McFARLAND, H. F. Multiple Sclerosis. **N. Engl. J. Med.** **307**: 1183 – 1188, 1982.
- MILLER, A.; LIDER, O. & WEINER, H. L. Antigen-driven Bystander Suppression after oral administration of antigens. **J. Exp. Med.** **174**: 791 – 798, 1991.

MILLER, A.; LIDER, O.; ROBERTS, A. B.; 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.

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.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. V.; GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. **J. Immunol.** **136**: 2348 – 2357, 1986.

MOWAT, A.M. The regulation of immune responses to dietary protein antigens. **Immunol Today** **8**: 93 – 98, 1987.

NAVIKAS, V. & LINK, H. Review: Cytokines and the pathogenesis of Multiple Sclerosis. **J. Neur. Res.** **45**: 322 – 333, 1996.

NICHOLSON, L. B. & KUCHROO, V. Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune diseases. **Cur. Opin. Immunol.** **8**: 837 – 842, 1996

O'GARRA, A. & MURPHY, K. Role of cytokines development of Th1 and Th2 cells. **Chem. Immunol.** **63**: 1 – 13, 1996.

ORTIZ – ORTIZ & WEIGLE, W. O. Cellular events in the induction of Experimental Allergic Encephalomyelitis in rats. . **J. Exp. Med.** **144:** 604 – 616, 1976.

OWEN, R. D. Immunogenetic consequences of vascular anastomoses between bovine twins. **Science.** **102:** 400 – 401, 1945.

PAUL, W.S. & SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell** **76:** 242 – 251, 1994.

RACKE, M. K.; BONOMO, A.; SCOTT, D. E.; CANNELLA, B; LEVINE, A.; RAINE, C. S.; SHEVACH, E. M. & RÖCKEN, M. Cytokine-induced Immune deviation as a therapy for inflammatory autoimmune disease. **J. Exp. Med.** **180:** 1961 - 1966. 1994.

ROCKEN, M.; RACKE, M. K. & SHEVACH, E. M. IL-4 induced immune deviation as antigen-specific therapy for inflammatory autoimmune disease. **Immunol. Today** **17:** 225 – 231, 1996

SANTOS, L.M.B.; AL-SABBAGH, A.; LONDONO, A. & WEINER, H. L. Oral tolerance to myelin basic protein induces TGF β secreting T cells in Peyer's patches. **Cell Immunol.****157:** 439 – 447, 1994.

SANTOS, L.M.B.; LIDER, O.; AUDETTE, J.; KHOURY, S. J. & WEINER, H. L. Characterization of immunomodulatory properties and accessory cell function of small intestinal epithelial cells. **Cell Immunol.****127:** 26 – 34, 1990.

SEDER, R.A. & PAUL, W.E.. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Ann.Rev.Immunol.** **12:** 635 – 673, 1994.

SHIMODA, K.; VANDEURSEN, J.; SANGSTEK, M. Y.; SARAWAR, S. R.; CARSON, R. T.; TRIPP, R. A.; CHUC, C.; QUELLE, F. W.; NOSAKA, T. & VIGNALLI, D. A. Lack of IL4 induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted stat 6 gene. **Nature** **380:** 630 – 633, 1996.

SNAPPER, C. M.; FINKELMAN, F. D. & PAUL, W. E. Differential regulation of IgG1 and IgE synthesis by Interleukin 4. **J. Exp. Med.** **167:** 183 – 196, 1988.

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

VACCHIO, M. S. & ASHWELL, J. D. Mechanisms of regulation: T cell tolerance. **Chem. Immunol.** **58:** 1 – 33, 1994.

WEINER, H.L.; MACKIN, G. A.; MATSUI, M.; ORAV, E. J.; KHOURY, S. J.; DAWSON, D. M. & HAFLER, D. A. Double-blind pilot trial of oral tolerization with myelin antigens in Multiple Sclerosis. **Science.** **259:** 1321 – 1324, 1993.

WEINER, H.L.; MILLER, A.; KHOURY, S. J.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L. M. B.; SAYED, M.; NUSSEMBLATT, 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. **Ann.Rev.Immunol. 12:** 809 – 837, 1994.

WUCHERPFENNING, K. W. & STOMINGER, 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.

YANG, X-D.; TISCH, R. & Mc DEVITT, H. O. Selective targets for immunotherapy in autoimmune disease. **Chem. Immunol. 60:** 20 – 31, 1995.

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.

RESUMO

A Encefalomielite Experimental Autoimune (EAE) é um modelo de doença autoimune mediada por células T e tem sido utilizado para o entendimento da Esclerose Múltipla humana. Os linfócitos CD4 Th1 têm sido implicados na patogenia da EAE. Citocinas como IL2, TNF α e IFN γ foram detectadas no Sistema Nervoso Central durante a fase aguda da doença. A administração oral de Proteína Básica de Mielina (MBP) tem sido utilizada para reduzir a gravidade da EAE.

O presente estudo teve por objetivo estudar como a administração oral de neuro-antígenos pode modificar a padrão das citocinas produzidas pelos linfócitos Th1 e Th2.

A EAE foi induzida em camundongos SJL/J pela administração de MBP/CFA. A tolerância oral foi conseguida com a administração de 5x 0,25mg de MBP, administrou-se anticorpo monoclonal anti-IL4, obtido de clones 11B11 e as demais citocinas foram quantificadas utilizando-se o método de ELISA de captura. Anticorpos anti-MBP e subclasses de IgG foram quantificados por ELISA.

Observou-se que a administração oral de MBP levou a significativa diminuição da EAE e redução na produção de IFN γ e IL2, enquanto os níveis de IL4 não modificaram. Com relação aos isotipos de IgG específicos para MBP foi observado redução da IgG total mas não do isotipo IgG1 e IgE. A administração "*in vivo*" do anticorpo monoclonal anti-IL4 reverte parcialmente a proteção obtida pela indução de tolerância oral a MBP.

Estes dados mostram que a administração oral de MBP toleriza mais facilmente os clones de linfócitos Th1, clones estes envolvidos na patogenia da EAE.