



UFBA

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



FIOCRUZ

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**OBTENÇÃO DE CÉLULAS COM PROPRIEDADES  
IMUNOMODULADORAS *IN VITRO*:**

**Avaliação preliminar dos efeitos de anticorpos anti-CD4 e  
de cultivo celular prolongado.**

**MARCELO DOS SANTOS TEIXEIRA**

**Salvador - Bahia - Brasil  
2003**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**OBTENÇÃO DE CÉLULAS COM PROPRIEDADES  
IMUNOMODULADORAS *IN VITRO*:**

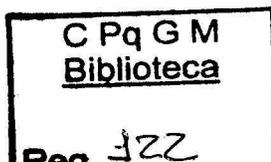
**avaliação preliminar dos efeitos de anticorpos anti-CD4 e  
de cultivo celular prolongado.**

**MESTRANDO: MARCELO DOS SANTOS TEIXEIRA**

**ORIENTADOR: LAIN CARLOS PONTES DE CARVALHO**

Dissertação apresentada para  
obtenção do grau de Mestre  
em Patologia Experimental

Salvador – Bahia, 2003



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do CPqGM /FIOCRUZ  
Salvador - Bahia.

Teixeira, Marcelo dos Santos

T266o Obtenção de células com propriedades imunomoduladoras in vitro:  
avaliação preliminar dos efeitos de anticorpos anti-CD4 e de cultivo  
celular prolongado / Marcelo dos Santos Teixeira. \_ Salvador:  
Universidade Federal da Bahia / Fundação Oswaldo Cruz, 2003.  
71f. : il.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade  
Federal da Bahia, 2002.

1. Imunologia celular. 2. Tolerância. 3. In vitro. I. Título.

CDU 577.27

L12021

577.27  
T266e

P4L  
11/10/03  
10/1/06

OBTENÇÃO DE CÉLULAS COM PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS *IN VITRO*:  
AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-CD4  
E DE CULTIVO CELULAR PROLONGADO.

**MARCELO DOS SANTOS TEIXEIRA**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



---

Dra. Denise Carneiro Lemaire  
Professora do PPGIm  
ICS - UFBA



---

Dra. Patricia Sampaio Tavares Veras  
Pesquisadora Adjunta  
CPqGM - FIOCRUZ



---

Dr. Lain Pontes de Carvalho  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ

"Quando um cientista velho e renomado afirma que alguma coisa é possível, ele está, quase sempre, correto; quando afirma que algo é impossível, está, muito provavelmente, errado."

*Arthur C. Clarke*

"Tristes tempos, em que é mais fácil desintegrar um átomo do que um preconceito."

*Albert Einstein*

## Agradecimentos

A José Mengel, que, para cuidar de um desconhecido, se afastou do seu caminho por um mês inteiro;

a Lívia, que, em dias difíceis, fez cafezinho para me manter acordado;

a Lia, que, a cada dia, varreu o chão e limpou nossa bagunça, com um eterno sorriso no rosto, pelo exemplo e pela ajuda;

a Rejane e Edinete, que, por um instante, partilharam comigo seus caminhos e seus sonhos;

a Washington, Geraldo e Freitas, por paciência e idéias;

a Paulo, Aninha, Manoel, Cláudia e Cláudia, por seu apoio e carinho constantes;

a Régis, que, entre outras coisas, me ajudou a rir de mim mesmo;

e a quantos outros contribuíram, com seu esforço e sua amizade, para que esta etapa se completasse; se os tentasse nomear a todos, tantos que são, certo me trairia a já frágil memória.

Que sejam os seus caminhos tão abundantes em bênçãos como tem sido o meu próprio.

## Sumário

<b>Resumo</b>	v
<b>Summary</b>	vi
<b>I) Introdução</b>	1
1.1 Breve histórico sobre tolerância imunológica	1
1.2 A indução de tolerância com anticorpos monoclonais	2
1.3 Características peculiares à tolerância imunológica induzida com anticorpos anti-CD4	4
1.4 Possíveis mecanismos de ação dos anticorpos anti-CD4 <i>in vivo</i>	6
1.5 Limitações ao uso clínico de anticorpos anti-CD4 para induzir tolerância imunológica	10
1.6 Proposição de possíveis alternativas para o tratamento	11
<b>II) Objetivos</b>	17
<b>III) Justificativa</b>	18
<b>IV) Material e Métodos</b>	19
<b>V) Resultados</b>	29
5.1 Produção e estimativa do grau de pureza da preparação de anti-CD4	29
5.2 Verificação da atividade tolerogênica do anticorpo anti-CD4	32
5.3 Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a proliferação de esplenócitos <i>in vitro</i> , em resposta a antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)	35
5.4 Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a resposta de esplenócitos a um estímulo superantigênico, <i>in vitro</i>	39
<b>VI) Discussão</b>	46
<b>VII) Conclusão</b>	56
<b>Referências Bibliográficas</b>	57
<b>Apêndice</b>	69
Tabulação dos resultados	69

## Resumo

OBTENÇÃO DE CÉLULAS COM PROPRIEDADES IMUNOMODULADORAS IN VITRO: AVALIAÇÃO PRELIMINAR DOS EFEITOS DE ANTICORPOS ANTI-CD4 E DE CULTIVO CELULAR PROLONGADO. **MARCELO DOS SANTOS TEIXEIRA.** A indução de tolerância por anticorpos anti-CD4 tem sido descrita em modelos animais *in vivo* e existem relatos de seu uso experimental em seres humanos. Métodos para obter resultados semelhantes com um tratamento *in vitro* poderiam evitar graves efeitos colaterais e viabilizar a sua aplicação a um número maior de pacientes. Contudo, efeitos modulatórios de anticorpos anti-CD4 sobre a resposta de células T *in vitro* ainda não foram descritos. Neste trabalho, ensaios de reação mista linfocitária foram usados para testar a resposta de células do baço de camundongos à estimulação por aloantígenos e por um superantígeno em presença do anticorpo monoclonal anti-CD4 YTS177.9. Em ambos os casos, o uso deste anticorpo reduziu a proliferação induzida pelo antígeno. Células de baço previamente cultivadas por dez dias na presença de antígeno, com e sem anti-CD4, foram capazes de inibir a proliferação de células idênticas não tratadas, em resposta ao mesmo antígeno. A adição de anti-CD4 ao cultivo exacerbou o efeito inibidor, de maneira dose-dependente. Estes efeitos não puderam ser verificados em um cultivo semelhante realizado por três dias, devido à intensa proliferação residual a este tempo. [CONCLUSÃO] Estes resultados indicam um efeito modulatório *in vitro* de anticorpos anti-CD4 sobre esplenócitos de camundongos e podem representar a primeira evidência de tolerância dominante induzida por anticorpos *in vitro*. [PALAVRAS-CHAVE] tolerância, anti-CD4, *in vitro*.

## Summary

ATTAINMENT OF CELLS BEARING *IN VITRO* IMMUNOMODULATORY PROPERTIES: PRELIMINARY OBSERVATIONS ON THE EFFECTS OF ANTI-CD4 ANTIBODIES AND LONG-TERM CELL CULTURE. **MARCELO DOS SANTOS TEIXEIRA**. The induction of tolerance by anti-CD4 antibodies has been described in animal models *in vivo* and there are reports of its experimental use in humans. Methods for obtaining similar results with an *in vitro* treatment could possibly avoid severe side effects and make its application achievable to a greater number of patients, however modulatory effects of anti-CD4 antibodies on T-cell responses *in vitro* have not yet been described. In this study, mixed lymphocyte reaction assays were used to assess the response of mouse spleen cells to stimulation by alloantigens and by a superantigen, in the presence of monoclonal anti-CD4 antibody YTS177.9. In both cases, use of this antibody reduced antigen-induced T-cell proliferation. Spleen cells previously cultivated for ten days in the presence of antigen, with and without anti-CD4, proved capable of inhibiting the proliferation of identical, untreated cells, in response to the same antigen. Adding anti-CD4 to the culture medium increased inhibition, in a dose-dependent manner. These effects could not be verified in a similar three-day culture, due to intense residual proliferation at this time. [CONCLUSION] These results indicate an *in vitro* modulatory effect of anti-CD4 antibodies over mouse spleen cells and may represent the first evidence of antibody-induced dominant tolerance *in vitro*. [KEY WORDS] tolerance, anti-CD4, *in vitro*.

## I) Introdução

### 1.1 Breve histórico sobre tolerância imunológica

Desde os primórdios da Imunologia, o Homem procura, mais do que compreender, controlar a resposta do organismo a um dado estímulo antigênico, estimulando, inibindo, modulando ou direcionando esta resposta para um efeito desejado. Doenças da autoimunidade, fenômenos de hipersensibilidade, rejeição de enxertos, muitos são os exemplos de desordens que têm ensejado a busca de mecanismos para abolir e/ou modificar respostas imunes potencialmente prejudiciais, sem, contudo, afetar de maneira inespecífica o sistema imunitário do paciente.

Ainda que o paradigma burnetiano, recentemente questionado <sup>(1,2)</sup>, não tenha sido proposto senão em 1957, já havia, muito antes disso, no apagar das luzes do século XIX, época em que Ehrlich estabeleceu o conceito de *horror autotoxicus* <sup>(1,3)</sup>, a noção da existência de mecanismos que inibem, ou impedem, respostas dirigidas contra antígenos intrínsecos ao organismo (próprios, ou *self*, no jargão imunológico corrente) <sup>(1-3)</sup>, sem, contudo, afetar a capacidade deste de reagir contra antígenos estranhos (*non-self*). Os mecanismos propriamente ditos, todavia, permaneceram velados ainda por várias décadas. Os primeiros esclarecimentos a respeito desse fenômeno surgiram a partir de 1938, com as experiências de Traub, logo seguidas

pelas clássicas observações de Owen em bezerros dizigóticos, e, nas décadas seguintes, com os experimentos de Medawar, Brent e outros, referências históricas, brevemente revistas por Roitt, Brostoff e Male <sup>(3)</sup>. Desde então, muito se tem pesquisado nesta área e diversos mecanismos foram propostos para explicar o fenômeno de ausência de resposta específica a um estímulo potencialmente imunogênico, a que hoje nos referimos como tolerância imunológica.

## **1.2 A indução de tolerância com anticorpos monoclonais**

Uma interessante abordagem para a aquisição de tolerância surgiu na década de 1980, quando Waldmann e outros pesquisadores demonstraram que a apresentação de antígenos em presença de concentrações adequadas de anticorpos monoclonais anti-CD4 é capaz de induzir tolerância imunológica, tanto em camundongos <sup>(4-8)</sup> quanto em seres humanos <sup>(9-13)</sup>. Este fenômeno, desde então, tem sido objeto de diversos estudos, particularmente no que diz respeito a rejeição de transplantes e a doenças da autoimunidade. Posteriormente, outras moléculas-alvo na superfície das células T também foram implicadas em respostas tolerogênicas semelhantes, induzidas por anticorpos monoclonais específicos, entre elas o CD8 <sup>(14,15)</sup>, o CD11a <sup>(16-18)</sup>, o CD40L <sup>(19,20)</sup>, o CTLA4 <sup>(20)</sup> e o CD25 <sup>(7)</sup>.

O fenômeno da deleção clonal chegou a ser aventado como mecanismo e, possivelmente, contribui para o desenvolvimento de tolerância em alguns modelos <sup>(7)</sup>. Contudo, mostra-se incapaz, por si só, de explicar uma série de fatos. Por exemplo, em diversos modelos, anticorpos anti-CD4 não-depletantes apresentam eficácia equivalente ou superior à dos depletantes na indução de tolerância específica <sup>(7-9)</sup> e as células T CD4<sup>+</sup> de um camundongo tornado tolerante por este tratamento podem transferir esta tolerância para animais isogênicos não tratados <sup>(21,22)</sup>. Mais ainda, a depleção das células T, particularmente das células T CD4<sup>+</sup>, do animal tratado abole a tolerância anteriormente obtida <sup>(23,24)</sup>. Isto sugere fortemente um papel regulador/supressor ativo das células CD4<sup>+</sup> antígeno-específicas oriundas do animal tratado, em oposição ao desenvolvimento de anergia clonal ou deleção clonal, como provável explicação.

Em condições adequadas, mesmo células T primadas (CD4<sup>+</sup> e/ou CD8<sup>+</sup>) podem ser inibidas por estas células supressoras <sup>(25-27)</sup>, o que deu origem ao termo "tolerância dominante". Em camundongos, até mesmo um processo de rejeição já iniciado pode ser interrompido pelo tratamento com anti-CD4 <sup>(26)</sup> e resultados semelhantes foram descritos com relação a lesões de origem autoimune <sup>(27)</sup>.

### 1.3 Características peculiares à tolerância imunológica induzida com anticorpos anti-CD4

Um outro fenômeno observado neste modelo é que células T normais, quando o antígeno lhes é apresentado na presença destas células reguladoras, não apenas se tornam tolerantes, mas, após algum tempo, passam a manifestar, elas próprias, o caráter supressor, adquirindo a capacidade de induzir a formação de novas células tolerantes e de transferir esta tolerância para um hospedeiro imunocompetente <sup>(22,23)</sup>. Isto pode ser facilmente demonstrado usando-se animais doador e receptor congênicos para diferentes alelos de um marcador de superfície de células T, por exemplo, Thy1. Neste caso, quando células de um animal Thy1-2 tratado são transferidas para um animal Thy1-1 não tratado, este se torna tolerante. Posteriormente, quando as células portadoras do antígeno Thy1-1 são purificadas do animal hospedeiro (por depleção com anticorpos anti Thy1-2) e transferidas para um terceiro animal, este também se torna tolerante. Este fenômeno, que ficou conhecido como tolerância infecciosa, permite a perpetuação do estado não reativo por tanto tempo quanto o contato com o antígeno seja mantido <sup>(7,8,22,23)</sup>. No caso específico de transplantes alogênicos, isto foi demonstrado através de sucessivas transferências de células T CD4<sup>+</sup> entre camundongos isogênicos, durante mais de nove gerações sucessivas, mantendo-se em todos eles o perfil

de tolerância, sem a necessidade de novas injeções de anticorpos anti-CD4 <sup>(22)</sup>.

Este caráter "infeccioso" não parece atuar de forma direcionada a antígenos específicos, mas sim em um contexto microambiental, afetando todas as células T que vierem a interagir com uma determinada célula apresentadora de antígenos (APC). Como consequência deste fato, podem-se observar fenômenos de supressão vinculada (*linked suppression*), ou seja, quando diversos antígenos são simultaneamente apresentados por uma mesma APC, incluindo-se aquele ao qual, originalmente, se desenvolveu tolerância dominante, a influência supressora das células T reguladoras impõe-se sobre quaisquer outros linfócitos T que venham a ser primados neste mesmo microambiente, independentemente de sua especificidade antigênica <sup>(7,28,29)</sup>. Mais ainda, as novas células T CD4<sup>+</sup>, primadas nessas condições, tornam-se também tolerantes e adquirem a capacidade tolerogênica, novamente de forma independente de sua especificidade antigênica <sup>(7,22)</sup>. Este fenômeno é conhecido como tolerância vinculada (*linked tolerance*) e traz importantes implicações para a imunologia dos transplantes, visto que o desenvolvimento de tolerância infecciosa aos antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (*Major Histocompatibility Complex - MHC*) poderia ser suficiente para induzir tolerância vinculada a todos os aloantígenos secundários (*minors*).

Uma evidência desta possibilidade é que camundongos CBA/Ca, previamente tornados tolerantes a enxertos de pele de B10.BR, quando simultaneamente desafiados com novos enxertos de pele de B10.BR e de CBK, lado a lado, aceitam o primeiro enxerto, enquanto rejeitam prontamente o segundo. Ainda assim, enxertos provenientes de animais heterozigotos para ambos os conjuntos de antígenos (F1 de cruzamentos entre B10.BR e CBK) são aceitos por metade dos animais receptores, os quais, posteriormente, passam a tolerar também enxertos oriundos de CBK <sup>(28)</sup>.

#### **1.4 Possíveis mecanismos de ação dos anticorpos anti-CD4 *in vivo***

O mecanismo de ação de anticorpos anti-CD4 na indução de tolerância *in vivo* não está, de todo, esclarecido.

Em nível molecular, sabe-se que este efeito é independente da fração Fc, uma vez que, de acordo com Waldmann e cols. <sup>(7,16)</sup>, fragmentos F(ab')<sub>2</sub> reproduzem fielmente o efeito da imunoglobulina completa. Foi sugerido que a formação de ligações cruzadas entre as moléculas CD4 pode ser a responsável pelo disparo (ou bloqueio) de uma via de sinalização intracelular <sup>(7,30)</sup> e que, neste particular, a interferência sobre a recepção de sinais acessórios provindos

de células apresentadoras profissionais pode ter papel preponderante na determinação do resultado <sup>(30)</sup>.

Chirmule e cols. indicam que a ligação do CD4, *in vitro*, pelo anticorpo YTS177 inibe a ativação (induzida pela via do complexo TCR + CD3) da cinase Erk2 (extracellular signal regulated kinase 2), mas não impede a ativação da JNK (c-Jun N-terminal kinase) mediada pelo CD28 <sup>(30)</sup>. Em conseqüência, tanto a secreção de IL-2 (*in vivo*) quanto a ativação dos promotores intracelulares NF-AT e AP-1 (*in vitro*), em resposta a um estímulo antigênico, são bastante comprometidas. O uso de um anticorpo monoclonal agonista para ativar concomitantemente o CD28 abole este efeito <sup>(30,31)</sup>, sugerindo que o papel do anti-CD4, neste modelo, poderia ser o de interromper a cascata de eventos iniciada com a ligação do TCR/CD3 pelo antígeno e que culmina com a ativação da célula T por um segundo sinal, disparado pela célula apresentadora e mediado pela interação entre B7 e CD28.

Também foi sugerido que anticorpos monoclonais anti-CD4 não-depletantes podem diferir em seu efeito tolerogênico, de acordo com sua capacidade de induzir uma modulação transitória na expressão da molécula CD4. Utilizando um esquema de baixas doses de dois anticorpos monoclonais anti-CD4, diferindo neste efeito modulador, Kathryn Wood e cols. <sup>(32)</sup> concluíram que o anticorpo KT6, que produziu apenas um bloqueio reversível do

CD4, teve um efeito mais pronunciado do que o anticorpo YTS177.9, que induziu acentuada redução na expressão desta molécula.

Em nível celular, o efeito do anti-CD4 sobre as células T parece diferir daquele classicamente chamado de anergia, em diversos aspectos; a ligação de anticorpos anti-CD28, por exemplo, falha em restaurar a atividade na anergia clássica, o que contrasta com os achados de Chirmule e cols. <sup>(30)</sup>, previamente mencionados, e os de Portolés e cols. <sup>(31)</sup>. Por outro lado, Waldmann sugere que células tolerizadas podem inibir passivamente outras células T normais, mediante competição pelo antígeno e pelos sinais acessórios das APC, à semelhança do que se observa com células anérgicas, e que este fenômeno, e não um presumível papel regulador/supressor ativo das células T tolerizadas, poderia ser o responsável pelo caráter dominante/infeccioso desta tolerância. Em suas próprias palavras (traduzidas para o português), "não há ainda evidência convincente de um papel supressor ativo, em oposição à inativação passiva dos demais linfócitos" <sup>(7)</sup>. Quanto a este aspecto, porém, muito pouco se pode afirmar, pois a falta de evidências é uma via de mão-dupla, servindo tanto para justificar a tese quanto a sua correspondente antítese.

Outros mecanismos possivelmente envolvidos na ação inibidora das células tolerizadas incluem a falha em secretar fatores de

crescimento em resposta ao antígeno (desamparo) e a alteração no padrão de resposta celular. O paradigma atualmente aceito na Imunologia classifica as respostas efetoras das células T CD4<sup>+</sup> em dois perfis principais, considerados, até certo ponto, antagônicos; estes perfis são denominados Th1 e Th2 <sup>(3,33)</sup>. Hipóteses foram levantadas por diversos autores, sugerindo que o principal mecanismo responsável pela atividade supressora das células tolerizadas poderia ser a mudança de um para outro perfil, notadamente do perfil Th1, mais lesivo, para o Th2. Todavia, tem-se demonstrado o efeito supressor do tratamento com anticorpos anti-CD4 tanto sobre respostas do tipo Th1 quanto do tipo Th2 <sup>(34)</sup>, o que fala contra esta suposição. Uma outra possibilidade é a mudança para um terceiro padrão, menos conhecido, citado na literatura como Th3 ou Tr1 <sup>(35-37)</sup>, associado à produção de citocinas com características presumivelmente inibidoras sobre as células Th1/Th2, dentre as quais o TGF- $\beta$  assumiria papel preponderante <sup>(38)</sup>.

Em nível sistêmico, o papel do anticorpo anti-CD4 pode ser o de inibir a resposta efetora das células T ao antígeno, por tempo suficiente para permitir a ativação de fenômenos naturais (leia-se, fisiológicos) de auto-regulação da resposta imune. Waldmann, elegantemente, sugere que esta resposta se compõe de dois vetores, um efetor e outro supressor, que se desenvolvem paralelamente <sup>(7)</sup> e que o anti-CD4 poderia bloquear

a porção efetora da resposta, dando tempo para o desenvolvimento do braço regulador, naturalmente mais lento.

### **1.5 Limitações ao uso clínico de anticorpos anti-CD4 para induzir tolerância imunológica**

O conjunto de fenômenos anteriormente mencionados, associados à indução de tolerância imunológica utilizando anticorpos anti-CD4, mais a possibilidade de obter resultados de longo prazo a partir de um único e curto ciclo de tratamento <sup>(7-9,22,23,27-29)</sup>, tornam esta abordagem particularmente atraente para o tratamento de doenças autoimunes e a profilaxia da rejeição de transplantes, situações que, hoje, exigem o uso de drogas imunossupressoras por longos períodos, provocando diversas conseqüências, tais como discrasias sanguíneas e infecções oportunistas.

Não obstante, um grande obstáculo à aplicação mais ampla deste método em seres humanos é a sua segurança. É fato sabido, por exemplo, que, no modelo murino, o período de imunossupressão inespecífica que acompanha a administração sistêmica de anticorpos anti-CD4 não depletantes prolonga-se por até quatro semanas <sup>(7,39)</sup>. É de presumir que isto se repita em seres humanos, ainda que não necessariamente o intervalo seja idêntico. Isto, mais a impossibilidade de restringir esta tolerância a um grupo seletivo de antígenos, dentre todos os

presentes no organismo em um dado momento, levantam a possibilidade da reagudização e/ou recidiva de doenças virais (por exemplo, herpes e hepatites), bacterianas (como a tuberculose e a hanseníase) e parasitárias (estrongiloidíase, leishmaniose e doença de Chagas são exemplos particularmente importantes em nosso meio), além do desenvolvimento de infecções oportunistas, propiciando quadros fulminantes, semelhantes aos que se observam em pacientes portadores da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS). Isto não seria, de todo, de se estranhar, visto que, em ambos os casos, encontram-se as células T CD4<sup>+</sup> comprometidas em relação às suas capacidades funcionais. Do mesmo modo, não existem evidências suficientes para excluir a possibilidade de que a imunossupressão temporária favoreça, em portadores sadios do vírus da imunodeficiência humana (HIV), a instalação prematura desta doença.

#### **1.6 Proposição de possíveis alternativas para o tratamento**

Impõe-se a necessidade de examinar possíveis alternativas que compreendam os benefícios da técnica sem, todavia, expor o paciente aos seus riscos. A idéia de recolher células T do sangue periférico de pacientes para submetê-las a tratamento tolerogênico extracorpóreo com anti-CD4, devolvendo-as posteriormente ao seu organismo, é tentadora, mas esbarra em diversas questões não respondidas. Supondo ser este método, de

algum modo, viável, qual seria a quantidade necessária de células a serem recolhidas e tratadas? Por quanto tempo e em que condições deveriam estas células ser tratadas? Qual seria a dose necessária de anti-CD4? Existe algum risco associado ao retorno destas células à circulação do paciente? De que forma se poderia aferir a eficácia do tratamento com anti-CD4, antes de devolver estas células ao seu doador?

Uma das formas teoricamente possíveis de conseguir este tratamento extracorpóreo é a introdução destas células em um hospedeiro temporário, descartável, imunocomprometido, preferivelmente isento de células T autólogas. Este hospedeiro poderia ser submetido ao tratamento com anti-CD4, em condições de mínima exposição a antígenos indesejados, e sacrificado ao final do período de imunodepressão, quando as células T seriam recuperadas e devolvidas ao seu organismo de origem. Uma outra forma é o cultivo destas células *in vitro*, em condições de exposição controlada ao antígeno e ao anti-CD4, pelo tempo necessário para conferir eficácia e segurança ao tratamento. Para ambos os modelos aqui sugeridos, aplicam-se aquelas mesmas questões, entre inúmeras outras.

O modelo experimental usando hospedeiros temporários apresenta uma série de vantagens no que diz respeito às dificuldades para a sua implantação: é relativamente barato, necessitando apenas do fornecimento regular de animais e da produção de

quantidades suficientes de anticorpo monoclonal; existem diversas linhagens disponíveis de camundongos naturalmente deficientes em células T, entre eles os camundongos *nude* e SCID (*severe combined immunological deficiency*); encontra-se abundante documentação na literatura sobre as doses adequadas de anti-CD4 e a cinética da resposta em camundongos normais; e a aquisição de tolerância pode ser verificada diretamente no animal hospedeiro, antes do retorno das células T ao seu doador. Por outro lado, os experimentos são quase sempre de longa duração (vários meses para cada um), o que os torna particularmente vulneráveis a problemas logísticos, enquanto a maioria dos ensaios *in vitro* podem ser realizados em uma ou duas semanas, salvo quando se faz necessária prévia imunização *in vivo*. Uma questão relevante, que ainda precisa ser verificada, é a possível necessidade da administração concomitante de quantidades suficientes de células apresentadoras de antígeno, nos casos em que o hospedeiro temporário não seja histocompatível com o doador das células T.

O modelo de tratamento *in vitro*, por outro lado, traz suas próprias dificuldades e motivos para considerações. A questão mais óbvia se refere à maneira de mensurar os efeitos deste tratamento. Entre os parâmetros que poderiam indicar uma eventual influência dos anticorpos anti-CD4 sobre o comportamento de uma preparação de linfócitos e células

apresentadoras, em resposta ao antígeno, estão a proliferação, evidenciada pela captação de timidina, e a secreção de diferentes citocinas, entre elas, o interferon-gama, o TGF-beta, a IL-4, a IL-10 e a IL-2. Os Drs. Herman Waldmann e Stephen Cobbold, entretanto, baseando-se em modelos de tolerância a aloenxertos de pele, afirmam que "células T de animais tolerizados são capazes de proliferar, gerar CTLs (*linfócitos T citotóxicos -nota do autor*) e secretar citocinas Th1, tornando difícil a correlação entre os achados *in vitro* e a tolerância *in vivo*" <sup>(7)</sup>.

Uma outra dificuldade esperada em ensaios *in vitro* utilizando células de animais não previamente primados por um determinado antígeno é a virtual ausência, no baço destes animais, de linfócitos T capazes de reagir contra fragmentos da molécula em questão, de forma a produzir um fenômeno detectável. Este obstáculo pode ser contornado pelo aumento do número de células T específicas para o antígeno, mediante a imunização prévia dos animais, contudo não se pode afastar a possibilidade de que a indução de tolerância em animais previamente imunizados seja mais difícil de ser obtida <sup>(7,8)</sup>. No entanto, receptores de células T capazes de ligar-se com baixa afinidade a moléculas pertencentes ao seu próprio MHC têm uma real possibilidade de reagir com alta afinidade a moléculas MHC estranhas (*non self*). Em decorrência do processo de seleção sofrido pelos timócitos durante sua maturação, estes

receptores estão representados em quantidades desproporcionalmente grandes no repertório imunológico dos modelos animais mais frequentemente estudados na Imunologia, assim como no de seres humanos, sugerindo ser o estudo da resposta a aloantígenos uma abordagem particularmente atraente para o modelo *in vitro*.

Uma outra maneira de contornar a limitação imposta pela escassez de linfócitos T com especificidade para um dado antígeno seria a utilização de moléculas capazes de ativar indistintamente diversos clones de células T. Estes superantígenos, termo pelo qual se tornaram conhecidos, interagem com determinadas regiões variáveis das cadeias peptídicas do receptor de células T (TCR), externamente às regiões hipervariáveis que constituem o sítio de reconhecimento antigênico, ativando, desta forma, uma diversidade de clones de linfócitos, cujos TCR contêm este domínio variável. Um destes superantígenos, de obtenção fácil e barata, é o antígeno viral MLS, incorporado ao genoma de camundongos DBA-2 e expresso na superfície externa da membrana plasmática de linfócitos B, que ativa de forma inespecífica linfócitos T portadores da região V- $\beta$ 6 em seus TCR <sup>(14,40)</sup>.

No presente trabalho, em que pese a maior complexidade do modelo, procuramos verificar a possibilidade de obter células com atividade imunomoduladora, mediante tratamento com

anticorpos anti-CD4 *in vitro*. A opção por esta abordagem, em detrimento de um modelo *in vivo*, que parece oferecer diversas vantagens, deveu-se, sobretudo, a incidentes que afetaram a colônia de criação de camundongos isogênicos do CPqGM e inviabilizaram, por algum tempo, o fornecimento regular de camundongos de várias linhagens, particularmente os frágeis camundongos *nude*, que ficaram indisponíveis por períodos que somam a quase um ano inteiro. Este modelo poderá ser retomado no futuro, quando esperamos contar também com a alternativa dos camundongos SCID.

## II) Objetivos

Estudar os efeitos *in vitro* de um anticorpo monoclonal anti-CD4.

Verificar a possibilidade de obtenção de células com propriedades imunomoduladoras, mediante tratamento *in vitro*.

### III) Justificativa

Os dados encontrados na literatura, referentes à indução de tolerância com anti-CD4 *in anima vile*, resumem-se, em sua quase totalidade, a experimentos *in vivo*. Os poucos dados disponíveis *in vitro* são, aparentemente, conflitantes entre si (7, 41-46) e referem-se, de qualquer modo, à observação *in vitro* de células obtidas de animais submetidos, originalmente, a tratamento *in vivo*. O desenvolvimento, portanto, de um modelo de tratamento exclusivamente *in vitro* esbarra em dificuldades adicionais devidas à completa ausência de referências bibliográficas a este respeito.

Justifica-se o presente estudo como um primeiro passo na direção de um modelo com essas características, buscando fornecer as primeiras evidências de que anticorpos anti-CD4 apresentam atividade moduladora *in vitro*. Estudos posteriores poderão determinar se os efeitos observados nas células tratadas *in vitro* se correlacionam com a capacidade de induzir tolerância dominante *in vivo*.

#### **IV) Material e Métodos**

##### **Animais**

Camundongos das linhagens BALB/c, DBA-2, CBA e C57BL/6 foram criados e fornecidos pelo biotério do CPqGM, onde foram mantidos até a data de seu sacrifício. Camundongos duplamente portadores do alelo recessivo *nude*, com a restante herança genética de BALB/c (BALB/c<sup>nu/nu</sup>), foram manuseados em condições assépticas, com o auxílio de microisoladores e capelas de fluxo laminar. Todos os animais foram alimentados com ração padronizada, utilizada no biotério do CPqGM, e receberam água limpa *ad libitum*. Animais naturalmente imunodeficientes ou submetidos a irradiação corporal total em bomba emissora de raios gama receberam também antibióticos adicionados à água. Foram usados, alternativamente, cloranfenicol, sulfametoxazol, trimetoprima e tetraciclina, de acordo com a disponibilidade destas drogas no biotério. Sempre que indicado, previamente à manipulação, os camundongos foram anestesiados por inalação de éter, em câmara especialmente projetada para este fim.

##### **Cultivo de células de hibridoma**

O hibridoma YTS177.9 produz um anticorpo monoclonal anti-CD4 não depletante, cujos efeitos em uma diversidade de modelos experimentais murinos de tolerogênese estão amplamente

documentados na literatura. Alíquotas deste hibridoma foram previamente fornecidas pela Dra. Anne Cooke e estocadas em nitrogênio líquido no Laboratório de Imunologia Molecular e Celular do CPqGM (LIMC). Uma alíquota foi descongelada e cultivada em garrafas próprias para cultivo celular (Costar, Cambridge, EUA) em meio RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, EUA), suplementado com 2 mM de glutamina, 1 mM de piruvato e 10% de soro bovino fetal ou soro de bezerro (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, EUA). As garrafas foram mantidas em estufa a 37°C, em atmosfera com 5% de CO<sub>2</sub>. A colheita das células, ao atingirem confluência, foi realizada por raspagem com o auxílio de lâmina plástica (*cell scraper*). Gentamicina, na concentração de 50 a 100 mg/l, foi utilizada para prevenir contaminação bacteriana. As células colhidas foram centrifugadas a 500 g, por 10 minutos, a 4°C, e amostras do sobrenadante foram guardadas para posterior análise.

#### **Ensaio imunoenzimático (ELISA) para detecção de IgG de rato**

Placas de poliestireno de 96 poços foram sensibilizadas por 16 horas, a 4° C, com 50 µl de anticorpo anti-IgG de rato (American Qualex, A103US, goat anti-rat IgG H & L), diluído a 1:2000 em salina tamponada com fosfato, 0,15 M (PBS), em pH 8,5, com 0,05% de azida sódica. O bloqueio foi realizado com leite em pó desnatado, dissolvido na concentração de 5% p/v em

PBS, em pH 7,2, por duas horas, à temperatura ambiente. Tween 20 foi usado nas lavagens, também diluído em PBS, na concentração de 0,05%. Foram usados 100  $\mu$ l de um anticorpo anti-IgG de rato conjugado com peroxidase (A-9037 Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), diluído a 1:1000 em PBS com 5% p/v de leite desnatado e 0,05% de Tween 20. O cromógeno usado foi orto-fenilenodiamina (OPD), 5 mg dissolvidos em 10 ml de uma solução de fosfato de sódio a 0,1 M e ácido cítrico a 0,05 M, à qual se adicionou peróxido de hidrogênio 0,1% v/v. A reação foi interrompida com 50  $\mu$ l de ácido sulfúrico a 4 M, após tempo suficiente para o surgimento de cor nítida. A leitura da densidade óptica (DO) foi feita em fotocolorímetro, com filtro de 490 nm. Foram testadas amostras do meio de cultura condicionado, puro e diluído a 1:10, juntamente com IgG de rato, nas concentrações de 0,2, 0,4 e 0,8  $\mu$ g/ml, e meio de cultura novo como branco.

#### **Produção de ascite para obtenção de anticorpos monoclonais**

O hibridoma YTS177.9 é uma linhagem tumoral desenvolvida a partir de células de rato, produtora de um anticorpo monoclonal do tipo IgG2a, que reage com a molécula CD4 de linfócitos de camundongos, sem depletá-los. Devido à sua origem xenogênica, é prontamente rejeitado por camundongos imunocompetentes, motivo que nos levou a optar por camundongos naturalmente atímicos (BALB/c<sup>nu/nu</sup>) ou, alternativamente,

tornados imunodeficientes por irradiação gama subletal (450 rads), como hospedeiros das células tumorais. Cada animal recebeu entre  $5 \times 10^5$  e  $5 \times 10^6$  células do hibridoma, suspensas em 0,5 ml de salina, administradas por via intraperitonal. Em alguns casos, foi realizada sensibilização prévia da cavidade peritonal com óleo mineral (Nujol, Schering-Plough, Rio de Janeiro, Brasil) ou Pristane (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), uma semana antes da inoculação. O líquido ascítico foi recolhido por aspiração com seringa, quando os animais se apresentavam com o abdome visivelmente dilatado.

#### **Purificação dos anticorpos monoclonais anti-CD4**

Após centrifugação para remoção de células e agregados protéicos, bem como de vestígios do óleo mineral, o líquido ascítico foi purificado por precipitação em sulfato de amônio (SA) a 40% de saturação, que corresponde, aproximadamente, a 1,6 M. Resumidamente, uma solução saturada de SA foi lentamente adicionada ao líquido ascítico, sob agitação constante, na proporção de dois para três, processo durante o qual várias proteínas deixam a fase aquosa e o líquido torna-se turvo. Após adicionar cerca de metade do volume total de SA, o equivalente a uma concentração de 25% da saturação, ou cerca de 1 M, o líquido foi centrifugado a 3000 g, por 10 minutos, e o precipitado, rico em fibrina e agregados protéicos, descartado. Após a adição do volume restante de SA,

o líquido foi deixado sob agitação por 40 a 60 minutos, centrifugado a 3000 g por 15 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi suspenso em solução de SA a 40% de saturação, para lavagem e separação de agregados solúveis, e novamente centrifugado. O novo precipitado foi dissolvido em PBS com 0,05% de azida sódica e dialisado em seguida contra salina ou PBS, para remoção dos vestígios de SA. A estimativa da concentração de proteínas nas amostras obtidas foi realizada pela verificação da densidade óptica a 280 nm (indicativa da concentração total de proteínas) e a 330 nm (correspondente à presença de agregados). Para estudos *in vitro*, algumas das amostras foram ainda ultracentrifugadas a 100.000 g, por 20 minutos, para eliminação de agregados protéicos, sendo que somente os 2/3 superiores do sobrenadante em cada tubo foram utilizados.

#### **Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Amostras do líquido ascítico purificado foram fervidas por três minutos em uma solução de dodecil-sulfato de sódio (SDS) a 2,5% e azul de bromofenol a 0,01%, em tampão Tris/HCl a 10 mM (pH 8,0), contendo 1 mM de ácido etileno-diamino-tetraacético (EDTA), com e sem a adição de 5% de 2-mercaptoetanol, e submetidas a eletroforese em um gel de poliacrilamida a 12% (PhastGel, Pharmacia Biotech, New Jersey, EUA), conforme instruções do fabricante. A coloração foi feita com uma

solução aquosa de Coomassie blue a 0,02%, com 30% de metanol, 10% de ácido acético e 0,1% de sulfato de cobre, a 50° C, por 8 minutos. Foram usados como controles soroalbumina bovina e um padrão com múltiplas proteínas de pesos moleculares conhecidos (14, 29, 36, 45, 66, 116 e 205 kDa).

### **Imunoglobulina controle**

Amostras de IgG2a de rato, com especificidade irrelevante, preparadas da forma descrita acima, foram fornecidas pelo Dr. Geraldo Gileno S. Oliveira. Estas imunoglobulinas foram utilizadas como isotipo controle dos anticorpos anti-CD4 em diversos experimentos *in vitro*.

### **Avaliação da atividade tolerogênica do anticorpo anti-CD4**

Com o fim de verificar a atividade biológica da preparação de anticorpos obtida a partir de líquido ascítico, camundongos BALB/c, entre 8 e 12 semanas de idade, receberam 1 mg de HGG (IgG humana purificada de soro, Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), agregada por incubação a 63°C por 25 minutos, na concentração de 5 mg/ml, intraperitonalmente, no segundo dia de um curso de tratamento de três dias com anti-CD4. Foram aplicadas, no total, três doses de 1 mg de anti-CD4 por animal, uma em cada dia, sendo a primeira dose intravenosa, aplicada no plexo retro-ocular, e as duas restantes

intraperitoniais. Camundongos controles foram tratados com anti-CD4 na ausência do estímulo antigênico, ou então somente com salina. Após cinco semanas, todos os animais foram desafiados com 0,3 mg de HGG agregada, por via intraperitoneal. A resposta humoral específica contra HGG foi avaliada duas semanas após o desafio, por meio de um ensaio imunoenzimático (ELISA), semelhante ao anteriormente descrito. As placas foram sensibilizadas com IgG humana, na concentração de 10 mg/l, em PBS (pH 8,5), por 16 horas, a 4°C. Os soros dos camundongos tratados e dos controles foram testados nas diluições de 1/50, 1/200, 1/800, 1/3200, 1/12800 e 1/51200, usando anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase e OPD como cromógeno. A leitura da densidade óptica (DO) foi realizada em fotolorímetro, com filtro de 490 nm.

### **Meios para cultura de esplenócitos**

Foi utilizado, nos experimentos *in vitro*, o meio RPMI 1640 (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, EUA), suplementado com 2-mercaptoetanol a  $10^{-5}$  M, glutamina a 2mM, piruvato a 1mM, HEPES a 5 mM e soro fetal bovino (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, EUA) a 10%. Para a lavagem de células, foram utilizados, alternativamente, RPMI 1640, sem suplementação, e/ou solução salina tamponada de Hanks (HBSS), sem íons cálcio e magnésio (Gibco BRL Life Technologies, Grand Island, EUA).

### **Ensaio de Reação Mista Linfocitária (MLR)**

O estudo da resposta proliferativa a aloantígenos foi realizado com a técnica de reação mista linfocitária.  $5 \times 10^5$  células esplênicas da linhagem respondedora (BALB/c ou CBA) foram cultivadas em presença de  $3 \times 10^5$  células esplênicas da linhagem estimuladora (CBA ou BALB/c), previamente submetidas a irradiação com 3800 rads em bomba emissora de raios gama. As culturas foram mantidas por 48 horas em estufa a  $37^\circ\text{C}$ , em atmosfera contendo 5% de  $\text{CO}_2$ , previamente à adição de 20  $\mu\text{l}$  de timidina marcada com o isótopo  $^3\text{H}$  (timidina tritiada), correspondendo a uma atividade de  $10^{-6}$  Ci, após o que foram devolvidas à estufa por mais 18 horas. A incorporação de timidina foi analisada em um contador beta, utilizando membranas secas.

### **Ensaio de linfoproliferação com superantígeno**

Para estes experimentos, utilizamos uma técnica de reação mista linfocitária, semelhante àquela previamente descrita, usando como doadores de células respondedoras camundongos BALB/c ( $\text{H-2}^{\text{d}}$ ) e como doadores de células estimuladoras camundongos DBA-2 (igualmente  $\text{H-2}^{\text{d}}$ ). Neste caso, como os complexos MHC são idênticos, a diferença entre as linhagens reside em antígenos secundários (*minors*) e, principalmente, em um superantígeno de origem viral, dito MLS, expresso na

superfície de células B. Este antígeno tem a propriedade de ativar as células T cujos receptores de antígeno contêm a região V $\beta$ 6<sup>(7,8,14,40)</sup>. Nos ensaios de proliferação com este modelo, foram usadas, em cada poço (200  $\mu$ l), 250.000 células respondedoras (esplenócitos de BALB/c, com 3 a 4 semanas de idade) e 500.000 células estimuladoras (esplenócitos de DBA-2, previamente irradiados com 1000 rads ou 3000 rads, salvo indicação em contrário, para inibir sua proliferação). As culturas foram mantidas em estufa a 37°C, com 5% de CO<sub>2</sub>, por 48 ou 72 horas, previamente à adição de 20  $\mu$ l de timidina marcada com o isótopo <sup>3</sup>H (timidina tritiada), correspondendo a uma atividade de 10<sup>-6</sup> Ci, após o que foram deixadas em cultura por mais 18 horas. A incorporação de timidina foi analisada em um contador beta, utilizando membranas secas.

#### **Ensaio de ativação linfocitária *in vitro* com superantígeno**

De forma semelhante aos ensaios de linfoproliferação descritos acima, foram cultivadas células do baço de BALB/c e de DBA-2, na proporção de 1 para 2, porém em maiores quantidades, usando placas de 24 poços. Os esplenócitos de DBA-2 foram enriquecidos para células B, utilizando-se microesferas magnéticas recobertas com anticorpos anti-Thy1 para remover da suspensão a maior parte das células T. Desta forma, reduzimos uma possível proliferação das células T do DBA-2, sem, todavia, interferir com a viabilidade das células B, o que

poderia prejudicar seu poder antigênico. Estas células, portanto, ao contrário das usadas nos ensaios de proliferação, não foram previamente irradiadas. Em cada poço, foram cultivados  $2,5 \times 10^6$  esplenócitos de BALB/c e  $5 \times 10^6$  esplenócitos de DBA-2, enriquecidos da forma descrita, em um volume total de 1 ml, por 3 dias. Ao final deste tempo, as culturas foram encerradas, com a colheita das células presentes (blastos), ou receberam mais 1 ml de meio de cultura novo. Neste último caso, os blastos foram recolhidos no sétimo dia, lavados e transferidos para uma nova cultura, com  $5 \times 10^6$  esplenócitos frescos de DBA-2, enriquecidos da forma acima descrita, por mais três dias, sendo a cultura definitivamente encerrada aos 10 dias. Após o encerramento de cada cultura, os blastos foram lavados duas vezes, por centrifugação a  $4^\circ\text{C}$ , a 400 g por 15 minutos, contados em câmara de Neubauer e ressuspensos em meio de cultura, previamente à sua utilização em ensaios de linfoproliferação.

## V) Resultados

### 5.1 Produção e estimativa do grau de pureza da preparação de anti-CD4

Um ensaio imunoenzimático, utilizando anti-IgG de rato como anticorpo de captura, foi conduzido para confirmar a produção de IgG pelo hibridoma YTS177.9, antes de partirmos para a indução de ascite em camundongos. Todas as concentrações testadas como padrão (0,2, 0,4 e 0,8 mg/l) mostraram-se capazes de saturar o teste, motivo por que não se observa correlação linear entre concentração e densidade óptica. Pode-se comprovar a presença de IgG de rato no sobrenadante de cultura, puro ou diluído a 1:10, igualmente em concentrações saturantes (Fig. 1).

Uma fração rica em imunoglobulina, semipurificada a partir de líquido ascítico por precipitação em sulfato de amônio, foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida para estimar a pureza e a presença de ambas as cadeias leve e pesada (Fig. 2). O gel preparado com uma amostra não submetida a tratamento redutor mostra a presença de uma banda com peso molecular aparente de 150 kDa. Um gel idêntico, usando uma amostra previamente fervida com 2-mercaptoetanol, evidencia duas bandas, com pesos moleculares aparentes de 25 e 50 kDa. Estes dados são compatíveis com a presença de imunoglobulina G, com

ambas as cadeias presentes, com um grau satisfatório de pureza.

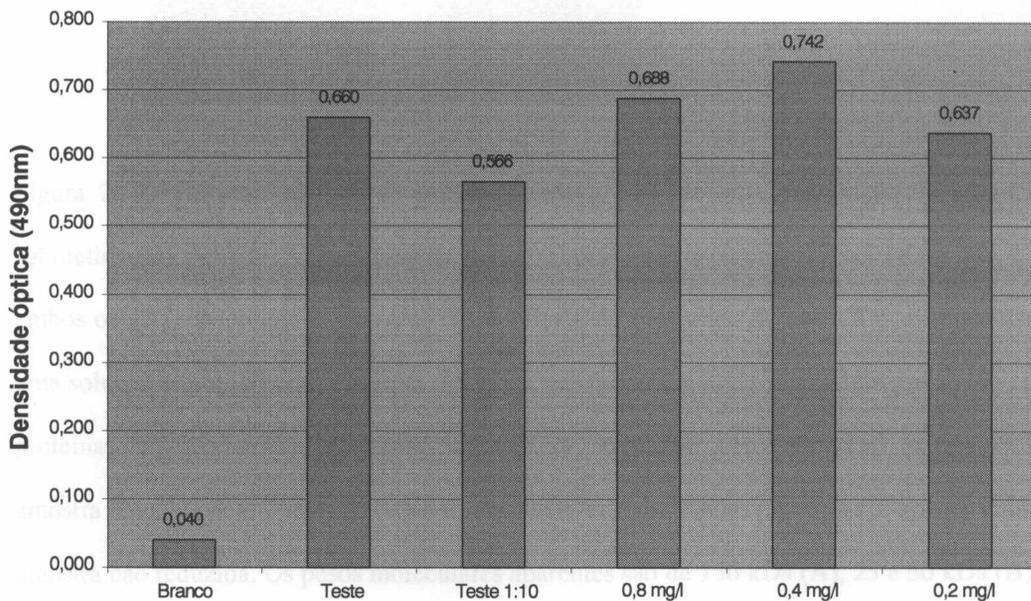


Figura 1: Detecção de IgG de rato no sobrenadante de cultura de YTS177.9. Os rótulos de cada coluna representam a média de resultados obtidos em um teste de ELISA, com duplicatas de um sobrenadante de cultivo de hibridoma, puro (Teste) ou diluído a 1:10 (Teste 1:10). Três concentrações de IgG de rato foram usadas como padrão (0,2, 0,4 e 0,8 mg/l). Foi usado anticorpo revelador anti-IgG de rato, conjugado com peroxidase, e OPD como cromógeno.

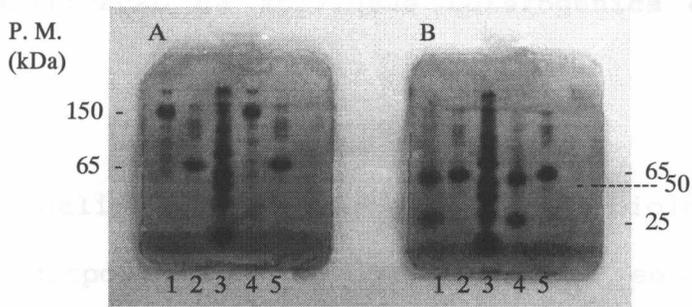
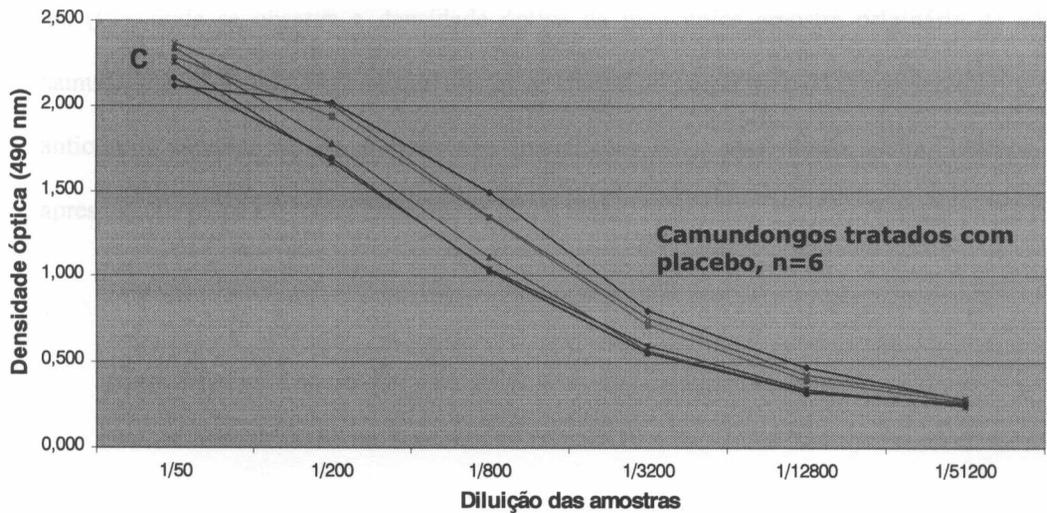
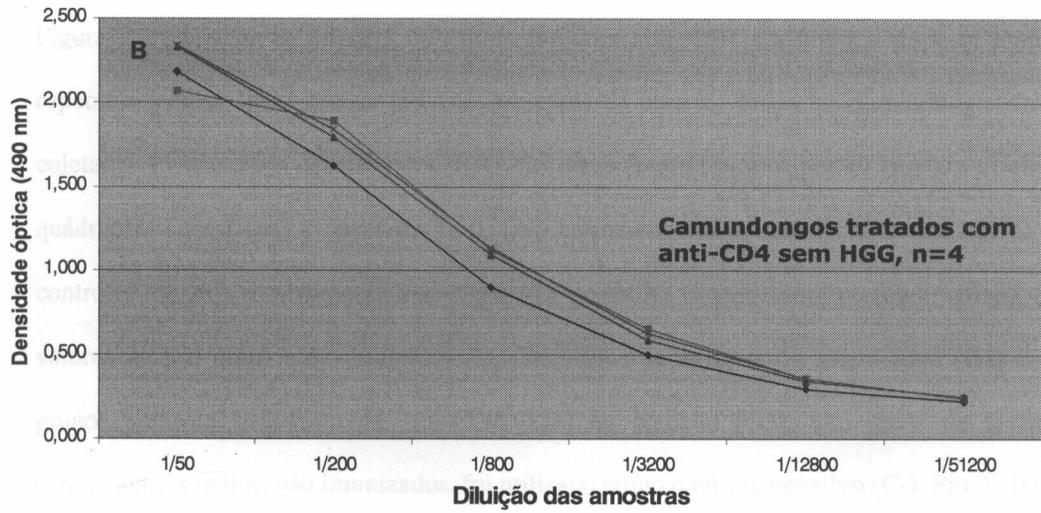
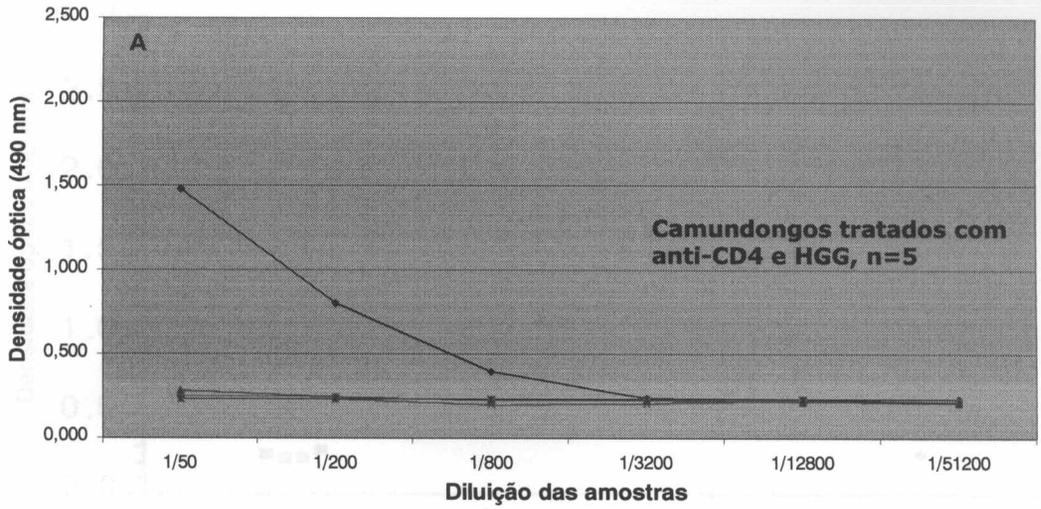


Figura 2: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 12% de uma preparação de anti-CD4, submetida (B) ou não (A) a tratamento redutor com 2-mercaptoetanol. Nas faixas 1 e 4 de ambos os géis, observam-se amostras em duplicata do preparado de anti-CD4, comparadas a uma solução de soroalbumina bovina (65 kDa), nas faixas 2 e 5, e a um padrão preparado com proteínas de pesos moleculares conhecidos (14, 29, 36, 45, 66, 116 e 205 kDa), na faixa 3. Na amostra reduzida pelo 2-mercaptoetanol, observam-se duas bandas principais, e apenas uma na amostra não reduzida. Os pesos moleculares aparentes são de 150 kDa (A), 25 e 50 kDa (B).

## 5.2 Verificação da atividade tolerogênica do anticorpo anti-CD4

Com a finalidade de testar a atividade biológica da preparação de anticorpos, avaliamos sua eficácia em induzir tolerância imunológica, em camundongos, a IgG humana (HGG), reproduzindo experimentos anteriormente realizados em nosso próprio laboratório, com resultados comparáveis aos descritos na literatura <sup>(4,7,8,16)</sup>. Cinco camundongos receberam, cada um, uma injeção intraperitoneal de HGG agregada pelo calor, juntamente com três doses de anti-CD4. Quatro animais controles receberam somente as três doses de anti-CD4, e outros seis foram tratados com injeções de salina. Após 35 dias, todos os quinze animais foram desafiados com novas doses de HGG e amostras de soro foram obtidas para dosagem de anticorpos específicos. Um pool de soros de camundongos não imunizados foi utilizado como controle negativo. Os resultados podem ser vistos na figura 3.



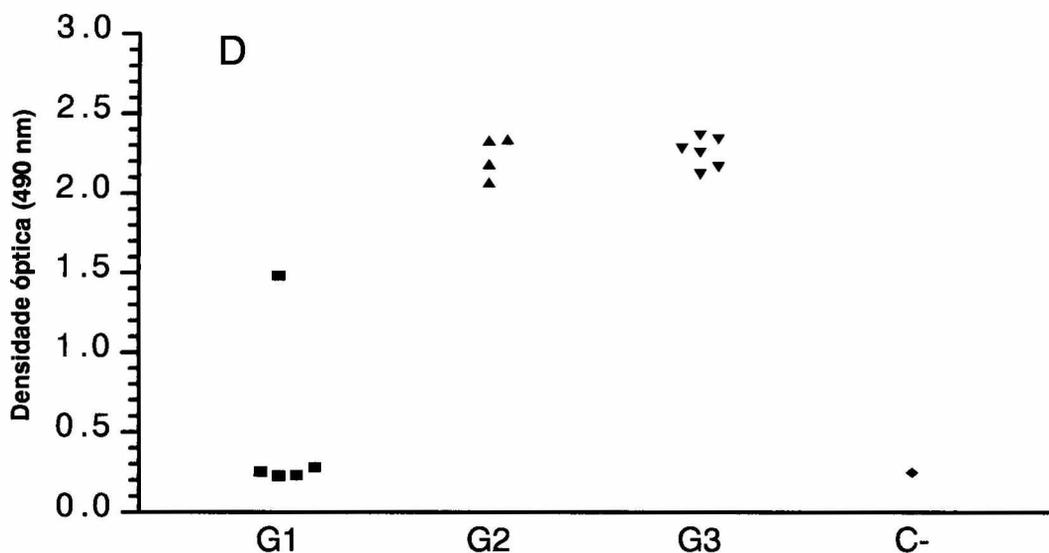


Figura 3: Avaliação da eficácia do tratamento com anti-CD4 em inibir a resposta humoral específica contra IgG humana (HGG). Amostras de soro de todos os camundongos foram coletadas 15 dias após desafio com HGG. Os soros foram testados por ELISA em diluições quádruplas sucessivas, a partir de 1/50. (A), animais tratados com HGG e anti-CD4. (B), controles tratados somente com anti-CD4. (C), controles tratados com placebo (salina). (D), valores de DO obtidos na diluição 1:50, com soros de animais do grupo teste (G1) e dos grupos controle tratados com anti-CD4 (G2) ou placebo (G3). Um *pool* de soros de camundongos sadios, não imunizados, foi utilizado como controle negativo (C-). Em A, B e C, cada curva corresponde a um animal. Em D, cada símbolo corresponde a um animal, exceto em (C-), onde se observa a densidade óptica de uma única amostra originária de vários camundongos normais. Note-se que um único animal do grupo teste (G1) apresentou título de anticorpos superior ao de animais não imunizados (C-), mas, ainda assim, inferior aos apresentados pelos controles imunizados (G2 e G3).

### 5.3 Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a proliferação de esplenócitos *in vitro*, em resposta a antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC)

Células do baço de camundongos BALB/c (H-2<sup>d</sup>) cultivadas na presença de esplenócitos de CBA (H-2<sup>k</sup>), previamente irradiados (3800 rads), mostraram redução de sua proliferação em presença de anti-CD4 (Fig. 4). Este fenômeno foi igualmente observado quando, de maneira inversa, células de CBA foram estimuladas com esplenócitos irradiados de BALB/c (Fig. 5).

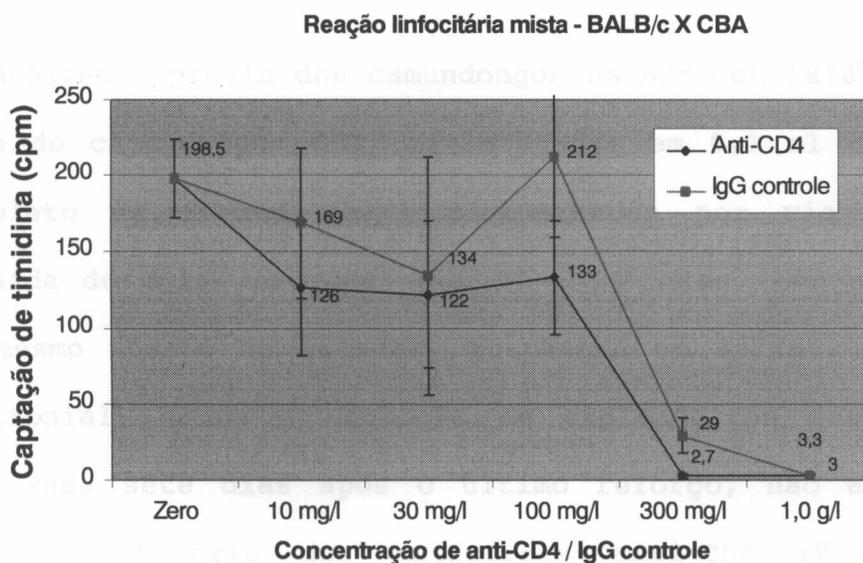


Figura 4: Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a proliferação *in vitro* de células de baço de camundongos BALB/c em resposta a aloantígenos de CBA. Cada ponto representa a média de valores obtidos em triplicatas, com um *pool* de células de cinco camundongos normais.

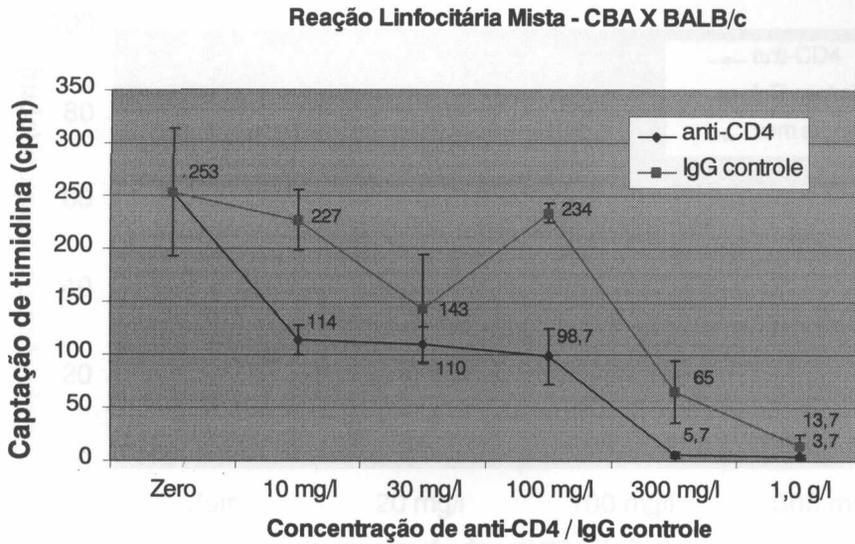


Figura 5: Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a proliferação *in vitro* de células de baço de camundongos CBA em resposta a aloantígenos de BALB/c. Cada ponto representa a média de valores obtidos em triplicatas, com um *pool* de células de cinco camundongos normais.

A imunização prévia dos camundongos BALB/c com  $5 \times 10^6$  células de baço de camundongos CBA, emulsionadas em 0,1 ml de adjuvante completo de Freund (ACF) e aplicadas por via subcutânea, seguida de dois reforços, aos 7<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dias, com a inoculação do mesmo número de células, suspensas em salina, na cavidade peritoneal, sendo a obtenção de esplenócitos destes animais realizada sete dias após o último reforço, não alterou esse efeito inibitório dos anticorpos anti-CD4 (Fig. 6). Não obstante, quando os reforços intraperitoneais foram substituídos por doses idênticas de células emulsionadas em ACF, administradas por via subcutânea, observou-se uma proliferação residual intensa e, ao menos em parte, inespecífica, que não foi atenuada pelo anti-CD4 nas concentrações testadas (Fig. 7).

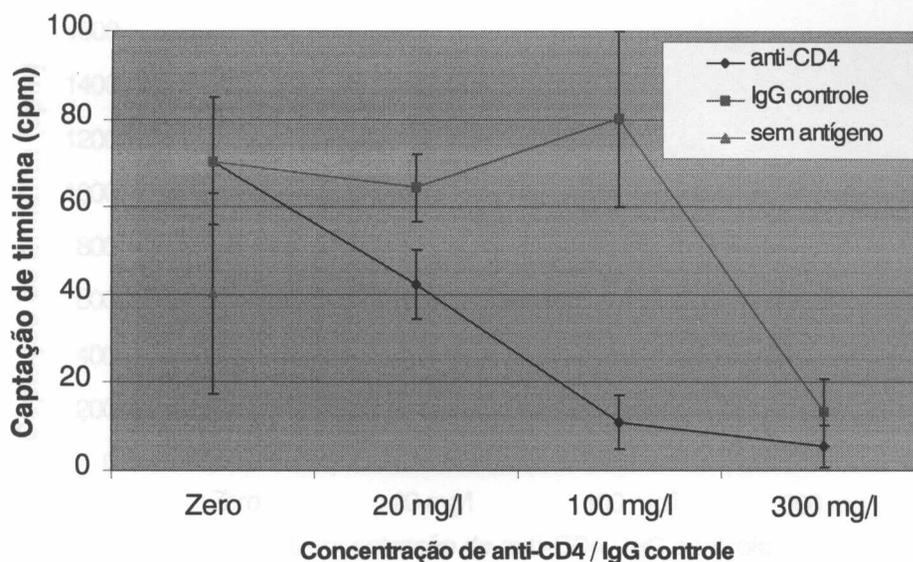


Figura 6: Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a proliferação de células de baço de camundongos BALB/c previamente imunizados com aloantígenos de CBA, em resposta a um desafio *in vitro* com o mesmo antígeno. Os camundongos foram imunizados por via subcutânea com  $5 \times 10^6$  células de baço de CBA, emulsionadas em 0,1 ml de ACF, e receberam reforços nos dias 7 e 14, com o mesmo número de células suspensas em salina, aplicadas por via intraperitoneal. Cada ponto representa a média dos valores obtidos com células de dois camundongos diferentes, em experimentos realizados em triplicata.

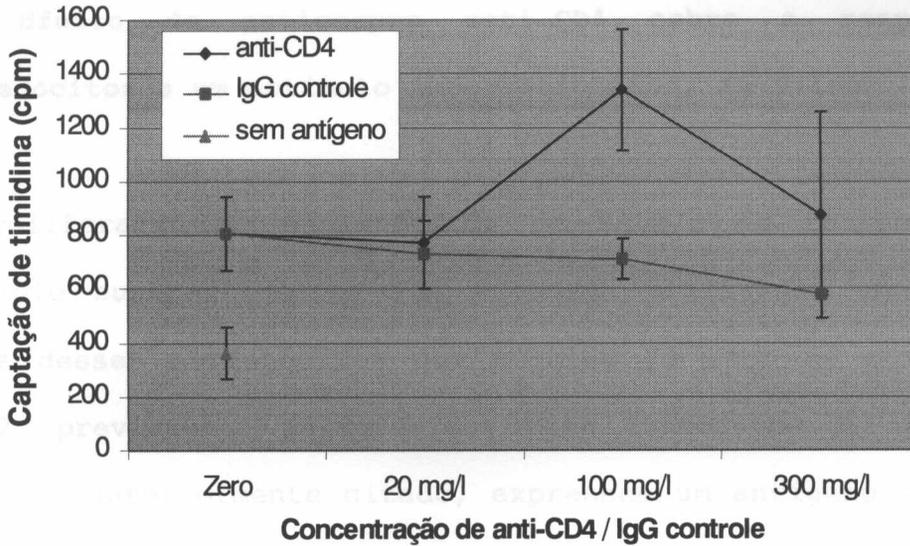


Figura 7: Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a proliferação de células de baço de camundongos BALB/c previamente imunizados com aloantígenos de CBA, em resposta a um desafio *in vitro* com o mesmo antígeno. Os camundongos foram imunizados por via subcutânea, com  $5 \times 10^6$  células de baço de CBA, emulsionadas em 0,1 ml de ACF, num total de três doses, aos dias 0, 7 e 14. Cada ponto representa a média dos valores obtidos com células de dois camundongos diferentes, em experimentos realizados em triplicata.

#### 5.4 Efeito de anticorpos anti-CD4 sobre a resposta de esplenócitos a um estímulo superantigênico, *in vitro*

A proliferação de esplenócitos de BALB/c em resposta a um estímulo superantigênico foi estudada utilizando uma cultura mista desses esplenócitos com células do baço de camundongos DBA-2, previamente enriquecidos para linfócitos B, os quais, conforme anteriormente citado, expressam um antígeno de origem viral (MLS), capaz de ativar células T  $V\beta 6^+$  de maneira inespecífica. Todas as culturas foram realizadas em duas etapas sucessivas. Em uma primeira fase (sensibilização), a cultura mista descrita acima foi mantida por três dias, na presença de diferentes concentrações do anticorpo monoclonal YTS177.9. Ao final deste tempo, as células não aderentes (blastos) foram colhidas por aspiração, lavadas e adicionadas, em seguida, a uma cultura mista primária, com células estimuladoras (antígeno) e esplenócitos frescos. A adição de diferentes quantidades de blastos aumentou em até 80 vezes a incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina pela cultura mista (Fig. 8). Este efeito foi atenuado, de maneira dose-dependente, pelo acréscimo de anti-CD4 ao meio de cultura durante a fase de sensibilização (Fig. 9), não tendo sido possível, no entanto, verificar qualquer efeito inibitório em relação aos níveis basais de proliferação.

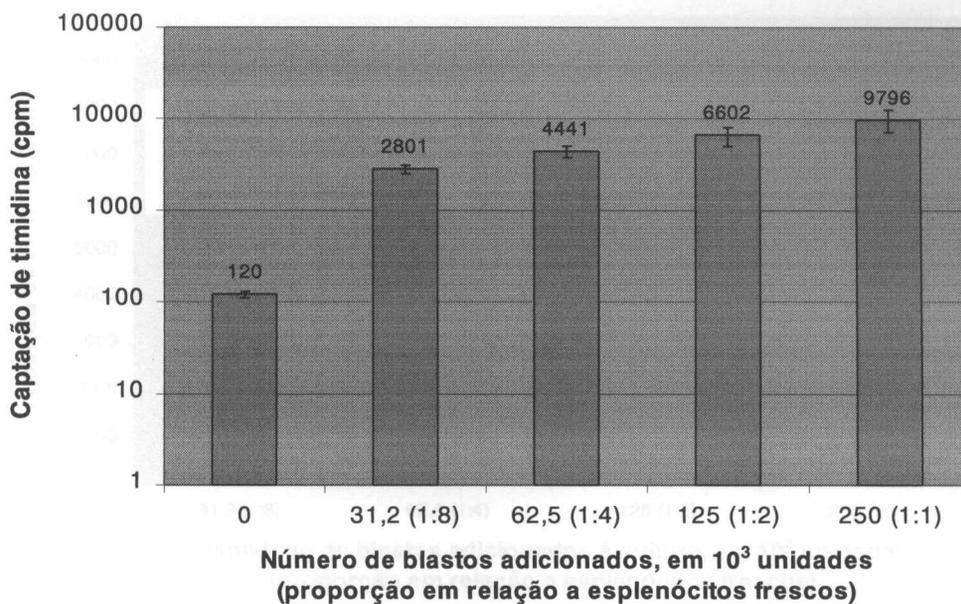


Figura 8: Efeito da adição de blastos de três dias sobre a incorporação de timidina em uma cultura mista. Células de baço pré-sensibilizadas por três dias (blastos) foram adicionadas, em diferentes quantidades, a uma cultura mista linfocitária. O conjunto foi incubado por 72 horas antes da adição de  $^3\text{H}$ -timidina. A coluna mais à esquerda (0) indica a proliferação basal da cultura à qual não se adicionaram blastos. O aumento na incorporação de timidina guardou relação direta com a proporção de blastos adicionados à cultura, chegando a 81,6 vezes o valor basal, para idênticas quantidades de blastos e esplenócitos frescos. Os rótulos e barras de erro associados a cada coluna representam a média e o desvio-padrão de valores obtidos em triplicatas, com um *pool* de células de camundongos normais. Note-se, neste gráfico, o uso da escala logarítmica.

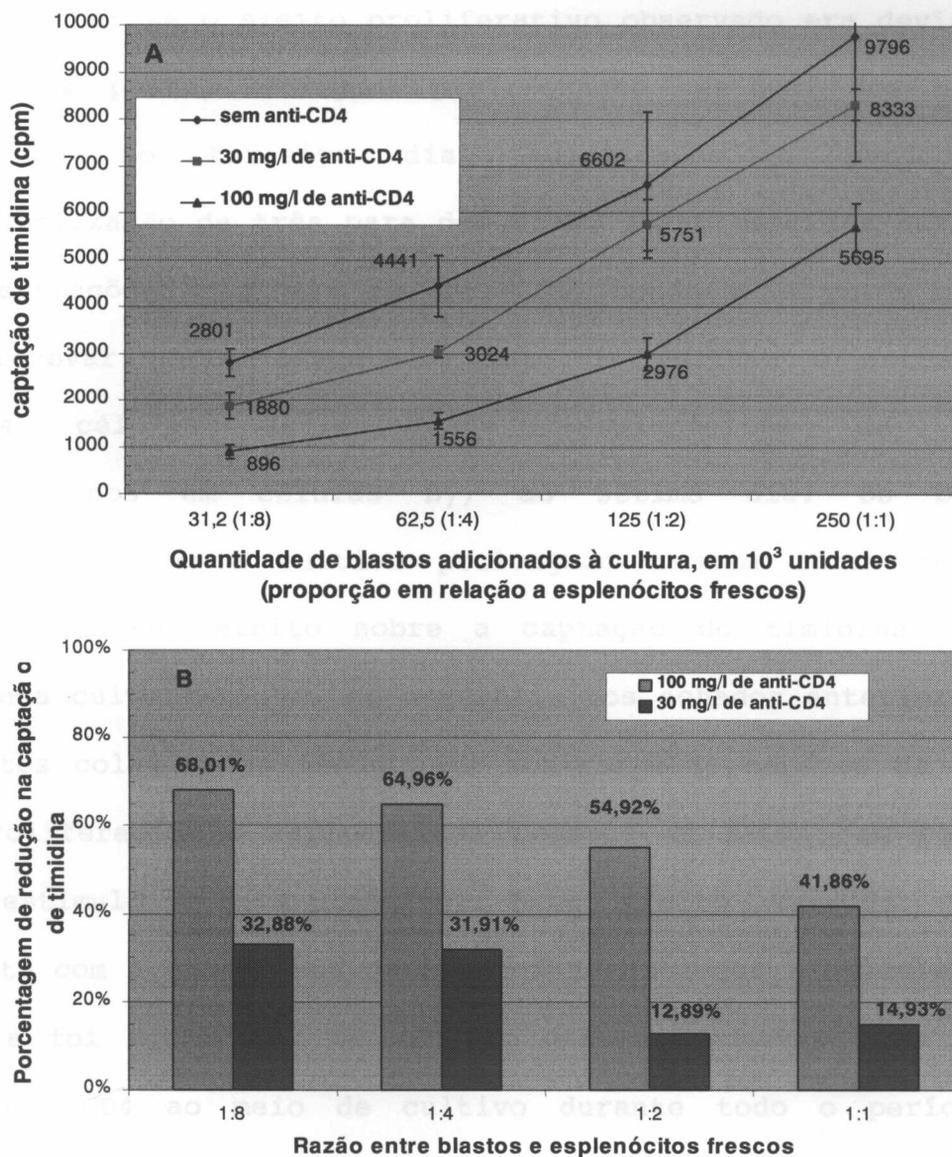


Figura 9: Efeito da adição de blastos sensibilizados na presença ou ausência de anti-CD4 sobre a incorporação de timidina em uma cultura mista. Células de baço pré-sensibilizadas por três dias na presença de diferentes concentrações de anti-CD4 (blastos) foram adicionadas a uma cultura mista linfocitária. O tratamento prévio dos blastos com anti-CD4 reduziu, de maneira dose-dependente, a incorporação de timidina verificada na cultura mista. (A), cada ponto representa a média de valores obtidos em triplicatas, com um *pool* de células de camundongos normais. (B), porcentagem de redução na captação de timidina, calculada em relação aos blastos cultivados sem anti-CD4, para cada um dos pontos do gráfico mostrado em (A).

Para testar se o efeito proliferativo observado era devido, ao menos em parte, a alguma proliferação residual dos blastos colhidos ao terceiro dia, aumentou-se o período de sensibilização de três para dez dias. Foram mantidas as mesmas concentrações originais de anti-CD4, tendo-se ainda o cuidado de renovar periodicamente o meio de cultura e acrescentar novas células estimuladoras (esplenócitos de DBA-2, enriquecidos em células B), ao sétimo dia. Os blastos resultantes deste cultivo prolongado também foram testados quanto ao seu efeito sobre a captação de timidina em uma segunda cultura mista. Ao contrário dos achados anteriores, os blastos colhidos ao décimo dia mostraram-se capazes de inibir a proliferação de esplenócitos frescos de BALB/c em resposta ao estímulo superantigênico. Este efeito guardou relação direta com a quantidade de blastos adicionados à cultura (Fig. 10) e foi acentuado, de maneira dose-dependente, pela adição de anti-CD4 ao meio de cultivo durante todo o período de sensibilização (Fig. 11).

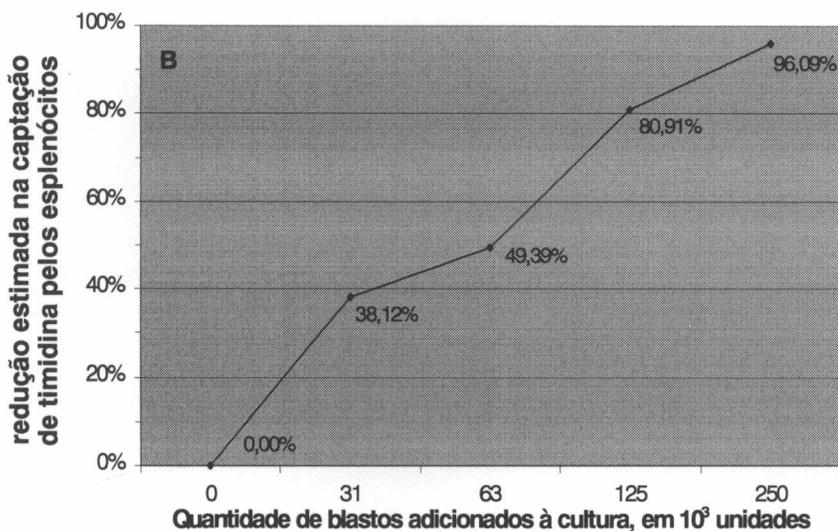
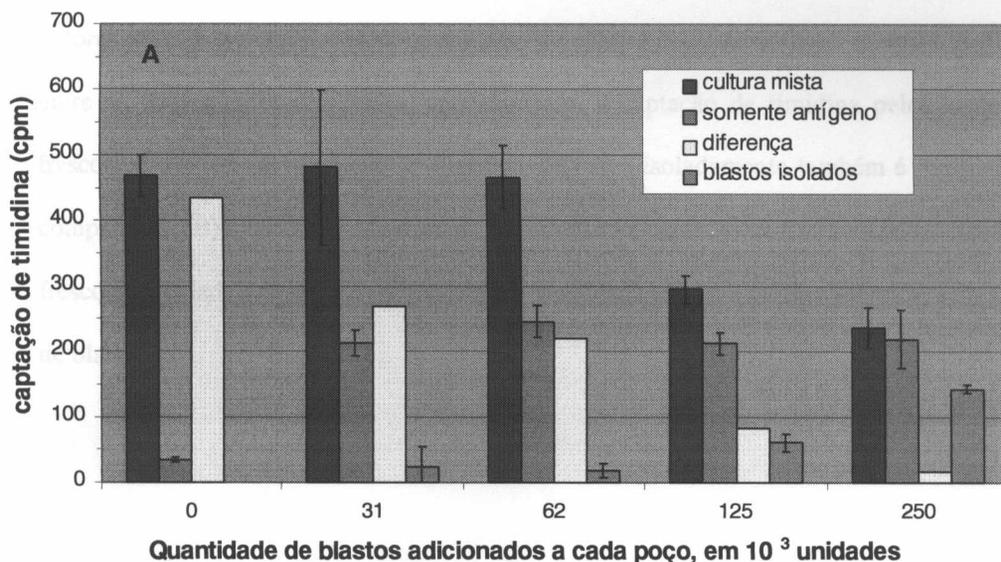


Figura 10: Efeito da adição de blastos de dez dias a uma cultura mista linfocitária. (A), células de baço pré-sensibilizadas *in vitro* por dez dias (blastos) foram adicionadas, em diferentes quantidades, a uma cultura mista linfocitária ( $2,5 \times 10^5$  esplenócitos frescos de BALB/c mais antígeno) ou somente ao antígeno ( $5 \times 10^5$  esplenócitos de DBA-2 previamente inativados com 1000 rads de radiação gama). A cultura mista apresentou queda progressiva na captação de timidina, com o aumento na quantidade de blastos adicionados a cada poço, enquanto a proliferação residual dos blastos em resposta ao antígeno manteve-se em um platô, independentemente da quantidade de células semeadas. Cada coluna representa a média de

valores obtidos em triplicatas, com um *pool* de células de camundongos normais. A diferença entre as duas médias representa, supostamente, a captação de timidina pelos esplenócitos frescos. A proliferação residual de blastos cultivados isoladamente também é mostrada, para comparação. (B), porcentagem estimada de redução na captação de timidina pelos esplenócitos frescos, calculada em relação à proliferação verificada em uma cultura idêntica, sem a adição de blastos.

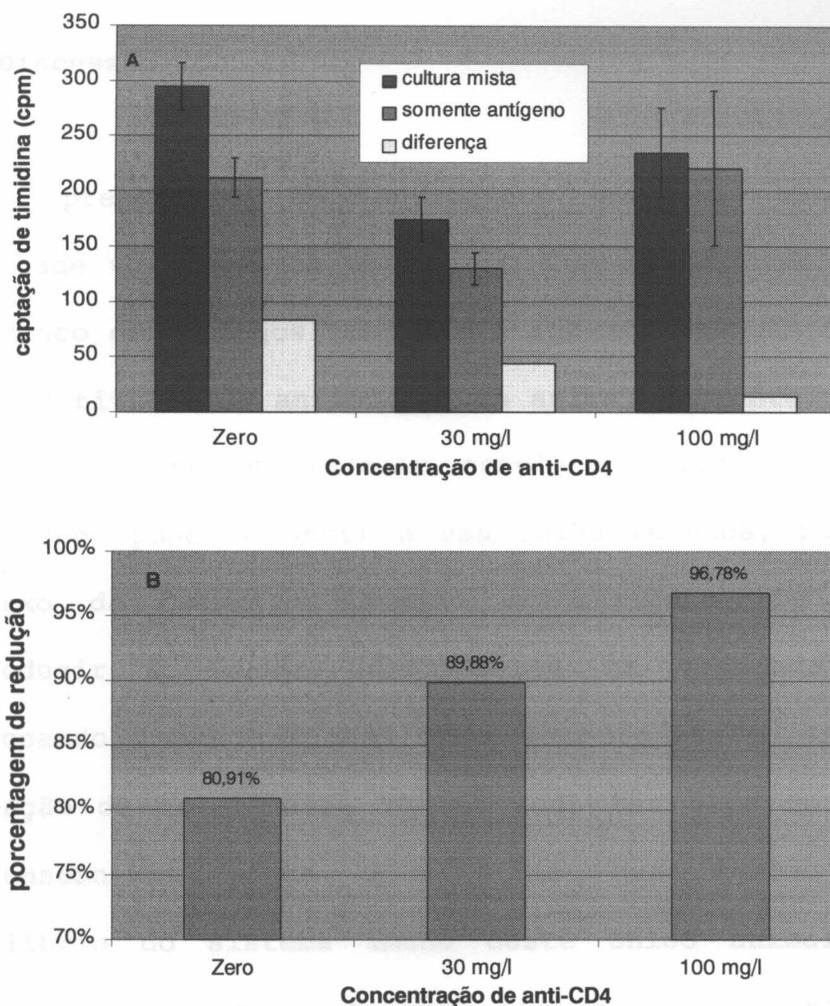


Figura 11: Potencialização do efeito inibidor dos blastos pelo seu prévio tratamento *in vitro* com anti-CD4. (A), ensaios de proliferação realizados com  $1,25 \times 10^5$  blastos, pré-sensibilizados por dez dias na presença de diferentes concentrações de anti-CD4, adicionados a uma cultura mista linfocitária ( $2,5 \times 10^5$  esplenócitos frescos de BALB/c mais antígeno) ou somente ao antígeno ( $5 \times 10^5$  esplenócitos de DBA-2, inativados com 1000 rads de radiação gama). Cada coluna representa a média de valores obtidos em triplicatas, com um *pool* de células de camundongos normais. A captação de timidina pelos esplenócitos frescos é estimada pela diferença entre as duas médias. (B), porcentagem de redução na captação de timidina, calculada com relação a uma cultura idêntica, sem a adição de blastos. O efeito inibitório observado foi mais pronunciado com blastos cultivados em concentrações mais elevadas do anticorpo monoclonal.

## VI) Discussão

Nossa preparação de anticorpos mostrou claramente sua atividade tolerogênica ao abolir a resposta humoral em quatro dos cinco camundongos testados e induzir redução de pelo menos 50% nos títulos de anticorpos do animal restante (Figura 3). A razão da falha em induzir completa tolerância neste único camundongo pode se dever a uma falha técnica, por exemplo, o refluxo da primeira injeção de antígeno, ou a falha em introduzir a agulha corretamente na cavidade peritoneal, provocando lesão tecidual mais pronunciada e dificultando a obtenção de tolerância. Também pode ter sido consequência de circunstâncias ainda indefinidas que tenham afetado o equilíbrio do sistema imune deste único animal, como, por exemplo, a secreção aumentada de proteínas de choque térmico (HSP) em resposta a um estresse excessivo, o que tem sido recentemente apontado como causa de aumento na intensidade da resposta imune <sup>(47-50)</sup>.

Esse anticorpo anti-CD4 também parece ter um efeito redutor direto sobre a proliferação linfocitária *in vitro*, visto que, analisando-se as figuras 4 e 5, verifica-se uma tendência clara de leituras de proliferação mais baixas nas culturas que foram tratadas com anti-CD4, em contraposição à imunoglobulina controle, apesar de os altos valores de desvio-padrão verificados comprometerem uma conclusão definitiva. Por isto,

esses resultados devem ser considerados preliminares, e os experimentos repetidos com um número maior de amostras, a fim de se obter significância estatística. Os valores baixos de cpm observados nesse estudo, referentes à incorporação de timidina pelas células em cultivo, podem dever-se, ao menos em parte, ao método aplicado para a leitura de emissões beta, que utiliza membranas secas, em contraposição à leitura com líquido de cintilação, mais eficiente, que costuma fornecer leituras em cpm três a quatro vezes maiores. Observa-se uma redução da diferença entre os efeitos de anti-CD4 e isotipo controle (aproximação entre as curvas) em concentrações mais altas de imunoglobulina, a partir de 300  $\mu\text{g/ml}$ , o que pode indicar algum efeito tóxico ou inibitório dos preparados de imunoglobulina de rato, nestas concentrações. A possibilidade de que esse efeito inibitório inespecífico seja decorrente da presença de agregados de imunoglobulinas foi minimizada pela prévia ultracentrifugação das preparações utilizadas a 100.000 g (vide material e métodos).

Utilizando-se esplenócitos de animais previamente imunizados, os mesmos resultados foram observados, desta vez de forma mais consistente, com menores valores de desvio-padrão, permitindo separar de forma clara as duas curvas de resposta (Figura 6). Este experimento deixa poucas dúvidas quanto ao efeito inibidor do anticorpo monoclonal anti-CD4. Mesmo neste caso, porém, a proliferação obtida na ausência de anti-CD4 é de

muito baixa magnitude, sugerindo que a fração de células que efetivamente respondem ao antígeno, nas condições em que este foi apresentado, pode ser muito pequena.

Nos três experimentos em que houve resposta linfoproliferativa específica nítida, observou-se uma redução desta resposta em todas as amostras incubadas com anti-CD4, quando comparadas aos seus respectivos controles. No experimento mostrado na figura 6, também se pode perceber uma clara relação dose-resposta. Tomados em conjunto, esses experimentos representam um total de 16 amostras (médias das leituras obtidas em triplicatas) às quais se adicionou anti-CD4, que foram comparadas com outras 16 às quais se adicionou isotipo controle, num total de 96 poços. Utilizando-se o teste não paramétrico de Wilcoxon para amostras pareadas ( $n=16$ ), determinou-se que as diferenças observadas são estatisticamente significantes ( $p=0,0005$ ).

Pode-se observar que a imunização prévia dos camundongos com três doses de aloantígeno, sendo somente a primeira delas com antígeno emulsionado em adjuvante completo de Freund (ACF), falhou em aumentar os níveis basais de proliferação, mas não comprometeu a eficácia do anti-CD4 em aboli-la (Figura 6), enquanto a tripla imunização com ACF aumentou a proliferação basal de forma não reversível pelo anti-CD4 (Figura 7). Esses resultados discrepantes, observados nos animais imunizados com

três doses de aloantígeno emulsionado em ACF, associam-se a um aumento da proliferação inespecífica (isto é, observada também na ausência completa de aloantígeno) e podem refletir a estimulação persistente dos esplenócitos pelos antígenos de *Mycobacterium* no ACF, levando à presença de um grande número de células T previamente ativadas *in vivo*, ainda proliferando e secretando fatores de crescimento *in vitro*, o que poderia impedir ou mascarar um eventual efeito dos anticorpos anti-CD4. Se for este o caso, a aparente potencialização da captação de timidina com doses mais elevadas de anti-CD4, observada neste único experimento, poderia refletir, indiretamente, o fenômeno bem descrito da apoptose induzida por hiperativação celular, que vem sendo considerado um importante mecanismo de regulação das respostas imunes <sup>(51-56)</sup>. A elevação na captação de timidina seria explicada, destarte, pelo aumento na sobrevivência das células T em cultura, em consequência à redução no grau de ativação celular (e, por conseguinte, de apoptose).

A utilização de um superantígeno permitiu observar o efeito do anti-CD4 em uma situação na qual uma proporção maior de linfócitos têm condições de proliferar em resposta ao estímulo antigênico. Isto permitiu também obter quantidades suficientes de células "tolerizadas" para estudar o seu efeito sobre uma segunda população de linfócitos, não tratada com anti-CD4.

Na primeira cultura, de três dias, foram obtidos blastos que, quando misturados a uma cultura mista primária (esplenócitos frescos mais superantígeno), mostraram-se capazes de elevar significativamente a captação de timidina (figuras 8 e 9). A relação constante entre esta captação e o número de blastos adicionados, assim como a magnitude da diferença em relação à proliferação de uma cultura primária (sem blastos), sugerem que são os próprios blastos, e não os esplenócitos frescos, os responsáveis pela maior parte da proliferação observada neste ensaio. Uma evidência suplementar para esta hipótese é o fato de esta acentuada proliferação não se verificar quando o experimento é repetido com blastos cultivados por dez dias (ver discussão adiante), cuja capacidade proliferativa se mostra bastante reduzida. No entanto, como ambas as populações celulares são teoricamente capazes de proliferar, os dados não permitem afirmar nem descartar um eventual efeito estimulador/inibidor dos blastos de três dias sobre a captação de timidina pelos esplenócitos, já que qualquer efeito seria facilmente mascarado pela proliferação dos próprios blastos. É possível perceber, isto sim, que o prévio tratamento dos blastos com anti-CD4 reduz a proliferação da cultura final, notadamente na concentração de 100  $\mu\text{g/ml}$  (figura 9).

No segundo experimento, com blastos cultivados por dez dias, novos controles foram incluídos, a saber, a captação de timidina por blastos isolados ou estimulados com antígeno, na

ausência de esplenócitos frescos. Isto permitiu estimar, ainda que de forma indireta, a parcela de timidina incorporada devida à proliferação dos esplenócitos frescos. Contudo, mais uma vez, a presença de duas populações celulares distintas nessa cultura, ambas capazes de proliferação, impede a determinação direta da captação de timidina por cada população.

Os blastos isolados mostraram uma captação residual bastante reduzida de timidina (Figura 10). A adição de antígeno aumenta este valor para pouco mais de 200 cpm, independentemente da quantidade de blastos. Nestas condições, a adição de esplenócitos frescos aumenta a incorporação de timidina. Este aumento guarda proporção inversa com o número de blastos, o que indica um efeito inibidor dos blastos sobre a proliferação destes esplenócitos. Uma vez que este efeito é observável com blastos cultivados na ausência de anti-CD4, a origem da atividade inibidora deve ser atribuída às condições em que estes blastos se desenvolveram. Podemos supor, por exemplo, um efeito do longo tempo de cultivo em condições restritivas (a maior parte dos cultivos de linfócitos *in vitro* não ultrapassa cinco dias), ou então uma presumível alteração fenotípica dos blastos, associada a sucessivos ciclos celulares <sup>(54,57-61)</sup>. Um fenômeno semelhante foi descrito em humanos, em 1984, por Akbar e Jones <sup>(62)</sup>.

Ainda assim, a adição de anti-CD4 ao meio de cultura em que os blastos são produzidos leva à acentuação de seu efeito inibitório sobre um cultivo primário, conforme se observa na figura 11. A diferença entre a captação de timidina por blastos expostos somente ao antígeno e aquela observada na cultura secundária (blastos mais esplenócitos frescos) foi significativamente reduzida quando os blastos foram pré-cultivados na presença de 30  $\mu\text{g/ml}$  de anti-CD4. Com o aumento da concentração de anti-CD4 para 100  $\mu\text{g/ml}$ , observaram-se reduções ainda mais pronunciadas, evidenciando, também neste modelo, uma relação dose-efeito, idêntica àquela que já mostramos no modelo de inibição direta da resposta a aloantígenos.

É razoável imaginar, seguindo a linha de pensamento sugerida por Waldmann <sup>(7)</sup>, que o contato prolongado dos esplenócitos com o superantígeno ative um mecanismo fisiológico de controle da resposta imune, produzindo uma subpopulação de células T reguladoras/supressoras. Esta hipótese é coerente com a idéia de que o braço regulador da resposta imune necessita de mais tempo para se desenvolver do que o braço efetor, conceito este reforçado pela expressão tardia de CTLA-4, verificada em células T ativadas, que permite a regulação negativa da ativação e proliferação linfocitárias <sup>(3,54,63,64)</sup>. Os resultados de Akbar e Jones <sup>(62)</sup> também parecem apontar para esta direção. Ao inibir a resposta efetora por tempo suficiente, o anticorpo

anti-CD4 poderia então favorecer a seleção destas células reguladoras, levando a um efeito sinérgico. Conquanto nossos resultados nada permitam afirmar a respeito dos mecanismos envolvidos, a hipótese aqui apresentada, respaldada em conceitos propostos por outros autores, pode explicar satisfatoriamente os resultados observados no presente trabalho.

Nos últimos anos, diversos fenótipos de células T reguladoras/supressoras têm sido descritos <sup>(65-69)</sup>, e, se é verdade que alguns deles exercem seus efeitos sobre outros linfócitos mediante a secreção de fatores solúveis (por exemplo, as células Th3/Tr1) <sup>(35-38)</sup>, outras exigem o contato direto com as células suprimidas (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>) <sup>(70-72)</sup> ou agem indiretamente, mediante indução de um caráter inibitório em células apresentadoras de antígeno (CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup>) <sup>(72)</sup>. No caso das células CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, há evidências de que esses efeitos são dependentes de uma forma do TGF-β ligada à membrana plasmática <sup>(73)</sup>.

Não existem dados, ainda, que permitam enquadrar os blastos observados *in vitro* em qualquer das categorias acima. Nem é possível, até este momento, afirmar com segurança se a atividade supressora observada é mediada por fatores humorais ou exige o contato celular direto. Um experimento relativamente simples que poderia responder a esta questão

seria a repetição das culturas mistas acima descritas em câmaras especiais, onde as diferentes populações celulares mantêm contato entre si somente através de uma membrana semi-permeável, que permite a livre difusão de fatores solúveis. Sendo particulado, o antígeno, provavelmente, teria que ser adicionado a ambos os lados da membrana, para que pudesse estimular simultaneamente os blastos e os esplenócitos frescos.

Um possível ganho adicional desta abordagem seria a determinação exata da proliferação dos esplenócitos no co-cultivo, sem a interferência da captação de timidina pelos blastos. Uma limitação esperada, no entanto, é que, na hipótese da existência de efeitos dependentes do contato celular direto entre blastos e esplenócitos, a análise destes resultados estaria comprometida.

A marcação de uma população celular com carboxifluoresceína diacetato succinimidil éster (CFSE), uma substância fluorescente que se distribui estocasticamente entre as células filhas <sup>(74)</sup>, permite demonstrar, em um citômetro de fluxo, o número de ciclos celulares ocorridos nesta população, em um certo intervalo de tempo. A aplicação desta técnica às células precursoras dos blastos deverá ser usada, em futuros experimentos, para determinar a relação entre o número de

ciclos de proliferação e os efeitos que estas células exercem sobre uma população de esplenócitos frescos.

Os experimentos que se mostraram mais significativos deverão ser repetidos em melhores condições, com amostragens de tamanho suficiente para uma análise estatística adequada, visando confirmar estes resultados preliminares. Na sequência, está prevista também a inoculação destes blastos em um hospedeiro, a fim de verificar se a inibição de proliferação *in vitro* está associada a indução de tolerância *in vivo*. Caso a resposta a esta questão se mostre afirmativa, um passo importante terá sido dado no sentido de permitir, futuramente, que os benefícios da indução de tolerância por anticorpos anti-CD4 sejam usufruídos com um mínimo de riscos e efeitos colaterais.

## VII) Conclusão

Nos modelos aqui desenvolvidos, o anticorpo monoclonal anti-CD4 YTS177.9 inibe, *in vitro*, a proliferação de esplenócitos em resposta a antígenos.

O cultivo prolongado de esplenócitos, nas condições testadas, induz ao aparecimento de uma população celular com propriedades moduladoras sobre a proliferação de células idênticas, recém-obtidas, em resposta ao antígeno. Este efeito independe do anticorpo monoclonal YTS177.9, sendo, todavia, intensificado por este, de maneira dose-dependente. Estes resultados podem constituir uma evidência de tolerância dominante *in vitro*.

## Referências Bibliográficas

- 1) **Rumjanek VM.** Próprio e estranho: é essa a questão? **Ciência Hoje** 29(171):40-41, 2001.
- 2) **Vaz NM.** A teoria burnetiana hoje. **Ciência Hoje** 29(171):41-42, 2001.
- 3) **Roitt IM, Brostoff J, Male DK.** **Imunologia Quarta Edição** São Paulo: Manole, 1997.
- 4) **Benjamin RJ, Waldmann H.** Induction of tolerance by monoclonal antibody therapy. **Nature** 320:449-451, 1986.
- 5) **Benjamin RJ, Cobbold SP, Clark MR, Waldmann H.** Tolerance of rat monoclonal antibodies: implications for serotherapy. **J. Exp. Med.** 163:1539-1552, 1986.
- 6) **Gutstein NL, Seaman WE, Scott JH, Wofsy D.** Induction of immune tolerance by administration of monoclonal antibody to L3T4. **J. Immunol.** 137(4):1127-1132, 1986.
- 7) **Waldmann H, Cobbold SP.** How do monoclonal antibodies induce tolerance: a role for infectious tolerance? **Annu. Rev. Immunol.** 16:619-644, 1998.
- 8) **Cobbold SP, Qin S, Leong LYW, Martin G, Waldmann H.** Reprogramming the immune system for peripheral tolerance with CD4 and CD8 monoclonal antibodies. **Immunol. Rev.** 129:165-201, 1992.

- 9) Isaacs JD, Burrows N, Wing M, Keogan MT, Rebello PRUB, Watts RA, Pye RJ, Norris P, Hazelman BL, Hale G, Waldmann H. Humanized anti-CD4 monoclonal antibody therapy of autoimmune and inflammatory disease. *Clin. Exp. Immunol.* 110:158-166, 1997.
- 10) Horneff G, Burmester GR, Emmrich F, Kalden JR. Treatment of rheumatoid arthritis with an anti-CD4 monoclonal antibody. *Arthritis Rheum.* 34(2):129-140, 1991.
- 11) van der Lubbe PA, Reiter C, Breedveld FC, Kruger K, Schattenkirchner M, Sanders ME, Riethmuller G. Chimeric CD4 monoclonal antibody cM-T412 as a therapeutical approach to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 36(10):1375-1379, 1993.
- 12) Henell KR, Cheever JM, Kimball JA, Lye WC, Munar MY, Misiti J, Vitow C, Norman DJ. OKT4A (a murine IgG2a anti-CD4 monoclonal antibody) in human organ transplantation: pharmacokinetics and peripheral pharmacodynamics. *Transplant. Proc.* 25:800-801, 1993.
- 13) Norman DJ, Bennett WU, Cobanaglu R, Hehrsberger R, Hosenpud JD, Meyer MM, Misiti J, Ott G, Ratkovec R, Shihab F, Vitow C, Barry JM. Use of OKT4A (a murine monoclonal anti-CD4 antibody) in human organ transplantation: initial clinical experience. *Transplant. Proc.* 25:802-803, 1993.

- 14) **Qin S, Cobbold S, Benjamin R, Waldmann H.** Induction of classical transplantation tolerance in the adult. **J. Exp. Med.** 169:779-794, 1989.
- 15) **Parish NM, Bowie L, Harach SZ, Phillips JM, Cooke A.** Thymus-dependent monoclonal antibody-induced protection from transferred diabetes. **Eur. J. Immunol.** 28:4362-4373, 1998.
- 16) **Benjamin RJ, Qin S, Wise MP, Cobbold SP, Waldmann H.** Mechanisms of monoclonal antibody-facilitated tolerance induction: a possible role for the CD4 (L3T4) and CD11a (LFA-1) molecules in self-non-self discrimination. **Eur. J. Immunol.** 18:1079-1088, 1988.
- 17) **Quddus J, Kaplan A, Richardson BC.** Anti-CD11a prevents deletion of self-reactive T cells in neonatal C57BR mice. **Immunol.** 82(2):301-305, 1994.
- 18) **Le Mauff B, Hourmant M, Rougier JP, Hirn M, Dantal J, Baatard R, Cantarovich D, Jacques Y, Souillou JP.** Effect of anti-LFA1 (CD11a) monoclonal antibodies in acute rejection in human kidney transplantation. **Transplantation** 52(2):291-296, 1991.
- 19) **Honey K, Cobbold SP, Waldmann H.** CD40 ligand blockade induces CD4<sup>+</sup> T cell tolerance and linked suppression. **J. Immunol.** 163:4805-4810, 1999.

- 20) **Wekerle T, Sayegh MH, Ito H, Hill J, Chandraker A, Pearson D, Swenson KG, Zhao G, Sykes M.** Anti-CD154 or CTLA4Ig obviates the need for thymic irradiation in a non-myeloablative conditioning regimen for the induction of mixed hematopoietic chimerism and tolerance. **Transplantation 68:1348-1355, 1999.**
- 21) **Chen Z, Cobbold S, Waldmann H, Metcalfe S.** Stability of tolerance in mice generated by CD4 and CD8 monoclonal antibody treatment: cell transfer experiments. **Transplant. Proc. 25:790-791, 1993.**
- 22) **Chen ZK, Cobbold SP, Waldmann H, Metcalfe S.** Amplification of natural regulatory immune mechanisms for transplantation tolerance. **Transplantation 62:1200-1206, 1996.**
- 23) **Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H.** "Infectious" transplantation tolerance. **Science 259:974-977, 1993.**
- 24) **Yin D, Fathman CG.** CD4-positive suppressor cells block allotransplant rejection. **J. Immunol. 154:6339-6345, 1995.**
- 25) **Cobbold SP, Martin G, Waldmann H.** The induction of skin graft tolerance in major histocompatibility complex-mismatched or primed recipients: primed T cells can be tolerized in the periphery with anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. **Eur. J. Immunol. 20:2747-2755, 1990.**

- 26) **Marshall SE, Cobbold SP, Davies JD, Martin G, Phillips JM, Waldmann H.** Tolerance and suppression in a primed immune system. *Transplantation* 62:1614-1621, 1996.
- 27) **Phillips JM, Harach SZ, Parish NM, Fehervari Z, Haskins K, Cooke A.** Nondepleting anti-CD4 has an immediate action on diabetogenic effector cells, halting their destruction of pancreatic  $\beta$  cells. *J. Immunol.* 165:1949-1955, 2000.
- 28) **Davies JD, Leong LYW, Mellor A, Cobbold SP, Waldmann H.** T-cell suppression in transplantation tolerance through linked recognition. *J. Immunol.* 156:3602-3607, 1996.
- 29) **Cobbold SP, Adams E, Marshall SE, Davies JD, Waldmann H.** Mechanisms of peripheral tolerance and suppression induced by monoclonal antibodies to CD4 and CD8. *Immunol. Rev.* 149:5-33, 1996.
- 30) **Chirmule N, Avots A, LakshmiTamma SM, Pahwa S, Serfling E.** CD4-mediated signals induce T cell dysfunction in vivo. *J. Immunol.* 163:644-649, 1999.
- 31) **Portolés P, de Ojeda G, Criado G, Fernández-Centeno E, Rojo JM.** Antibody-induced CD3-CD4 coligation inhibits TCR/CD3 activation in the absence of costimulatory signals in normal mouse CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. *Cellular Immunology* 195:96-109, 1999.

- 32) **Darby CR, Bushell A, Morris PJ, Wood KJ.** Nondepleting anti-CD4 antibodies in transplantation. **Transplantation, 57:1419-1426, 1994.**
- 33) **Chatenoud L, Salomon B, Bluestone JA.** Suppressor T cells - they're back and critical for regulation of autoimmunity! **Immunol. Rev. 182:149-163, 2001.**
- 34) **Li L, Crowley M, Nguyen A, Lo D.** Ability of a nondepleting anti-CD4 antibody to inhibit Th2 responses and allergic lung inflammation is independent of coreceptor function. **J. Immunol. 163:6557-6566, 1999.**
- 35) **Roncarolo MG, Bacchetta R, Bordignon C, Narula S, Levings MK.** Type 1 T regulatory cells. **Immunol. Rev. 182:68-79, 2001.**
- 36) **Zelenika D, Adams E, Humm S, Lin C-Y, Waldmann H, Cobbold SP.** The role of CD4<sup>+</sup> T-cell subsets in determining transplantation rejection or tolerance. **Immunol. Rev. 182:164-179, 2001.**
- 37) **Singh B, Read S, Asseman C, Malmström V, Mottet C, Stephens LA, Stepankova R, Tlaskalova H, Powrie F.** Control of intestinal inflammation by regulatory T cells. **Immunol. Rev. 182:190-199, 2001.**
- 38) **Weiner HL.** Induction and mechanism of action of transforming growth factor- $\beta$ -secreting Th3 regulatory cells. **Immunol. Rev. 182:207-214, 2001.**

- 39) **Scully R, Qin S, Cobbold S, Waldmann H.** Mechanisms in CD4 antibody-mediated transplantation tolerance: kinetics of induction, antigen dependency and role of regulatory T cells. *Eur. J. Immunol.* 24:2383-2392, 1994.
- 40) **Bandeira A, Mengel J, Burlen-Defranoux O, Coutinho A.** Proliferative T cell anergy to Mls-1a does not correlate with in vivo tolerance. *Int. Immunol.* 3(9):923-931, 1991.
- 41) **Roelen DL, Bushell AR, Niimi M, Young NT, Rust NA, Morris PJ, Wood KJ.** Immunoregulation by CD4 T cells in the induction of specific immunological unresponsiveness to alloantigens *in vivo*: evidence for a reduction in the frequency of alloantigen-specific cytotoxic T cells *in vitro*. *Human Immunology* 59:529-539, 1998.
- 42) **Jaques BC, Ahmiedat H, Gracie JA, Marshall HE, Middleton SE, Bolton EM, Bradley JA.** Thymus-dependent, anti-CD4-induced tolerance to rat cardiac allografts. *Transplantation* 66:1291-1299, 1998.
- 43) **Arima T, Lehmann M, Flye MW.** Induction of donor specific transplantation tolerance to cardiac allografts following treatment with nondepleting (RIB 5/2) or depleting (OX-38) anti-CD4 mAb plus intrathymic or intravenous donor alloantigen. *Transplantation* 63:284-292, 1997.

- 44) **Motoyama K, Arima T, Yu S, Lehmann M, Flye MW.** The kinetics of tolerance induction by nondepleting anti-CD4 monoclonal antibody (RIB 5/2) plus intravenous donor alloantigen administration. **Transplantation** 69:285-293, 2000.
- 45) **Pearson TC, Darby CR, Bushell AR, West LJ, Morris PJ, Wood KJ.** The assessment of transplantation tolerance induced by anti-CD4 monoclonal antibody in the murine model. **Transplantation** 55:361-367, 1993.
- 46) **Manilay JO, Pearson DA, Sergio JJ, Swenson KG, Sykes M.** Intrathymic deletion of alloreactive T cells in mixed bone marrow chimeras prepared with a nonmyeloablative conditioning regimen. **Transplantation**, 66:96-102, 1998.
- 47) **Galucci S, Matzinger P.** Danger signals: SOS to the immune system. **Curr. Opin. Immunol.** 13:114-119, 2001.
- 48) **Anderson CC, Carroll JM, Gallucci S, Ridge JP, Cheever AW, Matzinger P.** Testing time-, ignorance-, and danger-based models of tolerance. **J. Immunol.** 166:3663-3671, 2001.
- 49) **Matzinger P.** The danger model: a renewed sense of self. **Science** 296:301-305, 2002.
- 50) **Matzinger P.** An innate sense of danger. **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 961:341-342, 2002.

- 51) **Ucker DS, Ashwell JD, Nickas G.** Activation-driven T cell death. I. Requirements for de novo transcription and translation and association with genome fragmentation. **J. Immunol.** 143:3461-3469, 1989.
- 52) **Lenardo MJ.** Interleukin-2 programs mouse alpha beta T lymphocytes for apoptosis. **Nature** 353:858-861, 1991.
- 53) **Chan KF, Siegel MR, Lenardo MJ.** Signaling by the TNF receptor superfamily and T cell homeostasis. **Immunity** 13:419-422, 2001.
- 54) **Doyle AM, Mullen AC, Villarino AV, Hutchins AS, High FA, Lee HW, Thompson CB, Reiner SL.** Induction of cytotoxic T lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) restricts clonal expansion of helper T cells. **J. Exp. Med.** 194(7):893-902, 2001.
- 55) **Van Parijs L, Abbas AK.** Homeostasis and self-tolerance in the immune system: turning lymphocytes off. **Science** 280:243-248, 1998.
- 56) **Van Parijs L, Abbas AK.** Role of FAS-mediated cell death in the regulation of immune responses. **Curr. Opin. Immunol.** 8:355-361, 1996.
- 57) **Bird JJ, Brown DR, Mullen AC, Moskowitz NH, Mahowald MA, Sider JR, Gajewski TF, Wang CR, Reiner SL.** Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. **Immunity** 9:229-237, 1998.

- 58) **Hasbold J, Gett AV, Rush JS, Deenick E, Avery D, Jun J, Hodgkin PD.** Quantitative analysis of lymphocyte differentiation and proliferation in vitro using carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester. **Immunol. Cell Biol.** 77:516-522, 1999.
- 59) **Gett AV, Hodgkin PD.** Cell division regulates the T cell cytokine repertoire, revealing a mechanism underlying immune class regulation. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.** 95:9488-9493, 1998.
- 60) **Lohning M, Richter A, Radbruch A.** Cytokine memory of T helper lymphocytes. **Adv. Immunol.** 80:115-181, 2002.
- 61) **Richter A, Lohning M, Radbruch A.** Instruction for cytokine expression in T helper lymphocytes in relation to proliferation and cell cycle progression. **J. Exp. Med.** 190:1439-1450, 1999.
- 62) **Akbar AN, Jones DB.** Suppression of the mixed lymphocyte reaction by alloantigen-primed and -stimulated human spleen lymphocytes. **Immunology** 51:361-366, 1984.
- 63) **Van Parijs L, Perez VL, Biuckians A, Maki RG, London CA, Abbas AK.** Role of interleukin 12 and costimulators in T cell anergy in vivo. **J. Exp. Med.** 186:1119-1128, 1997.
- 64) **Perez VL, Van Parijs L, Biuckians A, Zheng XX, Strom TB, Abbas AK.** Induction of peripheral T cell tolerance in vivo requires CTLA-4 engagement. **Immunity** 6:411-417, 1997.

- 65) **Coutinho A, Hori S, Carvalho T, Caramalho I, Demengeot J.** Regulatory T cells: the physiology of autoreactivity in dominant tolerance and "quality control" of immune responses. *Immunol. Rev.* 182:89-98, 2001.
- 66) **Annacker O, Pimenta-Araujo R, Burlen-Defranoux O, Bandeira A.** On the ontogeny and physiology of regulatory T cells. *Immunol. Rev.* 182:5-17, 2001.
- 67) **Durkin HG, Waksman BH.** Thymus and tolerance. Is regulation the major function of the thymus? *Immunol. Rev.* 182:33-57, 2001.
- 68) **Papiernik M.** Natural CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells. Their role in the control of superantigen responses. *Immunol. Rev.* 182:180-189, 2001.
- 69) **Field EH, Matesic D, Rigby S, Fehr T, Rouse T, Gao Q.** CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory cells in acquired MHC tolerance. *Immunol. Rev.* 182:99-112, 2001.
- 70) **Sakaguchi S, Sakaguchi N, Shimizu J, Yamazaki S, Sakihama T, Itoh M, Kuniyasu Y, Nomura T, Toda M, Takahashi T.** Immunologic tolerance maintained by CD25<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells: their common role in controlling autoimmunity, tumor immunity, and transplantation tolerance. *Immunol. Rev.* 182:18-32, 2001.

- 71) Shevach EM, Mc Hugh RS, Piccirillo CA, Thornton AM. Control of T-cell activation by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. *Immunol. Rev.* 182:58-67, 2001.
- 72) Cortesini R, LeMaout J, Ciubotariu R, Cortesini NSF. CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T suppressor cells and the induction of antigen-specific, antigen-presenting cell-mediated suppression of Th reactivity. *Immunol. Rev.* 182:201-206, 2001.
- 73) Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor  $\beta$ . *J. Exp. Med.* 194:629-644, 2001.
- 74) Lyons AB, Parish CR. Determination of lymphocyte division by flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 171:131-137, 1994.

## Apêndice

## Tabulação de resultados

Tabela 1- Captação de timidina (em cpm) por uma cultura mista linfocitária, na presença de diferentes concentrações de anti-CD4. Foram usados esplenócitos de camundongos BALB/c e CBA, alternativamente, como células estimuladoras e respondedoras. Os dados mostrados correspondem à média de três leituras e foram representados graficamente nas figuras 4 e 5.

Linhagens testadas	Tratamento	Concentração				
		10 µg/ml	30 µg/ml	100 µg/ml	300 µg/ml	1000 µg/ml
BALB/c x CBA	Anti-CD4	126,00	122,33	133,00	2,67	3,00
	IgG controle	169,00	133,67	212,33	29,00	3,33
CBA x BALB/c	Anti-CD4	114,00	109,67	98,67	5,67	3,67
	IgG controle	226,67	142,67	233,67	65,00	13,67

Tabela 2 – Captação de timidina (em cpm) por uma cultura mista linfocitária, na presença de diferentes concentrações de anti-CD4. Esplenócitos de camundongos BALB/c e CBA foram usados como células respondedoras e estimuladoras, respectivamente. As células respondedoras foram obtidas de camundongos previamente imunizados com três inóculos de esplenócitos de CBA, em intervalos de sete dias, sendo o primeiro inóculo feito por via subcutânea, com antígeno emulsionado em adjuvante completo de Freund, e os dois restantes por via intraperitoneal, com antígeno suspenso em salina. Os dados mostrados correspondem à média de três leituras e foram representados graficamente na figura 6.

Tratamento	Identificação da amostra	Concentração		
		20 µg/ml	100 µg/ml	300 µg/ml
Anti-CD4	Amostra 1	36,7	6,7	2
	Amostra 2	48	15,3	8,7
IgG controle	Amostra 1	59	94,3	7,7
	Amostra 2	69,7	66	18,7

Tabela 3 – Captação de timidina (em cpm) por uma cultura mista linfocitária, na presença de diferentes concentrações de anti-CD4. Foram usados esplenócitos de camundongos BALB/c e CBA como células respondedoras e estimuladoras, respectivamente. As células respondedoras foram obtidas de camundongos previamente imunizados com três inóculos de esplenócitos de CBA emulsionados em adjuvante completo de Freund, administrados por via subcutânea em intervalos de sete dias. Os dados mostrados correspondem à média de três leituras e foram representados graficamente na figura 7.

Tratamento	Identificação da amostra	Concentração		
		20 µg/ml	100 µg/ml	300 µg/ml
Anti-CD4	Amostra 1	893	1498	1148
	Amostra 2	652	1180	602
IgG controle	Amostra 1	818	763	574
	Amostra 2	640	657	585

Tabela 4 - Captação de timidina (em cpm) por uma cultura mista linfocitária, à qual se adicionaram blastos previamente estimulados com antígeno por três dias, na presença de diferentes concentrações de anti-CD4. Foram utilizados esplenócitos de camundongos DBA-2 e BALB/c, como células estimuladoras e respondedoras, respectivamente. Os dados mostrados correspondem à média de três leituras e foram representados graficamente nas figuras 8 e 9.

Concentração de anti-CD4	Quantidade de blastos			
	31x10 <sup>3</sup>	62x10 <sup>3</sup>	125x10 <sup>3</sup>	250x10 <sup>3</sup>
Sem anti-CD4	2801	4441	6602	9796
30 µg/ml	1880	3024	5751	8333
100 µg/ml	896	1556	2976	5695

Tabela 5 – Captação de timidina (em cpm) por uma cultura de blastos previamente estimulados com antígeno, na ausência de anti-CD4, por dez dias. Os blastos foram cultivados isoladamente ou na presença do antígeno, ou ainda adicionados a uma cultura mista linfocitária, com esplenócitos frescos. Foram utilizados esplenócitos de camundongos DBA-2 e BALB/c, como células estimuladoras e respondedoras, respectivamente. Os dados mostrados correspondem à média de três leituras e foram representados graficamente na figura 10.

Composição da cultura	Quantidade de blastos				
	Sem blastos	$31 \times 10^3$	$62 \times 10^3$	$125 \times 10^3$	$250 \times 10^3$
Cultura mista	469	481	466	295	236
Blastos + antígeno	34,3	212	246	212	219
Blastos isolados	-	22,7	18	60,7	143

Tabela 6 - Captação de timidina (em cpm) por uma cultura de blastos previamente estimulados com antígeno, na presença de diferentes concentrações de anti-CD4, por dez dias. Os blastos foram cultivados na presença do antígeno ou adicionados a uma cultura mista linfocitária, com esplenócitos frescos. Foram utilizados esplenócitos de camundongos DBA-2 e BALB/c, como células estimuladoras e respondedoras, respectivamente. Os dados mostrados correspondem à média de três leituras e foram representados graficamente na figura 11.

Composição da cultura (+ $125 \times 10^3$ blastos)	Concentração de anti-CD4		
	sem anti-CD4	30 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$
Cultura mista	295	174	235
Antígeno	212	130	221