

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



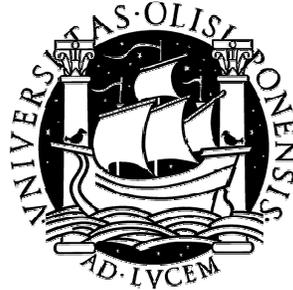
Geração de Células T Reguladoras
Específicas para Alergénio

Marta Ribeiro Lopes Caridade

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2007

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Geração de Células T Reguladoras
Específicas para Alergénio

Por

Marta Ribeiro Lopes Caridade

Dissertação para o grau de Mestre orientada pelos

Prof. Doutor Luís Graça, Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa

Prof. Doutor Júlio Duarte, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

2007

“How many times must a man look up
before he can see the sky?”

The answer, my friend, is blowin' in the wind”

Bob Dylan, *Blowin' in the wind*, 1963

Agradecimentos

Ao Luís Graça pela oportunidade e o lugar que me deu no seu laboratório.

À Vanessa Oliveira por me ter ensinado tudo o que sabia sobre ensaios *in vitro* e pelo apoio constante.

À Ana Água-Doce e à Joana Duarte, por me terem acolhido e pela ajuda preciosa, sem a qual muito deste trabalho se tornava quase impossível.

À Ivonne Wollenberg e à Marta Monteiro pelo companheirismo de laboratório.

A todo o laboratório do Bruno Silva-Santos pela ajuda e companhia nas horas tardias.

Aos meus pais, por me terem ensinado a pescar.

À Inês Rangel por me mostrar o que é ter uma irmã... Nem só de sangue são feitos os irmãos.

Ao Igor Marques dos Santos por estar sempre presente, mesmo nos piores momentos.

À Inês Cebola e à Germana Domingues pelo apoio e por me compreenderem tão bem, mesmo a tantos quilómetros de distância.

Ao Rafael Mota Veiga, porque os grandes amigos aparecem onde menos se espera.

Ao Tiago Rangel, por me fazer rir tanto.

À Rita Leitão, por se rever tanto em mim e não me deixar cometer tantos erros.

Ao Rui Azevedo, por me ter acompanhado ao longo de todos estes anos de estudo.

A todos os meus amigos, que estão sempre lá, apesar do meu temperamento tão difícil.

Obrigada a todos pelo apoio nas longas horas de trabalho e durante a escrita da tese, sem o qual este trabalho teria sido muito mais difícil.

Resumo

O controlo de respostas imunes patológicas (autoimunidade, alergia, rejeição de transplantes) tem sido um dos principais objectivos dos imunologistas. Apesar dos avanços recentes, a maioria dos tratamentos actuais ainda procura diminuir a imunidade e inflamação em vez de reestabelecer o estado saudável da tolerância imunológica.

Recentemente mostrou-se, em estudos animais, que uma subpopulação de células T, as células T reguladoras (Treg) podem suprimir respostas imunes específicas para antigénio levando a um estado de tolerância. O rácio entre estas células e as células agressivas tem sido associado ao desenvolvimento ou prevenção de doenças imunitárias.

O objectivo deste trabalho é testar a hipótese que o tratamento de um modelo animal de asma alérgica com a administração de anticorpo monoclonal não depletante anti-CD4, conduz a tolerância através da indução de células Treg Foxp3⁺, ou em alternativa pela eliminação de células agressivas específicas para o alergénio.

Os nossos resultados *in vivo* mostram que o tratamento com anti-CD4 quer nos modelos de asma alérgica, quer em animais DO11.10 Rag^{-/-}, parece levar a uma eliminação de células agressivas específicas para o alergénio. No entanto, o uso de anti-CD4 *in vitro*, tal como a activação *in vitro* com baixas concentrações de antigénio, leva à indução de células Treg. Estes dados sugerem que a activação de células T em condições subóptimas conduz à indução de células Treg.

Os resultados mostram que o tratamento de modelos animais de asma alérgica com o anticorpo monoclonal não depletante anti-CD4 previne o desenvolvimento das manifestações de doença, características de uma resposta Th2 patológica. No entanto, embora se pudesse pensar, com base nos estudos *in vitro*, que esta prevenção se devesse à indução de tolerância pela conversão de células Treg Foxp3⁺, os resultados sugerem que o estado de tolerância se deve predominantemente à redução do número de células agressivas específicas para o alergénio.

Palavras-chave

Tolerância; Células T reguladoras; Anticorpos monoclonais; Eliminação de células agressivas; Alergia.

Abstract

The control of immune responses causing pathology (autoimmunity, allergy, transplant rejection) has been one of the main objectives of immunology. Despite recent advances, most current treatments still aim to downmodulate immunity and inflammation, rather than to re-establish the healthy state of immunological tolerance.

In recent years, animal studies have shown that a subpopulation of T cells named regulatory (Treg) can suppress antigen-specific immune responses leading to a state of tolerance. The balance between aggressive T cells and Treg has been implicated in the control of autoimmunity, allergy and transplant rejection.

The objective of this work is to test the hypothesis that treatment of an animal model of allergic airways disease with anti-CD4 monoclonal antibody will lead to tolerance through the induction of Foxp3⁺ Treg cells or, alternatively, through the elimination of aggressive allergen-specific cells.

Our results show that treatment with anti-CD4 monoclonal antibody of mouse models of allergic asthma, as well as treatment of DO11.10 Rag^{-/-} mice, seems to preferentially eliminate allergen-specific aggressive T cells. In addition, *in vitro* studies have shown that suboptimal T cell activation, either in the presence of the therapeutic monoclonal antibody or with low concentrations of allergen, leads to Treg induction. Our *in vivo* experiments demonstrate that treatment with anti-CD4 monoclonal antibody prevents the manifestations of allergic disease, typical of a pathologic Th2 response. Although we may thought that this amelioration of the disease would result from Treg conversion, our data suggest that the state of tolerance is primarily due to a reduction of the number of aggressive cells rather than Foxp3⁺ Treg cell induction.

Key-Words

Tolerance; Regulatory T cells; Monoclonal antibody; Elimination of aggressive cells; Allergy.

Índice

Agradecimentos	i
Resumo e Palavras –chave	ii
Abstract and Key-words	iii
Índice	iv
Introdução	1
<i>O sistema imunitário</i>	1
<i>Células T reguladoras naturais</i>	2
<i>Geração de células T reguladoras</i>	3
<i>Indução de tolerância dominante</i>	5
<i>Objectivos do trabalho</i>	6
Materiais e Métodos	7
<i>Animais</i>	7
<i>Sensibilização</i>	7
<i>Anticorpos e reagentes</i>	7
<i>Lavagem broncoalveolar (BAL)</i>	7
<i>Ensaio in-vitro</i>	8
<i>Quantificação de imunoglobulinas e citocinas</i>	8
<i>Histologia</i>	9
<i>Análise por citometria de fluxo</i>	9
<i>Marcação intracelular de citocinas</i>	9
<i>Análise estatística</i>	9
Resultados	10
<i>Bloqueio do co-receptor CD4 com mAb não depletante previne a sensibilização alérgica em ratinhos BALB/c</i>	10
<i>Bloqueio do co-receptor CD4 com mAb não depletante previne a sensibilização alérgica em ratinhos DO11.10</i>	11
<i>A activação in-vitro das células T em condições subóptimas leva à conversão de Treg</i> ...12	
<i>Bloqueio do co-receptor CD4 com mAb não depletante em animais DO11.10 Rag^{-/-} elimina células agressivas</i>	13

Figura 2.....	15
Figura 3	16
Figura 4	17
Figura 5	18
Figura 6	19
Figura 7	20
Discussão.....	21
Bibliografia.....	24
Anexos.....	I
Figura Suplementar 1.....	I
Figura Suplementar 2	II
Figura Suplementar 3	III

Introdução

O sistema imunitário

Todos os seres vivos estão continuamente expostos a agressões vindas do seu ambiente. Na maioria destes, o mecanismo de resposta a infecções e danos celulares fica a cargo da imunidade inata. A imunidade inata utiliza receptores codificados no genoma que reconhecem padrões moleculares comuns a diferentes patógenos¹. Os vertebrados superiores, para além da imunidade inata, possuem também imunidade adquirida. As células fundamentais da imunidade adquirida são os linfócitos. Os linfócitos B segregam anticorpos, os linfócitos T CD8⁺ ligam-se directamente às células alvos, matando-as através de granzimas e perforina, enquanto os linfócitos T CD4⁺ orquestram e mobilizam outras células para os seus alvos através da produção de citocinas^{2,3}.

Com base em ensaios funcionais e estudos de expressão proteica, as células T CD4⁺ foram inicialmente divididas em dois grupos, Th1 e Th2, desempenhando funções diferentes na defesa do organismo e segregando diferentes grupos de citocinas, para além das Th0 – células *naïves* precursoras não diferenciadas. As células Th1 caracterizam-se por expressarem o factor de transcrição T-bet, produzindo interferão gama (IFN- γ) e factor de necrose tumoral alfa (TNF- α). Desempenham um papel fundamental na estimulação da fagocitose e na defesa contra microorganismos intracelulares. As células Th2 expressam o factor de transcrição Gata-3 produzindo interleucina 4 (IL-4), IL-5 e IL-13 e têm um papel importante na defesa contra parasitas extracelulares^{2,3}. Recentemente, com a descoberta de células T CD4⁺ que produzem IL-17, sentiu-se a necessidade de alargar o grupo das células T auxiliares, designando-se estas últimas como Th17. Estas células caracterizam-se também por expressar um factor de transcrição específico – o ROR γ t – e são importantes na defesa contra bactérias extracelulares^{3,4,5}.

No entanto, os linfócitos, apesar da sua acção na defesa do organismo, podem ser também causadores de doenças, como a alergia e a autoimunidade. Enquanto as células Th1 e Th17 podem mediar doenças autoimunes e inflamatórias, as células Th2 estão associadas a alergia e asma³.

O controlo das repostas imunitárias patológicas tem sido um dos principais objectivos dos imunologistas. Nos últimos anos, um outro subtipo de células T CD4⁺ designadas células T reguladoras (Treg) tornou-se um dos principais alvos de investigação, uma vez que se revelou eficiente na prevenção de doenças de base imunológica e na manutenção do estado de tolerância imune, isto é, o estado em que o sistema imunitário não responde a antígenos⁶.

Células T reguladoras naturais

Durante a maturação dos linfócitos T no timo, os timócitos expressam uma grande diversidade de receptores de antígeno de células T (TCR). Apenas as células que expressam TCRs que reconhecem com moderada afinidade péptidos do próprio associados ao complexo maior de histocompatibilidade (MHC) se podem diferenciar em linfócitos maduros, num processo chamado de selecção positiva. As células cujos TCRs não se ligem ou ligem com demasiada afinidade são levadas à morte celular programada (morte por negligência ou por selecção negativa, respectivamente)⁷.

Durante a selecção tímica, forma-se uma subpopulação de células T reguladoras CD4⁺ que é altamente especializada na supressão das células T autorreactivas que escapam à selecção negativa. Uma deficiência nesta população (número ou função) leva ao aparecimento de doenças autoimunes e outras doenças inflamatórias em seres humanos e outros animais⁶. Esta população expressa constitutivamente o factor de transcrição *foxp3*, um gene chave no seu desenvolvimento e função⁸⁻¹⁰. A maioria das células Treg expressa também constitutivamente a molécula CD25 (cadeia α do receptor de IL-2)¹¹. No entanto, todas as células T expressam transitoriamente CD25 após a sua activação. Evidências sugerem que o CD25 não é apenas um marcador para o estado de activação crónica das Treg mas sim uma molécula crucial para a sua geração, sobrevivência e função⁶.

Em ratinhos deficientes em linfócitos, a transferência de uma suspensão de células T CD25⁻ leva ao aparecimento de várias doenças autoimunes enquanto que a transferência concomitante de células CD4⁺CD25⁺ previne o desenvolvimento destas doenças¹¹. Ratinhos deficientes em *Foxp3*, tal como os seres humanos com o mesmo defeito, são desprovidos de células Treg e desenvolvem doenças inflamatórias que os conduzem a morte prematura^{11,12}. Este síndrome pode ser prevenido, em animais experimentais, pela transferência de Treg de outros animais⁹ ou pela transdução retroviral de células CD4⁺CD25⁻ com *foxp3*⁸⁻¹⁰. Assim, a tolerância periférica ao próprio é mantida por células Treg CD4⁺CD25⁺*Foxp3*⁺ que suprimem activamente a activação e expansão de populações potencialmente patogénicas, reactivas contra o próprio, que se encontram normalmente presentes no sistema imunitário⁶.

As células transduzidas com *foxp3* deixam de produzir IL-2 (citocina que promove a proliferação das células T) mas passam a expressar moléculas associadas com as células Treg como o CD25, o CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*) e o GITR (*glucocorticoid-inducible tumor necrosis factor receptor family-related gene*)⁸. O *Foxp3* mostra assim ser um gene “mestre” do controlo do desenvolvimento e função das células Treg CD4⁺CD25⁺ naturais, indicando também que o desenvolvimento natural destas é em parte

geneticamente programado⁶. Nota-se também um paralelo com outras populações de células CD4⁺ como as Th1, Th2 e Th17 cuja diferenciação é controlada por um gene “mestre”, respectivamente T-bet, Gata-3 e ROR γ t.

Geração de células T reguladoras

Os animais com TCR transgênico e deficientes para o gene Rag são ideais para o estudo da geração de células Treg. Estes animais não conseguem produzir TCRs funcionais a partir dos seus genes e, como tal, todas as células T expressam apenas o transgene nelas inserido. O desenvolvimento no timo sem a presença de um ligando apropriado resulta numa população de células T exclusivamente Foxp3 negativas¹³. É assim possível seguir a conversão de células T CD4⁺Foxp3⁻ em células Treg sem haver interferência da expansão de Treg pré-existentes.

Vários laboratórios apresentaram resultados de indução de Treg sob condições “tolerogénicas”, utilizando diferentes modelos animais bem como diferentes técnicas de indução. Um modelo amplamente utilizado é o ratinho transgênico com TCR específico para ovalbumina (OVA) de galinha no fundo genético RAG^{-/-}. *In vitro* obteve-se a conversão de células T Foxp3⁻ em Foxp3⁺ pela adição de TGF- β (*transforming growth factor beta*) às culturas¹⁴ ou pela activação das células T com uma baixa concentração de péptido¹⁵. Neste último é de notar que as células B são melhores a promover esta conversão do que as células dendríticas (DC), as células apresentadoras de antígeno (APC) por excelência. É provável que o facto de as células B não serem capazes de fornecer toda a sinalização de co-estimulação e consequentemente uma activação tão potente quanto as DCs influencie esta observação¹⁵. *In vivo* é possível induzir tolerância oral a OVA, fornecendo-a na água de beber. Esta tolerância é acompanhada pela formação de células Foxp3⁺¹⁶. Recentemente, também neste modelo, foi descrito o papel do ácido retinoico (RA) na indução de células Foxp3⁺. Sendo um composto produzido por DCs, foi descrito que a adição de RA a culturas com TGF- β aumenta a percentagem e a estabilidade de células que são convertidas em Foxp3⁺¹⁷.

O modelo de TCR específico para antígenos específicos do macho em fundo genético de RAG^{-/-} foi utilizado para documentar o uso de anticorpos monoclonais (mAb – do inglês *monoclonal antibody*) na indução de células Treg em transplantes. Fêmeas de ratinho foram transplantadas com pele de machos singénicos e tratados com anti-CD4 ou anti-CD40L (CD154)^{18,19}. Em ambos os casos se observou a indução de tolerância ao transplante associada ao aparecimento de células Treg. *In vitro*, a estimulação com DCs na presença de anti-CD4

mAb levou à indução de células Treg que expressam Foxp3 tal como observado *in vivo*²⁰. Na mesma estirpe demonstrou-se que a exposição a um ligando peptídico alterado também leva à geração periférica de Treg e tolerância dominante ao transplante^{21,22}. Também neste modelo animal se verificou que o TGF- β é importante para a indução de Treg, tanto *in vivo* como *in vitro*, pois a indução das células Treg deixa de se verificar na presença de mAb neutralizante anti-TGF- β ²⁰.

Várias experiências *in vivo* confirmaram a importância da persistência do antígeno no sistema para a indução de Treg. Em ratinhos com o TCR transgénico para a Hemaglutinina (proteína expressa na cápside do vírus *Influenza*) esta persistência foi conseguida utilizando mini-bombas osmóticas de péptido (libertam pequenas quantidades de péptido em períodos de tempo pré-determinados)²³ ou o uso do anticorpo anti-DEC205 em fusão molecular com o péptido (esta fusão leva o péptido directamente às DCs e permite maior vida média em circulação)²⁴. No modelo de TCR específico para antígenos específicos do macho também se verifica a importância da persistência do antígeno. Neste modelo, células de fêmea foram transferidas para um macho Rag^{-/-} onde convivem permanentemente com o antígeno de macho para o qual são específicas²⁵.

A activação de células T CD4⁺ *naïve* com DCs imaturas, ou DCs expostas a reagentes que impedem a sua total maturação, parece também levar à indução de células reguladoras²⁵. Entre os reagentes que interferem com a maturação das DCs encontram-se a IL-10²⁶, 1 α ,25-dihidroxivitamina D3 (vitamina D3)²⁷ ou LF 15-0195²⁸.

Para além da população CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ foi também descrita uma população reguladora produtora de IL-10 e Foxp3⁻ que é designada de Tr1. Esta população forma-se na periferia com estimulação antigénica num meio rico em IL-10 e parece caracterizar-se pela expressão do factor de transcrição ROG²⁹.

Foi recentemente proposto que a indução periférica de Treg deverá depender das condições em que se dá a activação das células *naïve* à semelhança dos fenómenos que acontecem no timo³⁰. O reconhecimento do antígeno no timo com bastante avidéz leva à formação de Treg. No entanto, a partir de um limiar de activação, os timócitos sofrem selecção negativa e consequente indução de apoptose¹³. Na periferia, se uma célula T encontrar o antígeno num ambiente que promova a sua total activação, a célula será convertida num dos seus fenótipos agressivos para iniciar uma resposta imune. Se, pelo contrário, o ambiente for subóptimo para activação, então o fenótipo adquirido será regulador³⁰ (Figura 1A). De acordo com esta hipótese, uma baixa concentração de péptido, um ligando do péptido alterado, DCs imaturas

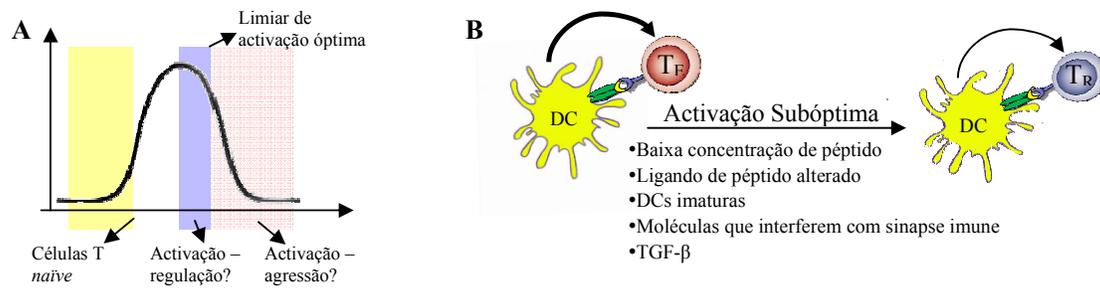


Figura 1: Activação subóptima para a indução periférica de células Treg. **(A)** A mesma célula com TCR transgénico pode ser periféricamente convertida num fenótipo agressivo (T_E) ou regulador (T_R) conforme a sua activação atinja o limiar crítico (limiar de activação). **(B)** A activação em diversas condições subóptimas pode levar ao diferenciamiento num fenótipo regulador $Foxp3^+$.

ou moléculas que interferem com a sinapse imune (como os mAbs α -CD4 e α -CD40L) são factores que contribuem para uma activação subóptima e consequente formação de Treg³⁰ (Figura 1B).

O papel do TGF- β na conversão de Treg pode dever-se a aumentar o limiar de activação das células T através da cascata Ca^{2+} -Calcineurina-NFAT^{31,32}. A adição de TGF- β inibe o influxo de cálcio levando a uma hipo-reatividade à estimulação. O *knock-out* do gene do TGF- β , *Tgfb1* tem o efeito contrário (aumento do influxo de cálcio e hiper-reatividade)^{31,33}.

Indução de tolerância dominante

Entende-se por tolerância dominante o estado em que a tolerância imune é activamente mantida⁶. Este estado está associado, tal como a sua manutenção, à acção de células T reguladoras geradas pelos vários processos acima descritos.

Este estado de tolerância dominante é qualitativamente diferente do estado de tolerância induzido em transplantes após o desenvolvimento de quimerismo hematopoiético misto (quando células hematopoiéticas do dador e do receptor coexistem após transplante de medula óssea)³⁴. Quando é utilizada medula óssea para induzir tolerância a órgãos, o estado de tolerância resultante é recessivo, resultando da eliminação de células aloreactivas e não da expansão de células reguladoras³⁴. Noutros estudos verificou-se também que a tolerância dominante depende do balanço entre Treg e agressivas, sendo essencial na sua indução não só a expansão de células Treg mas também a eliminação de células agressivas^{35,36}.

Objectivos do trabalho

Este trabalho tem como objectivo testar a hipótese de que o tratamento de um modelo animal de asma alérgica com a administração de anticorpo monoclonal não depletante anti-CD4, conduz a um estado de tolerância através da indução de células Treg Foxp3⁺, ou em alternativa pela eliminação de células agressivas.

Foram utilizados como modelos animais, ratinhos BALB/c em que apenas uma ínfima percentagem das células responderá ao alergénio (OVA), e ratinhos DO11.10 em que a maioria das células CD4⁺ tem um TCR transgénico específico para um péptido da OVA.

Utilizaram-se também animais DO11.10 Rag^{-/-} onde todas as suas células T CD4⁺ têm o receptor transgénico, não tendo células Treg, CD8⁺ ou B. Consequentemente, não desenvolvem manifestações alérgicas por não produzirem anticorpos. No entanto, são úteis para ensaios *in vitro* e *in vivo* onde se avalia o impacto da administração de mAb anti-CD4 não depletante na indução de células Treg CD4⁺ Foxp3⁺.

Materiais e Métodos

Animais

Colônias de ratinhos DO11.10.Rag1^{-/-}, DO11.10 e BALB/c foram mantidas em condições livres de patógenos (SPF) no biotério do Instituto Gulbenkian de Ciência. Os animais foram utilizados entre as 6 e as 8 semanas de vida.

Sensibilização

Cada animal recebeu, de acordo com o protocolo descrito no texto, por injeção intra peritoneal (i.p.) uma solução de 20 µg (BALB/c e DO11.10.Rag1^{-/-}) ou 10 µg (DO11.10) de albumina do ovo (OVA, grade V; Sigma, St Louis, EUA), cujos vestígios de endotoxina foram removidos com uma coluna DetoxGel (Pierce, Rockford, EUA), suspensa em 2.0 mg de hidróxido de alumínio livre de endotoxina (Alu-gel-S, Serva, Heidelberg, Alemanha). A re-exposição intra-nasal ao alergénio foi feita com 50 µg de OVA em solução salina livre de patógenos, em três dias consecutivos, e o sacrifício feito 24 horas após a última re-exposição.

Anticorpos e reagentes

O anticorpo monoclonal anti-CD4 (YTS177) não depletante³⁷ foi purificado a partir do sobrenadante das células do hibridoma expandido em caixas Integra CL1000 (IBS, Chur, Suíça). A purificação foi levada a cabo por precipitação com 50% de sulfato de amónio, dialisado contra PBS, e a pureza e integridade das cadeias leve e pesada analisada por gel de electroforese SDS. O hibridoma foi gentilmente cedido pelo Professor Herman Waldmann (Oxford, Reino Unido). O péptido de OVA 323-339 (H2N-ISQAVHAAHAEINEAGR-OH) foi sintetizado e purificado por HPLC (New England peptide LLC, Gardner, MA, EUA). O TGF-β1 humano recombinante (também reconhecido pelos receptores de TGF-β murínicos) foi comprado à R&D Systems (Miniápolis, MN, EUA).

Lavagem broncoalveolar (BAL)

As vias respiratórias foram suavemente lavadas 3 vezes através da traqueia com 1 ml de PBS frio com 10% BSA (Sigma). O BAL foi centrifugado a 1200rpm durante 5 minutos, o sobrenadante recolhido e as células ressuspensas em PBS com 10% BSA. As células foram contadas num hemacitómetro e diluídas para 4×10⁴ por ml, procedendo-se ao cytopspin das mesmas numa centrífuga Cytospin2 Shandon (Shandon Southern Products, Reino Unido). A contagem diferencial de células foi realizada em amostras de *cytopspin* coradas com Giemsa-Wright (Sigma). Pelo menos 200 células de cada amostra foram contadas para determinar a frequência relativa de cada tipo celular.

Ensaio in-vitro

Para determinar as respostas de células T de animais DO11.10.Rag^{-/-}, esplenócitos destes animais foram suspensos em PBS com 2% de FBS e separados utilizando *CD4⁺ T cell isolation kit* (MACS, Miltenyi Biotec, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. Posteriormente foram colocados a 2×10^4 células/200 μ l por poço em meio RPMI 1640 com 10% FCS. Células dendríticas derivadas de medula óssea de BALB/c (geradas em cultura de 7 dias com GM-CSF murino recombinante³⁸) foram utilizadas como estimuladoras (2×10^4 células/200 μ l poço). Péptido de OVA 323-339, anti-CD4 mAb ou rTGF- β foram adicionados às culturas como especificado no texto. Depois de 7 dias, as culturas foram recuperadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo.

Foram também montadas culturas com estimulação de antigénio utilizando os mAbs anti-CD3 (145-2C11; BD Pharmingen, San Diego, EUA) e anti-CD28 (37.51; eBioscience, San Diego, CA, EUA). Placas de 96 poços foram incubadas durante 3 horas com diferentes proporções (descritas no texto) de anti-CD3 e controlo de isotipo anti-CD4 canino (YKIX302)³⁹ numa concentração final de 3 μ g/ml. Após lavagem das placas com PBS, células CD4⁺ de animais DO11.10.Rag^{-/-}, isoladas como descrito acima, foram colocadas a 5×10^4 células/200 μ l por poço em meio RPMI 1640 com 10% FCS. anti-CD28 foi adicionado a todos os poços à concentração final de 2 μ g/ml e rTGF- β foi adicionado a alguns poços à concentração final de 5 ng/ml. Depois de 3 ou 7 dias, as culturas foram recuperadas, marcadas e analisadas por citometria de fluxo.

Quantificação de imunoglobulinas e citocinas

Os níveis de IgG1 e IgE específicas para OVA no soro foram determinados por ELISA utilizando: IgG1 (SouthernBiotech, Birmingham, EUA) com standard IgG1 anti-OVA (Serotec, Oxford, Reino Unido); IgE Opteia kit (BD Pharmingen) com standard IgE anti-OVA (Abcam, Cambridge, Reino Unido).

Foi efectuada a quantificação de citocinas em homogenatos de pulmão recém colhidos. O tecido pulmonar foi recolhido, homogeneizado a 100 mg/ml em HBSS (Gibco, Carlsbad, EUA), centrifugado a 800g durante 10 minutos e utilizou-se o sobrenadante puro para os ensaios de ELISA. Os ELISAs para citocinas foram executados utilizando os kits: IL-10, IL-13, TNF- α e IFN- γ (Peprotech, Londres, Reino Unido); IL4 e IL-5 Opteia (BD Pharmingen) seguindo as instruções dos fabricantes.

Histologia

Os pulmões foram perfundidos com uma solução de formalina a 4% (Sigma), recolhidos e seccionados. Para a coloração utilizou-se hematoxilina/eosina e as células produtoras de muco foram reveladas utilizando a marcação de ácido periódico-Schiff (PAS). As fotografias foram tiradas utilizando o microscópio Leica DM2500 e a câmara Leica DFC420.

Análise por citometria de fluxo

As células foram marcadas para análise por citometria de fluxo com CD25-Alexa488 (PC61; produzido e conjugado *in house*) e o mAb específico para o TCR de DO11.10 KJ1-26-PE (BD Pharmingen). Para bloquear os receptores Fc foi usado o mAb 2.4G2 a 10 µg/ml (produzido *in house*). As células foram lavadas em PBS com 0,01% de NaN₃, 2% de soro fetal bovino (FBS, Gibco), fixadas, permeabilizadas e marcadas usando o *Set Foxp3-APC* (FJK-16s; eBioscience). A aquisição de células foi obtida utilizando os citômetros FACSCalibur e FACSCanto (BD Biosciences) ambos com dois lasers de excitação (488nm e 633nm). A análise dos resultados foi feita nos softwares BD CellQuest e BD FACSDiva (BD Biosciences) respectivamente. Uma *região* de análise foi colocada em *forward* e *side scatters* para eliminar células inviáveis.

Marcação intracelular de citocinas

Células dos gânglios linfáticos do mediastino recém colhidas foram estimulados durante uma hora com 50 ng/ml de PMA e 500 ng/ml Ionomicina (Sigma) em RPMI com 10% FCS. Adicionou-se depois Brefeldina A (Sigma) durante duas horas. As células foram marcadas com CD25-PE-Cy7 (PC61.5; eBioscience) e KJ1-26-Streptavidina (eBioscience) e Biotina-PerCP (BD Pharmingen). As células seguiram o mesmo procedimento descrito anteriormente para citometria de fluxo, sendo marcadas intracelularmente com Foxp3-APC (FJK-16s; eBioscience), IFN-γ-FITC e IL-10-PE (XMG1.2 e JES5-16E3 respectivamente; BD Pharmingen) ou IL-4-FITC e IL-17A-PE (BVD6-24G2 e eBio17B7 respectivamente; eBioscience). A análise foi realizada por citometria de fluxo como descrito.

Análise estatística

A significância estatística foi determinada usando o teste não-paramétrico T de Student de duas-caudas (Mann-Whitney) e a análise de correlação utilizando o teste de Spearman. A análise estatística foi realizada utilizando o Prism 4.0 (GraphPad, San Diego, EUA) e valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos (*, $P < 0,05$; **, $P < 0,01$; ***, $P < 0,001$).

Resultados

Bloqueio do co-receptor CD4 com mAb não depletante previne a sensibilização alérgica em ratinhos BALB/c.

Utilizando um modelo animal bem estabelecido para alergia^{40,41}, mostrou-se que o anticorpo monoclonal não depletante cujo alvo é a molécula CD4, co-receptor das células T, é eficiente na prevenção da sensibilização alérgica.

Fêmeas BALB/c foram sensibilizadas com duas injeções i.p. de OVA-alum nos dias 1 e 14 e re-expostas intra-nasalmente com 50 µg OVA nos dias 20, 21 e 22 (Figura 2A). O grupo de animais tratados foi injectado com 1 mg i.p. de anti-CD4 um dia antes e um dia depois de cada administração de OVA-alum. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última re-exposição intra-nasal.

Os animais tratados com anti-CD4 têm uma redução de cerca de 1000 vezes no número de eosinófilos do BAL quando comparados com os animais sensibilizados (n=5, $P < 0,05$, Figura 2B). A ausência de infiltrado inflamatório nas vias respiratórias em animais tratados com anti-CD4 foi também confirmada por histologia (Figura suplementar 1). A coloração PAS das células produtoras de muco revelou um aumento destas células nos animais sensibilizados que não se verifica nos animais tratados (Figura suplementar 1). O tratamento também previne a formação de imunoglobulina (Ig) E total e IgG1 específica para OVA, ambas características de uma resposta Th2 (n=5, $P < 0,001$, Figura 2C). O tratamento não induz um desvio para a produção de IgG2a, que depende da resposta Th1, não detectada em qualquer grupo de animais (não mostrado). A concentração de citocinas em homogenato de pulmão (figura 2D) mostra que o tratamento com anti-CD4 causa uma redução das citocinas típicas de uma resposta Th2 nos animais tratados (n=5, $P < 0,01$ para a IL-4; $P < 0,001$ para a IL-13) para níveis semelhantes aos observados em animais *naïve*. O aumento da IL-5 não é estatisticamente significativo. É importante notar que não há uma mudança para um padrão Th1 uma vez que as citocinas IFN- γ e TNF- α apresentam valores semelhantes nos animais sensibilizados e nos animais tratados. Em relação à IL-10, o aumento nos animais sensibilizados e diminuição nos tratados é surpreendente e nunca verificada noutras repetições do trabalho.

Em relação aos gânglios linfáticos do mediastino, há um aumento do número de células totais nos animais sensibilizados que diminui nos animais tratados com anti-CD4, embora o número de células totais em animais tratados com anti-CD4 seja superior ao número de células de animais *naïve*. Este aumento do número total de células é acompanhado pelo

aumento do número absoluto de células Foxp3⁺ nos animais sensibilizados. Quando tratados com anti-CD4 os animais apresentam uma redução das células Foxp3⁺ também para níveis quase basais (Figura 2E). Relacionando o número total de células e o número de células Foxp3⁺ observa-se uma diminuição da percentagem de células Foxp3⁺ nos animais tratados em relação aos sensibilizados e destes em relação aos *naïve* (Figura 2E). A análise de citocinas intracelulares nestas células revela um pequeno aumento na IL-10 e no IFN- γ nos animais tratados, enquanto a IL-4 e a IL-17A parecem manter-se na mesma percentagem nos animais tratados e sensibilizados (Figura suplementar 2). No entanto estes valores são pequenos em todos os casos, e o seu significado biológico questionável.

Bloqueio do co-receptor CD4 com mAb não depletante previne a sensibilização alérgica em ratinhos DO11.10.

Machos DO11.10 foram sensibilizados com uma injeção i.p. de 10 μ g OVA-alum no dia 1 e re-expostos intra-nasalmente com 50 μ g OVA nos dias 5, 6 e 7 (Figura 3A). O grupo de animais tratados foi injectado com 1 mg i.p. de anti-CD4 um dia antes e um dia depois da administração de OVA-alum. Os animais foram sacrificados 24 horas após a última re-exposição intra-nasal.

Os animais tratados com anti-CD4 têm uma diminuição do número de eosinófilos cerca de 100 vezes, assim como uma redução no número de linfócitos. A ausência de infiltrado inflamatório nas vias respiratórias em animais tratados com anti-CD4 foi também confirmada por histologia (Figura suplementar 3). A coloração PAS das células produtoras de muco revelou um aumento destas células nos animais sensibilizados que não se verifica nos animais tratados (Figura suplementar 3). Em relação às imunoglobulinas, não se verificam diferenças significativas entre os dois grupos, provavelmente porque ao fim de 7 dias não houve tempo de ocorrer a mudança de isotipo após a ocorrência do centro germinal⁴² (Figura 3C). Em relação às citocinas do homogenato de pulmão, verifica-se uma diminuição nas citocinas típicas de Th2: IL-13, IL-4 e IL-5 nos animais tratados (Figura 3D, n=4, $P < 0,01$ para IL-4 e IL-5; $P < 0,001$ para IL-13). Mais uma vez parece não haver uma mudança para Th1 uma vez que as diferenças observadas para INF- γ não são estatisticamente significativas. Em relação à citocina IL-10, mais uma vez se verifica uma diminuição do grupo dos sensibilizados para o grupo dos tratados.

As células dos gânglios linfáticos do mediastino apresentam um padrão semelhante ao encontrado nos animais BALB/c. Apesar de em termos de percentagem não haver grandes

diferenças entre o número de células que expressam Foxp3, em termos absolutos nota-se um decréscimo significativo no número de células dos animais tratados, tanto células Foxp3⁺ como células Foxp3⁻ (Figura 3E e 3F). Verifica-se que a grande maioria das células que expressam Foxp3 também expressam a molécula CD25 (Figura 3F).

A activação in-vitro das células T em condições subóptimas leva à conversão de Treg.

Para testar a hipótese de que o mecanismo de acção do mAbs está relacionado com a indução de Treg, desenhou-se um ensaio *in vitro* para monitorizar a conversão de células T *naïves* específicas para OVA em células Treg. Para isto foram usadas células de animais DO11.10 Rag^{-/-} que, como descrito anteriormente, não conseguem rearranjar os genes endógenos do TCR e como tal não possuem células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺. Todas as células T destes animais reconhecem o péptido de OVA 323-339 no contexto de H-2^d.

Células CD4⁺ de DO11.10 Rag^{-/-} foram estimuladas com DCs derivadas de medula óssea singénica e diferentes concentrações de péptido. Observou-se que a activação das células T na presença do mAb anti-CD4 não depletante leva à conversão de células T *naïve* em células Treg Foxp3⁺. Esta conversão está inversamente correlacionada com o nível de activação das células T, o que suporta a hipótese de que a indução periférica de Treg necessita de uma estimulação antigénica subóptima (Figura 4A). A activação na presença de concentrações sucessivamente mais baixas de péptido ou sucessivamente maiores de mAb anti-CD4 não depletante leva a uma diminuição da intensidade média de fluorescência (MFI) de CD25 e um aumento da frequência de células Foxp3⁺ (Figura 4A). No entanto, mesmo nestas condições subóptimas de activação, as células que expressam Foxp3 também expressam CD25, o que sugere uma interacção produtiva com uma DC (Figura 4 D).

Foi demonstrado anteriormente que a adição de TGF-β a culturas de células T é capaz de induzir a conversão de células T *naïve* em células Treg^{14,15}. A adição de 5 ng/ml de rTGF-β à cultura *in vitro* altera o padrão de conversão de Treg (Figura 4B). As condições subóptimas que na ausência de TGF-β exógeno eram as mais eficientes para a conversão de Treg (Figura 4A), com a adição de rTGF-β às culturas deixam de ser as mais favoráveis. No entanto, o TGF-β endógeno parece ser importante para a conversão de Treg, já que a neutralização desta citocina leva a uma diminuição da percentagem de células convertidas em condições subóptimas onde rTGF-β não é adicionado à cultura (Figura 4C e 4D).

A adição de rTGF-β tem um impacto maior no aumento da eficiência de conversão de Treg em condições óptimas de estimulação. Foram desenhadas culturas *in vitro* utilizando como

estimulação para as células CD4⁺ anti-CD3 ligado às placas e anti-CD28 solúvel. Diluiu-se sucessivamente o anti-CD3 em controlo de isotipo (YKIX) às razões de 1:0, 1:1, 1:9, 1:99 e 0:1 para uma concentração final de 3 µg/ml e utilizou-se o anti-CD28 à concentração de 2 µg/ml. As culturas foram deixadas 3 e 7 dias com 5 ng/ml de rTGF-β e 3 dias com e sem rTGF-β. Verificou-se que em condições óptimas de activação (100% e 50% de anti-CD3) e na presença de rTGF-β há uma conversão de 20 a 50% das células em Foxp3⁺ (Figura 5A e 5C). No entanto, quando as condições deixam de ser as ideais, deixa de ser verificar esta conversão. É de notar que apesar do pico de conversão, na presença de rTGF-β, para a maior concentração de anti-CD3 se verificar ao dia 3, para as duas condições seguintes de diluição do anti-CD3 existe maior conversão ao dia 7 (Figura 5A e 5B). Com apenas 1% e 0% de anti-CD3 não se observa conversão na presença de rTGF-β tanto ao fim de 3 como ao fim de 7 dias (Figura 5A).

Observa-se que na ausência de rTGF-β, em condições óptimas (100% anti-CD3), não há conversão de células *naïve* em células Foxp3⁺. No entanto, quando estas condições deixam de ser as ideais (50% e 10% anti-CD3), e mimetizando o que se observa com o péptido, na ausência de TGF-β verifica-se conversão ao nível que se encontrava nas culturas com péptido (Figura 5C e 5D).

Bloqueio do co-receptor CD4 com mAb não depletante em animais DO11.10 Rag^{-/-} elimina células agressivas.

Uma vez que se observa a indução de células Treg *in vitro* utilizando mAbs, foram desenhadas 3 experiências *in vivo* para testar a hipótese de que os mAbs induzem Treg *in vivo* em animais DO11.10 Rag^{-/-}.

Animais DO11.10 Rag^{-/-} foram sensibilizados com uma injeção i.p. de 20 µg OVA-alum nos dias 1, 3 e 5 e nos mesmos dias alguns animais foram tratados com uma injeção i.p. de 500 µg de anti-CD4 (Figura 6A). Os baços e gânglios linfáticos mesentéricos foram recolhidos ao dia 12 e analisados por citometria de fluxo. Apesar de não haver indução de células T Foxp3⁺ (Figura 6C), houve uma diminuição na percentagem de células que expressam o marcador celular KJ1-26, isto é, células T CD4⁺ com um TCR específico para OVA (Figura 6B, n=5, *P* < 0,01).

Pensando-se que a sensibilização teria sido realizada com uma dose demasiado elevada de OVA, duas novas experiências foram desenhadas. Uma das experiências tentou reproduzir o que se passou nas culturas *in vitro*. DCs foram pulsadas durante 24 horas com 0,01 µM de

péptido e de seguida injectadas i.p. nos animais aos dias 1, 5 e 10. Foi injectado o maior número de células recuperadas (Figura 7A). Nos mesmos dias de injeção das células, um grupo de animais foi também injectado i.p. com 500 µg de mAb não depletante anti-CD4. Ao fim de 14 dias foram recolhidos os baços e os gânglios linfáticos mesentéricos. Verificou-se que apesar de nos gânglios linfáticos mesentéricos não haver diferença na percentagem de células que expressam Foxp3⁺, no baço nota-se alguma diferença (Figura 7C). No entanto, estas percentagens são muito baixas considerando percentagens obtidas com outros procedimentos. Em relação ao número de células agressivas, a percentagem destas diminuiu nos animais tratados com anti-CD4 em relação aos animais sensibilizados com OVA, tanto nos gânglios linfáticos mesentéricos como no baço (Figura 7B, n=4, P <0,05).

A terceira experiência *in vivo* com os animais DO11.10 Rag^{-/-} tentou reproduzir o procedimento realizado com os ratinhos DO11.10. Os animais foram sensibilizados com 20 µg de OVA-alum no dia 1 e um grupo de animais recebeu no dia imediatamente anterior e posterior e no dia 4 uma injeção de 500 µg de mAb não depletante anti-CD4. Os órgãos (baço e gânglios linfáticos mesentéricos) foram recolhidos e analisados por citometria de fluxo ao dia 7 (Figura 7D). Apesar de não haver indução de células T reguladoras Foxp3⁺ (Figura 7F) ao fim de 7 dias, verifica-se que nos gânglios linfáticos mesentéricos existe uma redução da frequência de células CD4⁺ agressivas (n=5, P < 0,01) que não se verifica nos células do baço (Figura 7E).

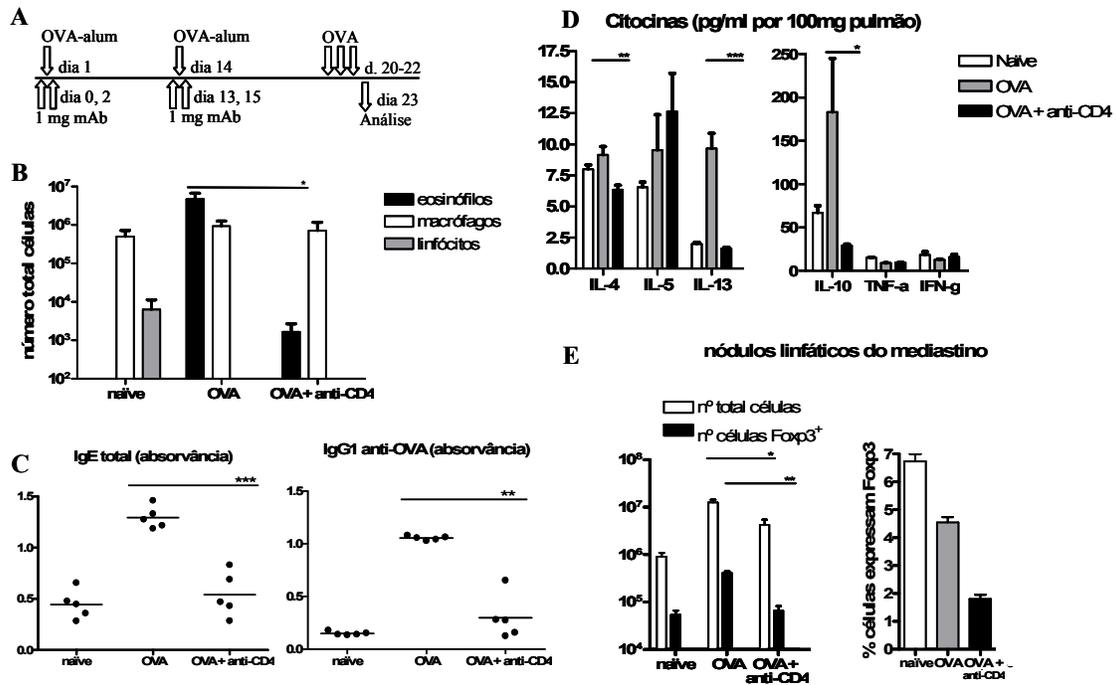


Figura 2: Prevenção da sensibilização alérgica em ratinhos BALB/c utilizando mAb anti-CD4. **(A)** Fêmeas BALB/c foram sensibilizadas com 20 µg OVA-alum i.p. e re-expostas intra-nasalmente com 50 µg OVA em soro fisiológico nos dias indicados. Alguns animais foram tratados com 1mg de mAb i.p. como descrito. **(B)** Composição celular do BAL. Animais tratados com anti-CD4 têm cerca de 1000 vezes menos eosinófilos no BAL (n=5, $P < 0,05$). **(C)** Quantificação de IgE total e IgG1 específica para OVA no soro, realizado por ELISA. Os animais tratados com anti-CD4 revelam uma redução significativa das imunoglobulinas típicas de respostas imunes Th2. **(D)** As citocinas de Th2 IL-13 (n=5, $P < 0,001$) e IL-4 (n=5, $P < 0,01$) bem como a IL-10 estão reduzidas aos níveis basais nos homogenatos de pulmão dos animais tratados com anti-CD4. Não se observaram alterações significativas aos níveis de IL-5, IFN- γ e TNF- α . **(E)** Número de células totais e CD4⁺ Fc γ 3⁺ nos gânglios linfáticos do mediastino dos animais tratados com anti-CD4 diminui para o nível dos animais saudáveis.

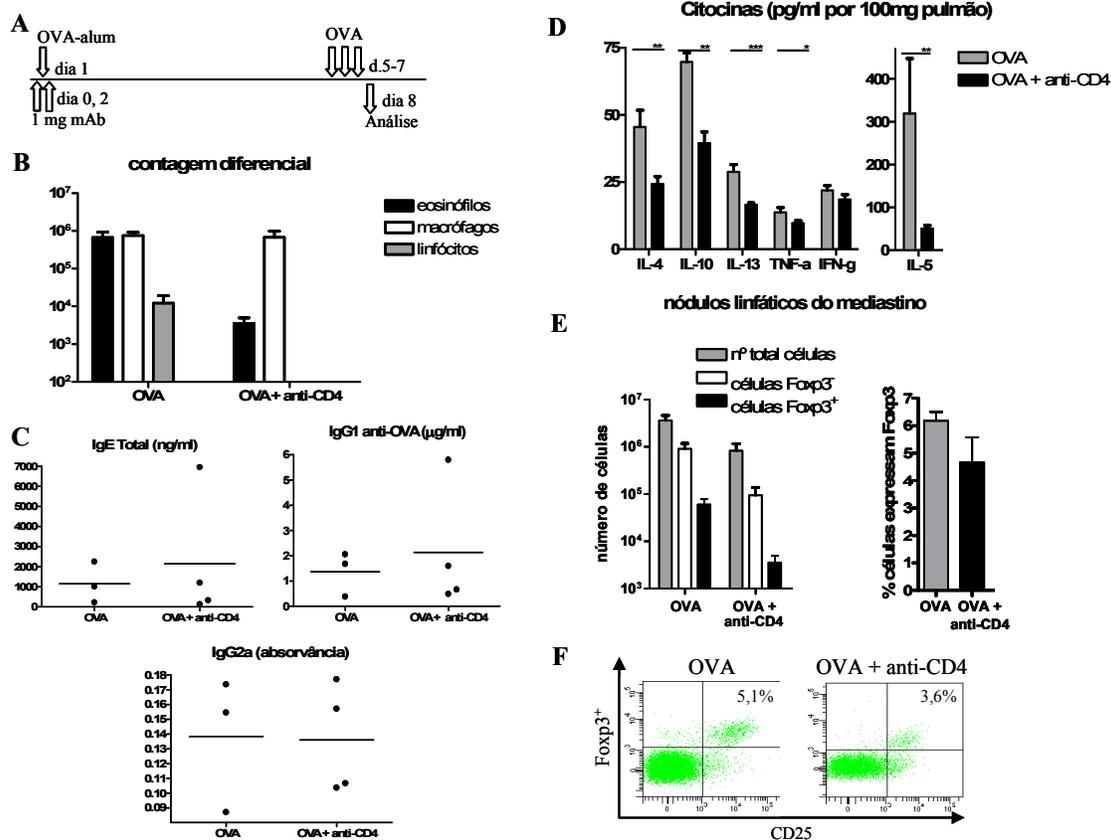


Figura 3: Prevenção da sensibilização alérgica em ratinhos DO11.10 utilizando mAb anti-CD4. **(A)** Machos DO11.10 foram sensibilizados com 10 μ g OVA-alum i.p. e re-expostos intra-nasalmente com 50 μ g OVA em soro fisiológico nos dias indicados. Alguns animais foram tratados com 1mg de mAb i.p. como descrito. **(B)** Composição celular do BAL. Animais tratados com anti-CD4 têm cerca de 100 vezes menos eosinófilos no BAL. **(C)** Quantificação de IgE total, IgG1 e IgG2a específica para OVA no soro, realizado por ELISA. Não se observam diferenças estatisticamente significativas. **(D)** Não foram observadas diferenças no nível de IFN- γ e uma pequena diminuição no nível de TNF- α nos homogenatos de pulmão de animais sensibilizados (cinzento), animais tratados com anti-CD4 (preto). As citocinas de Th2: IL-13 (n=4, $P < 0,001$), IL-5 e IL-4 (n=4, $P < 0,01$) foram reduzidas. Observou-se uma diminuição da citocina IL-10 nos animais tratados. **(E)** O número de células totais, KJ1-16⁺ Foxp3⁺ e KJ1-16⁺ Foxp3⁻ nos gânglios linfáticos do mediastino dos animais tratados diminuiu em relação aos animais sensibilizados. **(F)** Gráficos de citometria de fluxo representativos da expressão de Foxp3 em animais alérgicos (gráfico da esquerda) e tratados com anti-CD4 (gráfico da direita). A grande maioria das células que expressam Foxp3 são CD25⁺.

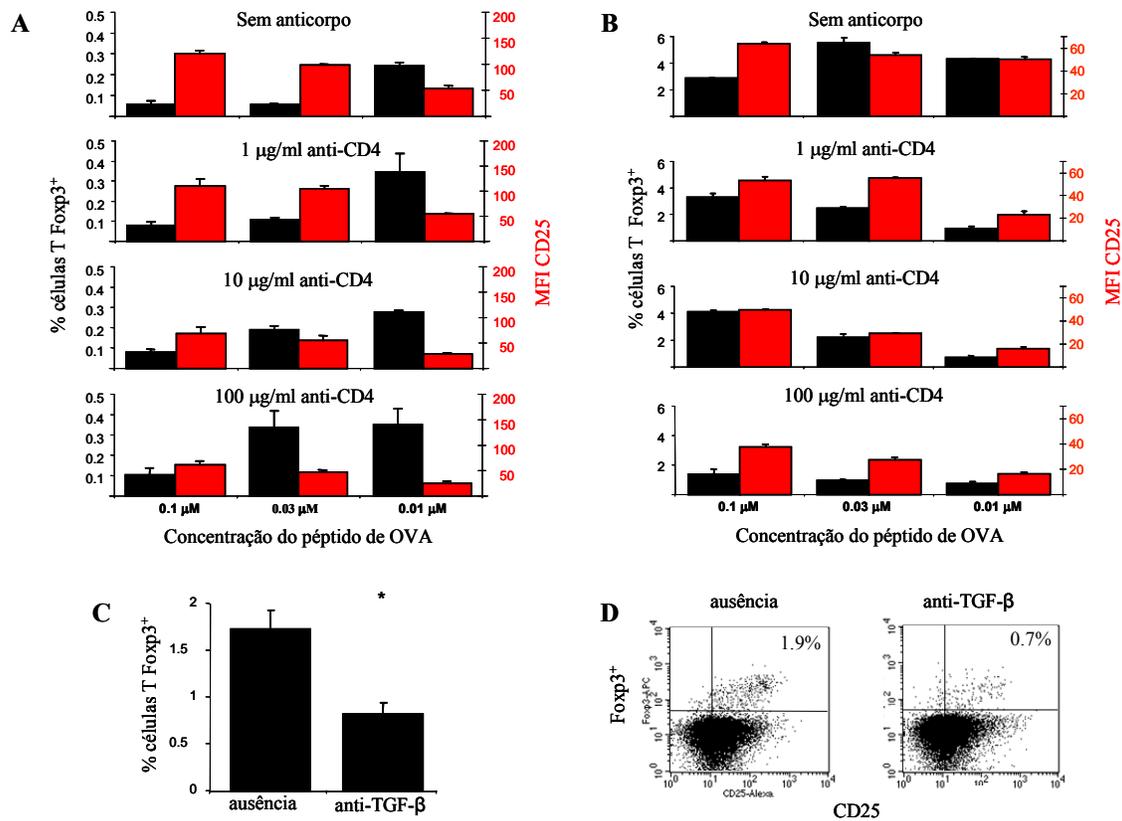


Figura 4: Anti-CD4 impede a activação óptima de células T levando à indução de células Treg Fop3⁺. **(A)** Células CD4⁺ de ratinhos DO11.10 Rag^{-/-} (2x10⁴/poço) foram incubadas 7 dias com igual número de DCs derivadas de medula óssea singénica na presença das concentrações indicadas de péptido 323-339 de OVA e de anti-CD4 não depletante. As barras e escala pretas representam a frequência de células Fop3⁺ determinadas por citometria de fluxo. As barras e escala vermelhas representam a intensidade média de fluorescência (MFI) de CD25. Existe uma correlação inversa entre MFI de CD25 e frequência de células Fop3⁺ (R= -0,877, P <0,001). Os dados são representativos de duas experiências independentes com triplicados para cada condição. **(B)** As mesmas condições mas com a adição de 5 ng/ml de rTGF-β a cada poço. **(C)** Estimulação durante 7 dias com 0,03 μM de péptido de OVA e 10 μg/ml de anti-CD4 na presença ou ausência de 100 μg/ml de mAb neutralizante anti-TGF-β (n=3, P <0,03) **(D)** Gráficos de citometria de fluxo representativos da mesma experiência.

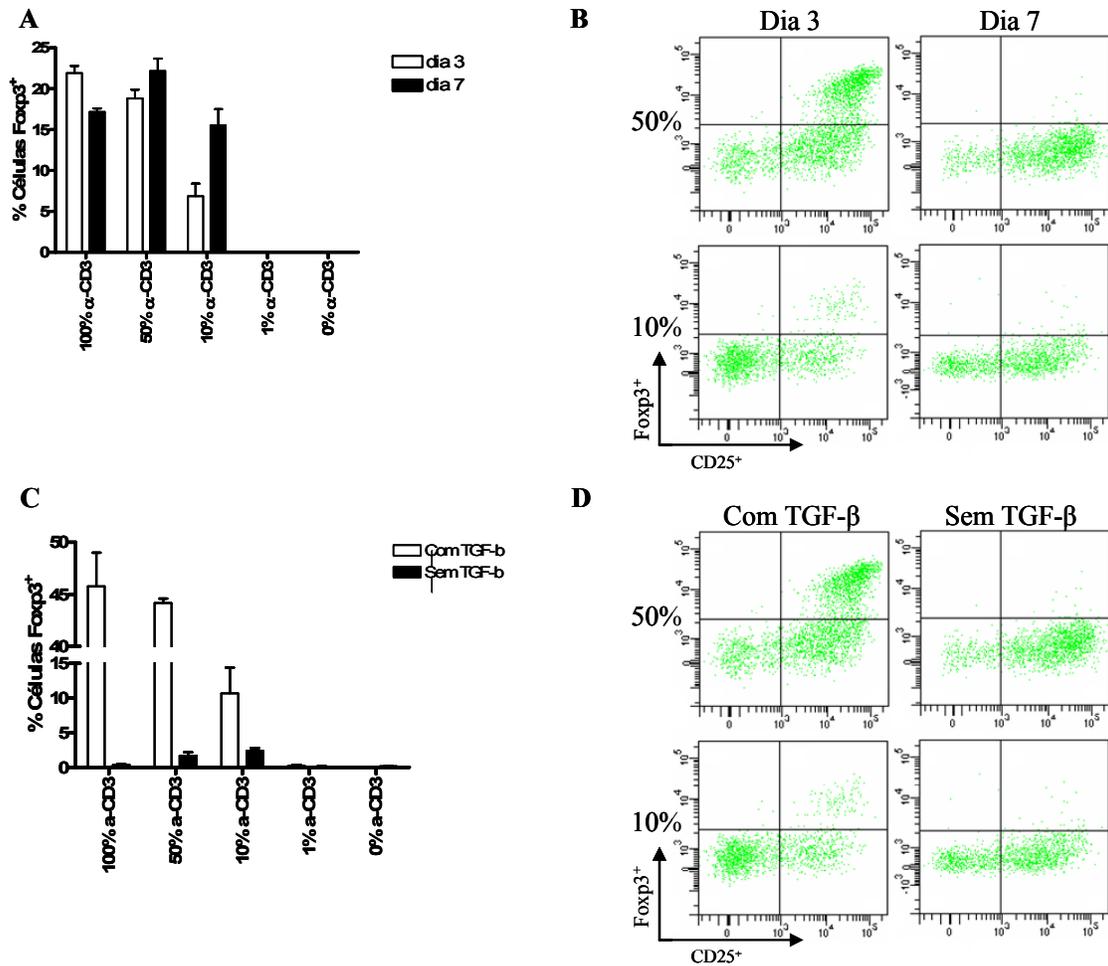


Figura 5: A activação subóptima de células T conduz à indução de células Treg Fop3⁺. **(A)** Células CD4⁺ de ratinhos DO11.10 Rag^{-/-} (5x10⁴/poço) foram incubadas 3 e 7 dias com 2 µg/ml de anti-CD28 e diferentes diluições de anti-CD3 em controlo de isotipo às razões de 1:0, 1:1, 1:9, 1:99 e 0:1 para uma concentração final de 3 µg/ml. Foi adicionado 5 ng/ml de rTGF-β. Condições óptimas de activação (100% anti-CD3) induzem o pico de células Fop3⁺ ao fim de 3 dias, mas condições subóptimas (particularmente 10% anti-CD3) o valor mais elevado é no dia 7. **(B)** Gráficos de citometria de fluxo representativos do dia 3 (esquerda) e dia 7 (direita) com 50% de anti-CD3 (em cima) e 10% de anti-CD3 (em baixo). **(C)** O mesmo tipo de cultura, com estimulação por 3 dias na presença (barra branca) ou ausência (barra preta) de 5 ng/ml de rTGF-β. Em condições subóptimas (50% e 10% anti-CD3) sem rTGF-β observa-se a conversão de células Treg. **(D)** Gráficos de citometria de fluxo representativos do dia 3 com rTGF-β (esquerda) e dia 3 sem rTGF-β (direita) com 50% de anti-CD3 (em cima) e 10% de anti-CD3 (em baixo).

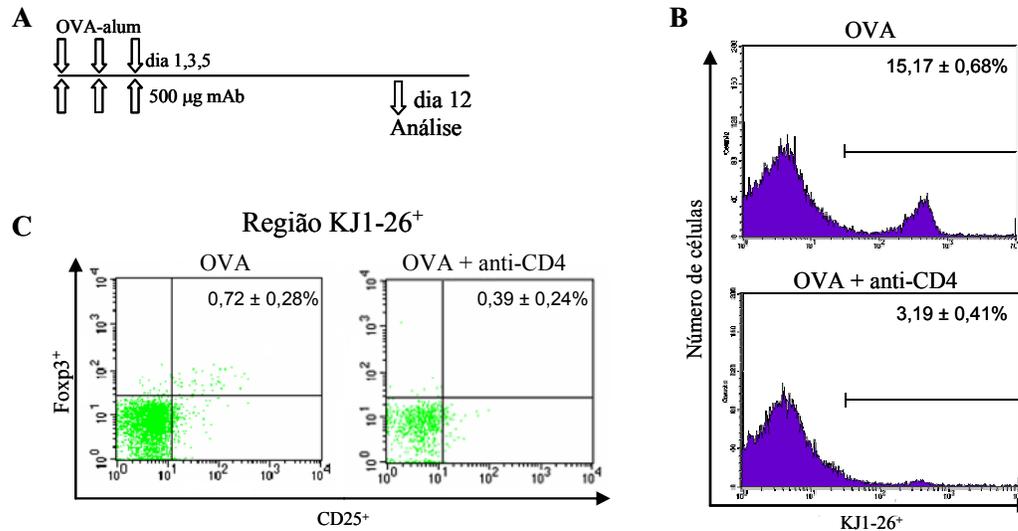


Figura 6: Sensibilização na presença de anti-CD4 leva à redução de células agressivas em ratinhos DO11.10 Rag^{-/-}. **(A)** Ratinhos DO11.10 Rag^{-/-} foram sensibilizados em 3 dias não consecutivos com 20 µg de OVA-alum. Nos mesmos dias de sensibilização um grupo de animais recebeu uma injeção de 500 µg de mAb não depletante anti-CD4. Os baços e gânglios linfáticos mesentéricos foram recolhidos no dia 12 e analisados por citometria de fluxo. **(B)** Gráficos de citometria de fluxo representativos da diminuição da percentagem de células específicas para OVA nos animais tratados com anti-CD4 (cerca de 3% das células são KJ1-26⁺) em relação aos animais sensibilizados (cerca de 15% das células totais são KJ1-26⁺) (n=5, *P* < 0,01). **(C)** Gráficos de citometria de fluxo da percentagem de células T Foxp3⁺ nos grupos descritos anteriormente. Não existe uma população clara de células Foxp3⁺ em nenhum dos dois grupos.

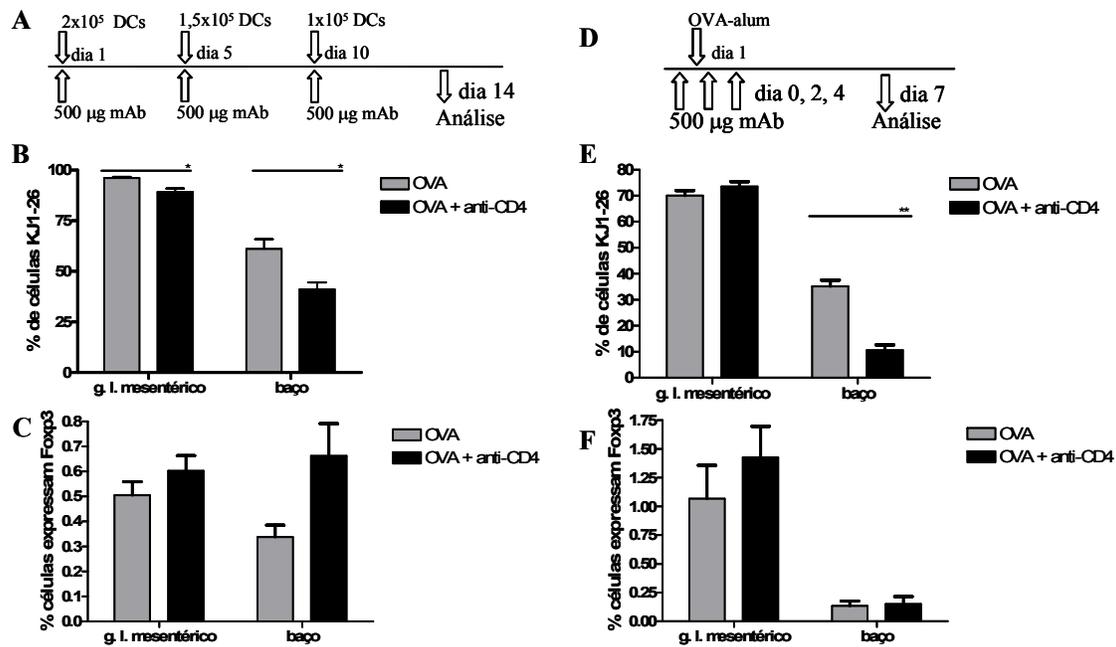


Figura 7: Sensibilização na presença de anti-CD4 leva à depleção de células agressivas em ratinhos DO11.10 Rag^{-/-}. **(A)** Ratinhos DO11.10 Rag^{-/-} foram injectados i.p. nos dias 1, 5 e 10 com diferentes quantidades de DCs pulsadas com 0,01 µM de péptido. Nos mesmos dias de injeção um grupo de animais recebeu uma injeção de 500 µg de mAb não depletante anti-CD4. Os baços e gânglios linfáticos mesentéricos foram recolhidos no dia 14 e analisados por citometria de fluxo. **(B)** A percentagem de células agressivas diminuiu nos animais tratados com anti-CD4 em relação aos animais sensibilizados com OVA, tanto nos gânglios linfáticos mesentéricos como no baço (n=4, P <0,05). **(C)** A percentagem de células Fop3⁺ aumentou ligeiramente nos animais tratados mas mantendo-se em valores muito baixos. **(D)** Ratinhos DO11.10 Rag^{-/-} foram sensibilizados por injeção i.p. no dia 1 com 20 µg de OVA-alum. Nos dias 0, 2 e 4 um grupo de animais recebeu uma injeção de 500 µg de mAb não depletante anti-CD4. Os baços e gânglios linfáticos mesentéricos foram recolhidos no dia 7 e analisados por citometria de fluxo. **(E)** Os animais tratados com anti-CD4 sofreram uma redução de células agressivas específicas para OVA no baço (n=5, P <0,01). **(F)** A percentagem de células Fop3⁺ nos ratinhos tratados não se alterou em relação aos animais sensibilizados, quer nos baço quer nos gânglios linfáticos mesentéricos.

Discussão

Os nossos resultados demonstram que o tratamento com mAb anti-CD4 não depletante leva a um estado de tolerância do sistema imunitário a um alérgeno, que não depende exclusivamente da indução de célula Treg Foxp3⁺. Neste caso, parece ser mais importante a redução do número de células agressivas específicas para o alérgeno, o que vai conduzir a uma redução das manifestações alérgicas. Noutros modelos de doença imunitária, como a transplantação, tem sido sugerido que o principal factor que determina o estado de tolerância é o balanço entre o número de células agressivas e reguladoras⁴³. Pode assim induzir-se tolerância actuando em qualquer um dos dois componentes³⁴. O tratamento com anti-CD4 não deixa, no entanto, de conduzir à indução de algumas células Treg *in vitro*. Falta ainda provar que os animais tratados com anti-CD4 permanecem imunocompetentes, o que parece ser o caso de acordo com outras experiências efectuadas no nosso grupo.

Demonstramos que o bloqueio da molécula CD4, co-receptora das células T, com um mAb não depletante previne a inflamação alérgica das vias respiratórias, nomeadamente a acumulação de eosinófilos e linfócitos nas vias aéreas, bem como a acumulação de citocinas Th2 nos pulmões e a hiperplasia de células produtoras de muco. Experiências executadas por Ana Água-Doce no nosso grupo mostram que o mesmo tratamento também previne a hiperreactividade brônquica, a principal manifestação da asma alérgica.

Em animais BALB/c, a administração do anticorpo anti-CD4 leva à eliminação da produção de imunoglobulinas específicas de uma resposta Th2. Para além da IgE total e da IgG1 específica para OVA que são aqui apresentadas, outras experiências no nosso laboratório confirmaram que também ocorre uma diminuição da IgE específica para OVA. O aumento da citocina IL-10 observado nos animais alérgicos não foi confirmado em experiências posteriores. O tratamento com o mAb não depletante anti-CD4 leva a uma diminuição do número total de células dos gânglios linfáticos do mediastino bem como das células Foxp3⁺ em relação a animais alérgicos.

Em DO11.10, animais transgénicos com células T específicas para OVA, observa-se também que a administração do anticorpo previne a acumulação de eosinófilos no BAL e diminui as citocinas Th2 nos pulmões. É de notar que se nos animais BALB/c a citocina onde se notava a maior diminuição era a IL-13 (que contribui para hiperreactividade brônquica⁴⁴), neste caso a diferença mais evidente é nos níveis da IL-5, a citocina que actua no recrutamento dos eosinófilos para o pulmão⁴⁵. Nota-se novamente um aumento da citocina IL-10 nos animais sensibilizados. Em relação às imunoglobulinas, quer de Th1 (IgG2a

específica para OVA), quer de Th2 (IgE total e IgG1 específica para OVA) não há diferenças significativas entre animais tratados ou animais sensibilizados. Isto deve-se, provavelmente, a que o dia 7 seja muito precoce para detectar a mudança de isotipo. O tratamento com o mAb não depletante anti-CD4 leva a uma grande diminuição do número total de células específicas para OVA dos gânglios linfáticos do mediastino, nomeadamente de células Foxp3⁺ em relação a animais alérgicos, sugerindo que a eliminação das células potencialmente agressivas será o principal mecanismo na prevenção da inflamação alérgica.

O sistema *in vitro* foi desenhado para validar a hipótese de que a activação subóptima de células T leva à diferenciação de células Treg. Foram usadas células T provenientes de animais que não são capazes de gerar células Treg naturais no timo, sendo que todas as células T são específicas para o péptido 323-339 de OVA. Foi demonstrado que trazendo a activação das células T abaixo de um certo limiar, por diminuição da concentração de péptido ou aumento da concentração de mAb tolerogénico, consegue-se aumentar a conversão de células T reguladoras. A adição de TGF- β exógeno, uma citocina essencial para a indução de células Treg, reduz a eficiência da conversão de Treg em condições subóptimas enquanto aumenta a eficiência de conversão em melhores condições de estimulação. Com efeito, sabe-se que a adição de TGF- β inibe o influxo de cálcio, pela cascata Ca²⁺-Calcineurina-NFAT, o que leva a uma hiporreactividade à estimulação e ao conseqüente aumento do limiar de activação das células T^{31,32}. Estes dados suportam o modelo de que o TGF- β facilita a conversão de Treg criando um ambiente subóptimo para a activação das células T. Quando estas condições subóptimas já existem, a adição de TGF- β leva ao aumento do limiar de activação prevenindo a indução de Treg.

As experiências *in vivo* com animais Rag^{-/-} e a administração de anticorpos tolerogénicos não levou à indução de células Treg como se esperava e como foi demonstrado em transplantes alogénicos²⁵, mas levou a uma depleção de células agressivas. No entanto, a deficiente conversão de células *in vivo* pode dever-se ao facto do antigénio não estar presente no organismo por períodos tão longos como no caso dos transplantes (fornecido pelo próprio transplante)²⁵, da tolerância oral (em que o antigénio sem encontra constantemente na água)¹⁶ ou das experiências com mini bombas osmóticas de péptido (entrega diária do antigénio)²³ ou o anticorpo anti-DEC205 (aumenta o tempo de circulação das DCs com péptido)²⁴. Nestas experiências *in vivo* a diminuição do número de células específicas para o alergénio pode, no entanto, dever-se a um de três mecanismos: (1) o anticorpo pode estar a depletar as células por lise directa, apesar de ser um anticorpo não depletante³⁷; (2) o anticorpo pode estar a bloquear a proliferação das células agressivas na presença de OVA; ou (3) o mecanismo de actuação do

anticorpo pode ser morte celular induzida por activação. Este último mecanismo é o que pensamos que ocorra, uma vez que já foi demonstrado anteriormente que o estado de tolerância em transplantação necessita que ocorra a eliminação de células potencialmente agressivas³⁴⁻³⁶.

Apesar de pensarmos que o mecanismo que parece actuar *in vivo* com o tratamento com anti-CD4 não depletante seja a eliminação de células potencialmente agressivas específicas para OVA, não o podemos afirmar. Uma vez que as três experiências *in vivo* com animais DO11.10 Rag^{-/-} foram desenhadas com base no pressuposto de que iríamos induzir células Treg, os controlos necessários para demonstrar que existe de facto uma eliminação de células específicas para antigénio não foram realizados. Para além dos grupos formados (animais sensibilizados com OVA e animais sensibilizados com OVA e tratados com anti-CD4) deveriam ter sido formados mais dois grupos que não eram necessários para o primeiro propósito das experiências. Seria necessário um grupo *naïve*, que não levando qualquer sensibilização com OVA, permitiria saber os níveis basais das células específicas para OVA. Para além deste grupo seria também necessário um quarto grupo controlo, em que os animais apenas seriam tratados com anti-CD4 nunca sendo sensibilizados com OVA. Este grupo permitiria saber o papel do anticorpo *per se* nas células, permitindo discernir se este não estaria a provocar a lise directa das células. Esta experiência encontra-se agora em curso.

Os nossos resultados mostram que o tratamento de modelos animais de asma alérgica com o anticorpo monoclonal não depletante anti-CD4 previne o desenvolvimento das manifestações de doença, características de uma resposta Th2 patológica. No entanto, embora se pudesse pensar que esta prevenção se devesse à indução de tolerância pela conversão de células Treg Foxp3⁺, os resultados sugerem que o estado de tolerância se deve predominantemente à redução do número de células agressivas. Pretendemos validar esta hipótese em experiências futuras.

Bibliografia

1. Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol.* 2003;21:335-76.
2. Mosmann TR, Coffman RL. Th1 and Th2 cells: Different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
3. Reiner SL. Development in motion: Helper T cells at work. *Cell.* 2007;129:33-36.
4. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol.* 2005;6:1123-32.
5. Park H, Li Z, Yang XO, Chang SH, Nurieva R, Wang YH, Wang Y, Hood L, Zhu Z, Tian Q, Dong C. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol.* 2005;6:1133-41.
6. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat Immunol.* 2005;6:345-52.
7. Sakaguchi S. Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* 2000;101:455-58.
8. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* 2003;299:1057-61.
9. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol.* 2003;4:330-6.
10. Khattry R, Cox T, Yasayko SA, Ramsdell F. An essential role for Scurfin in CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells. *Nat Immunol.* 2003;4:337-42.
11. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995;155:1151-64.
12. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr Opin Rheumatol.* 2003;15:430-5.
13. Jordan MS, Boesteanu A, Reed AJ, Petrone AL, Hohenbeck AE, Lerman MA, Naji A, Caton AJ. Thymic selection of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells induced by an agonist self-peptide. *Nat Immunol.* 2001;2:301-6.
14. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, McGrady G, Wahl SM. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003;198: 1875-1886
15. Kim JM, Rudensky A. The role of the transcription factor Foxp3 in the development of regulatory T cells. *Immunol Rev.* 2006;212:86-98.
16. Mucida D, Kutchukhidze N, Erazo A, Russo M, Lafaille JJ, Curotto de Lafaille MA. Oral tolerance in the absence of naturally occurring Tregs. *J Clin Invest.* 2005;115:1923-33.
17. Mucida D, Park Y, Kim G, Turovskaya O, Scott I, Kronenberg M, Cheroutre H. Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid. *Science.* 2007;317:256-60.

18. Qin S, Cobbold SP, Pope H, Elliott J, Kioussis D, Davies J, Waldmann H. "Infectious" transplantation tolerance. *Science*. 1993;259:974-7.
19. Graca L, Honey K, Adams E, Cobbold SP, Waldmann H. Cutting edge: anti-CD154 therapeutic antibodies induce infectious transplantation tolerance. *J Immunol*. 2000;165:4783-6.
20. Cobbold SP, Castejon R, Adams E, Zelenika D, Graca L, Humm S, Waldmann H. Induction of foxP3⁺ regulatory T cells in the periphery of T cell receptor transgenic mice tolerized to transplants. *J Immunol*. 2004;172:6003-10
21. Waldmann H, Chen TC, Graca L, Adams E, Daley S, Cobbold S, Fairchild PJ. Regulatory T cells in transplantation. *Semin Immunol*. 2006;18:111-9.
22. Chen TC, Waldmann H, Fairchild PJ. Induction of dominant transplantation tolerance by an altered peptide ligand of the male antigen Dby. *J Clin Invest*. 2004;113:1754-62.
23. Apostolou I, von Boehmer H. In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells. *J Exp Med*. 2004;199:1401-8
24. Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol*. 2005;6:1219-27
25. Chen TC, Cobbold SP, Fairchild PJ, Waldmann H. Generation of anergic and regulatory T cells following prolonged exposure to a harmless antigen. *J Immunol*. 2004;172:5900-7.
26. Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol*. 1997;159:4772-80.
27. Griffin MD, Lutz W, Phan VA, Bachman LA, McKean DJ, Kumar R. Dendritic cell modulation by 1 α ,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:6800-5.
28. Yang J, Bernier SM, Ichim TE, Li M, Xia X, Zhou D, Huang X, Strejan GH, White DJ, Zhong R, Min WP. LF15-0195 generates tolerogenic dendritic cells by suppression of NF- κ B signaling through inhibition of IKK activity. *J Leukoc Biol*. 2003;74:438-47.
29. Roncarolo MG, Gregori S, Battaglia M, Bacchetta R, Fleischhauer K, Levings MK. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol Rev*. 2006;212:28-50.
30. Graca L, Chen TC, Le Moine A, Cobbold SP, Howie D, Waldmann H. Dominant tolerance: activation thresholds for peripheral generation of regulatory T cells. *Trends Immunol*. 2005;26:130-5.
31. Bommireddy R, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Doetschman T. TGF beta 1 inhibits Ca²⁺-calcineurin-mediated activation in thymocytes. *J Immunol*. 2003;170:3645-52.
32. Bommireddy R, Saxena V, Ormsby I, Yin M, Boivin GP, Babcock GF, Singh RR, Doetschman T. TGF-beta 1 regulates lymphocyte homeostasis by preventing activation and subsequent apoptosis of peripheral lymphocytes. *J Immunol*. 2003;170:4612-22.
33. Chen CH, Seguin-Devaux C, Burke NA, Oriss TB, Watkins SC, Clipstone N, Ray A. Transforming growth factor beta blocks Tec kinase phosphorylation, Ca²⁺ influx, and NFATc translocation causing inhibition of T cell differentiation. *J Exp Med*. 2003;197:1689-99.

34. Graca L, Le Moine A, Lin CY, Fairchild PJ, Cobbold SP, Waldmann H. Donor-specific transplantation tolerance: the paradoxical behavior of CD4+CD25+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:10122-6.
35. Li Y, Li XC, Zheng XX, Wells AD, Turka LA, Strom TB. Blocking both signal 1 and signal 2 of T-cell activation prevents apoptosis of alloreactive T cells and induction of peripheral allograft tolerance. *Nat Med*. 1999;5:1298-302.
36. Wells AD, Li XC, Li Y, Walsh MC, Zheng XX, Wu Z, Nunez G, Tang A, Sayegh M, Hancock WW, Strom TB, Turka LA. Requirement for T-cell apoptosis in the induction of peripheral transplantation tolerance. *Nat Med*. 1999;5:1303-7.
37. Qin SX, Wise M, Cobbold SP, et al. Induction of tolerance in peripheral T cells with monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*. 1990;20:2737-2745.
38. Inaba K, Inaba M, Romani N, et al. Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J Exp Med*. 1992;176:1693-1702.
39. Cobbold S, Metcalfe S. Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). *Tissue Antigens*. 1994;43:137-154.
40. Drazen JM, Finn PW, De Sanctis GT. Mouse models of airway responsiveness: physiological basis of observed outcomes and analysis of selected examples using these outcome indicators. *Annu Rev Physiol*. 1999;61:593-625.
41. Kips JC, Anderson GP, Fredberg JJ, Herz U, Inman MD, Jordana M, Kemeny DM, Lötval J, Pauwels RA, Plopper CG, Schmidt D, Sterk PJ, Van Oosterhout AJ, Vargaftig BB, Chung KF. Murine models of asthma. *Eur Respir J*. 2003;22:374-82.
42. Kelsoe G. Life and death in germinal centers (redux). *Immunity*. 1996;4:107-11.
43. Zheng XX, Sanchez-Fueyo A, Domenig C, Strom TB. The balance of deletion and regulation in allograft tolerance. *Immunol Rev*. 2003;196:75-84.
44. Wills-Karp M, Luyimbazi J, Xu X, Schofield B, Neben TY, Karp CL, Donaldson DD. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 1998;282:2258-61.
45. Eum SY, Hailé S, Lefort J, Huerre M, Vargaftig BB. Eosinophil recruitment into the respiratory epithelium following antigenic challenge in hyper-IgE mice is accompanied by interleukin 5-dependent bronchial hyperresponsiveness. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995;92:12290-4.

Anexos

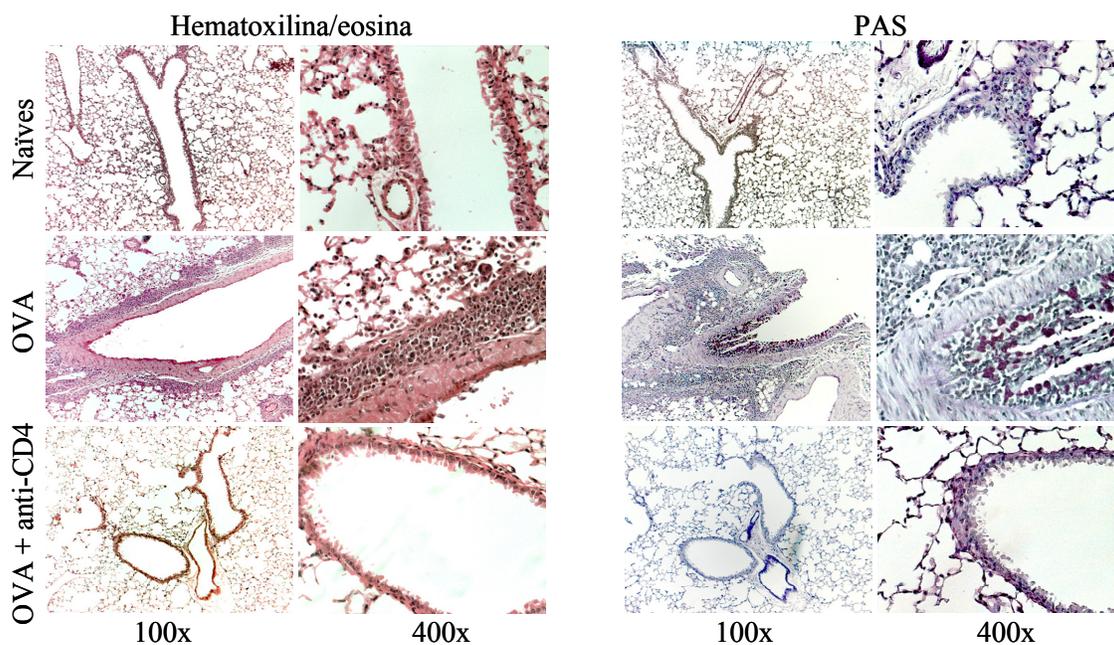


Figura suplementar 1: Redução da infiltração inflamatória e do aumento das células produtoras de muco em animais tratados com mAb anti-CD4 não depletante. Secções histológicas de tecido de pulmão de animais BALB/c foram coradas com hematoxilina/eosina ou PAS. Tecido de animais tratados com anti-CD4 mostra uma redução do infiltrado inflamatório nas vias respiratórias para níveis semelhantes ao observado em animais não sensibilizados com OVA (*naïve*). Verifica-se também que nos animais tratados com anti-CD4 não ocorre uma hiperplasia das células calciformes produtoras de muco, como se observa nos animais alérgicos.

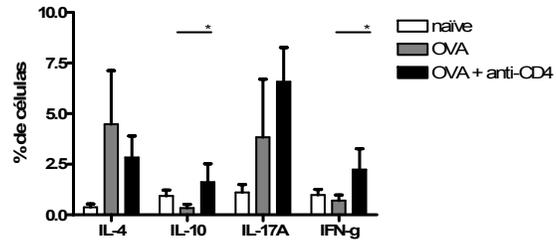


Figura suplementar 2: Padrão intracelular de citocinas em células T CD4⁺ dos gânglios linfáticos mesentéricos de animais BALB/c. A quantificação por citometria de fluxo do padrão intracelular de citocinas revela um pequeno aumento nas células que contêm IL-10 e IFN- γ nos animais tratados (n=6, $P < 0,01$), enquanto não se observam diferenças estatisticamente significativas na proporção de células positivas para IL-4 ou IL-17A entre animais alérgicos e animais tratados com anti-CD4.

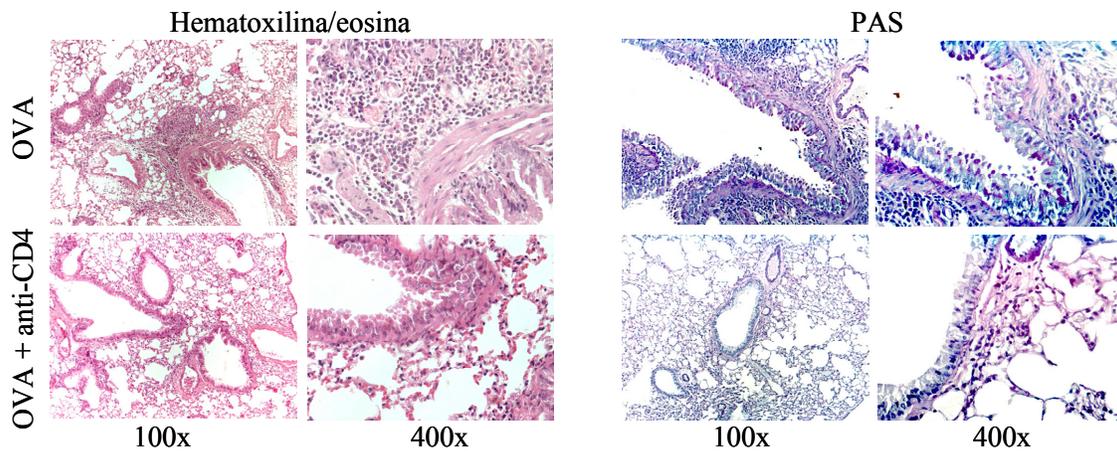


Figura suplementar 3: Redução da infiltração inflamatória e do aumento das células produtoras de muco em animais tratados com mAb anti-CD4 não depletante. Secções histológicas de tecido de pulmão de animais DO11.10 foram coradas com hematoxilina/eosina ou PAS. Tecido de animais tratados mostra uma redução do infiltrado inflamatório nas vias respiratórias em relação aos animais alérgicos. Verifica-se também uma redução do número de células produtoras de muco nos animais tratados com anti-CD4 em relação aos animais doentes.