

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em / / 19 , considerou o (a) candidato (a) aprovado (a).

1º) Examinador : _____

2º) Examinador : _____

3º) Examinador : _____

4º) Examinador : _____

5º) Examinador : _____

NEUZA SIZUE HIGOBASSI TAKAHASHI

POTENCIALIDADE DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS
GENETICAMENTE SELECIONADOS DE ACORDO COM A INTENSIDADE
DA RESPOSTA HUMORAL.

Tese apresentada ao
Instituto de Ciências Biomédicas
da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Imunologia),
Orientador:
Profa. Dra. Olga Célia Martínez Ibañez

SÃO PAULO
1995

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Takahashi, Neuza Sizue Higobassi.

Potencialidade de linfócitos de camundongos geneticamente selecionados de acordo com a intensidade da resposta humoral / Neuza Sizue Higobassi Takahashi. -- São Paulo, 1995.

Tese (doutorado)--Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Imunologia.

Área de concentração: Imunologia.

Orientador: Ibañez, Olga Célia Martinez.

Descritores: 1.Seleção (Genética) 2.Imunorregulação 3.Ativação de linfócitos 4.Linfócitos TH1 e TH2 5.Interleucinas 6.Isótipos de imunoglobulina

ICB/SBIB.002/95

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES/PICD.

Ao Reinaldo,
Afonso , William e Carina,
com muito amor e carinho

Aos meus pais,
com muita gratidão

**Aos meus irmãos,
sogro, cunhados e sobrinhos
pelo estímulo constante.**

AGRADECIMENTOS

À orientadora e amiga Dra Olga Célia Martinez Ibañez que, por sua dedicação tanto na bancada de trabalho como na revisão deste manuscrito, tornou possível a realização deste trabalho.

À Dra Maria Siqueira por me aceitar no seu Laboratório, pelo incentivo constante e pelas inúmeras sugestões a esta tese.

À amiga Dra Wafa H. Cabrera, presença imprescindível para o Laboratório, que partilhou comigo de todos os sucessos e insucessos dos experimentos e que me deu sempre o maior apoio.

À todos os membros da Equipe do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, pelo carinho e estímulo que sempre recebi: Oswaldo, Orlando, Marcelo, Luiza, Solange, Aryene, Yanira.

À Claude Decreusefond do Instituto Curie de Paris, pela preciosa ajuda na dosagem das Interleucinas e Isotipos de Imunoglobulinas.

À amiga Eliane Faquin do Laboratório de Imunologia Celular do ICB/USP pela dosagem da IL-10.

À Cristiane, pela confecção dos slides.

Aos amigos e Professores do Curso de Pós-Graduação , pelo convívio e amizade.

Às Profas Thereza Kipnis, Mahasti Sahihi de Macedo, Zuleica Caulada Benedetti, Chloé Gamba Musati, Lúcia Singer-Vermes e Adenir Perini, pelas sugestões feitas por ocasião dos Exames de Qualificação.

Aos Professores Gabriel Israel Filho, Edelson Flávio Morato, Célia M. Barardi e Sonia G. Carobrez da Universidade Federal de Santa Catarina, por permitirem o meu afastamento.

Aos meus familiares e amigos pelo incentivo constante.

ABREVIACÕES UTILIZADAS NESTE TRABALHO

Ag f = Antígeno flagelar de Salmonella

Ag s = Antígeno somático de Salmonella

APC = Célula apresentadora de Antígeno

BSA = Soro Albumina Bovina

CFA = Adjuvante completo de Freund

ConA = Concanavalina A

cpm = Contagens por minuto

DTH = Hipersensibilidade tardia

Ep = erro padrão

FCS = Soro de bezerro fetal

GP = Seleção Geral Primária

GP = Seleção Geral Secundária

H = Linhagem de camundongos boa produtora de anticorpos *

(* Os números romanos e as letras subscritos determinam as seleções)

h² = Herdabilidade realizada

HoGG = Gamaglobulina de cavalo

³HTdr = Timidina tritiada

i.p. = via intraperitoneal

i.v. = via intravenosa

IFN γ = Interferon gama

IL = Interleucina

L = Linhagem de camundongos m produtora de anticorpos *

(* Os números romanos e as letras subscritos determinam as seleções)

2-ME = 2 - Mercaptoetanol

MHC = Complexo principal de histocompatibilidade

MLR = Reação mista de linfócitos

NR = Não Realizado

PBS = Salina tamponada

PE = Eritrócitos de pombo

PFC = Célula formadora de placa de lise

PHA = Fitohemaglutinina

RGG = Gamaglobulina de coelho

s.c. = via subcutânea

sd = desvio padrão

SE = Eritrócitos de carneiro

SEB = Enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*

TCR = Receptor de células T

v/v = Volume a volume

SUMÁRIO

RESUMO

I - INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	11
II - MATERIAL E MÉTODOS	12
II.1 - ANIMAIS	13
II.2 - ANTÍGENOS E IMUNIZAÇÕES	13
II.2.1- Hemácias de carneiro	13
II.2.2- Gamaglobulinas	13
II.3 - MEIOS DE CULTURA	14
II.4- ANTICORPOS MONOCLONAIS	14
II.4.1 - Anticorpo Monoclonal GK-1.5 anti-CD4	14
II.4.2 - Anticorpo monoclonal anti-CD3	15
II.4.3 - Anticorpos monoclonais anti-linfocinas	15
II.4.4 - Anticorpo monoclonal anti-IgE	16
II.5- LINHAGENS CELULARES	16
II.5.1 - Células CTLL	16
II.5.2 - Células X-63	17
II.6- ENSAIOS BIOLÓGICOS	17
II.6.1- ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO <i>in vitro</i>	17
II.6.1a- Proliferação induzida por mitógenos	17
II.6.1b- Proliferação antígeno-específica	18
II.6.1c - Inibição da Proliferação	19
II.6.1d - Proliferação na presença de IL-2 exógena	19
II.6.2 - ATIVIDADE DE INTERLEUCINA-2	19
II.6.3 - CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS (MLR)	20
II.6.3a - MLR bidirecional	20
II.6.3b - MLR unidirecional	21
II.6.4 - DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS FORMADORAS DE PLACAS DE LISE	21
II.6.5 - DETERMINAÇÃO DE ROSETAS IMUNES	22
II.6.6 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPO ANTI-HoGG POR TÉCNICA DE ELISPOT	22
II.6.7 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LINFOCINAS PRODUZIDAS NO DECORRER DA ESTIMULAÇÃO ESPECÍFICA	23
II.6.7a - Dosagem de Interleucina -2 e Interleucina-4	23
II.6.7b - Dosagem de IL-5, IL-6, IL-10 e IFN γ	24
II.6.7c - Biotinilação de anticorpos	25
II.7- DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS	25
II.7.1- Anticorpos anti-SE	25
II.7.2 Anticorpos anti HoGG	26
II.7.2a - Dosagem de IgG total e isótipos IgG1 e IgG2a anti-HoGG	26
II.7.2b - Dosagem de IgE anti-HoGG	26
II.7.2c - Biotinilação de HoGG	27
II.8 - ANÁLISE DE DADOS	28

III - RESULTADOS	29
III.1 - ESTUDO DA POTENCIALIDADE DOS LINFÓCITOS T	30
III.1.1 - ENSAIOS BIOLÓGICOS DA ATIVIDADE T <i>in vitro</i>	30
III.1.1a - Proliferação induzida por lectinas.....	30
III.1.1b - Proliferação induzida pela Enterotoxina B de <i>Staphylococcus aureus</i> e anticorpo monoclonal anti-CD3.....	32
III.1.1c - Proliferação específica induzida por HoGG.....	35
III.1.1d - Proliferação específica induzida por RGG.....	36
III.1.1e - Proliferação induzida por IL-2 recombinante.....	41
III.1.1f - Atividade de Interleucina-2 presente nos sobrenadantes.....	43
III.1.1g - Cultura mista de linfócitos.....	45
III.2 - ESTUDO DA POTENCIALIDADE DOS LINFÓCITOS B	47
III.2a - Resposta de H_{GP} e L_{GP} a imunização com SE: Determinação de células formadoras de placas de lise e rosetas no baço e dosagem de anticorpos circulantes anti-SE	47
III.2b - Resposta de H_{GP} e L_{GP} a Imunização com HoGG: Determinação do número de células secretoras de anticorpos anti-HoGG nos linfonodos por técnica de ELISPOT e dosagem de IgG anti-HoGG no soro por ELISA	49
III.3 - MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS ANTI-SE POR SEB	51
III.4 - AVALIAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES TH1 E TH2 DE H_{GP} E L_{GP} POR ANTÍGENO PROTÉICO	53
III.4.1 - PERFIL DE LINFOCINAS SECRETADAS EM CULTURA	53
III.4.1a - Dosagem de Interferon gama.....	55
III.4.1b - Dosagem de IL-5 e IL-6.....	57
III.4.1c - Dosagem de IL-10.....	58
III.4.1d - Dosagem de IL-2 e IL-4.....	59
III.4.2 - DOSAGEM DE ISÓTIPOS IgG₁, IgE e IgG_{2a} ESPECÍFICOS ANTI-HoGG	62
IV - DISCUSSÃO	64
V - CONCLUSÕES	80
VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*	82
ABSTRACT	99

RESUMO

Linhagens de camundongos da Seleção Geral Primária (GP), selecionadas geneticamente segundo a intensidade da resposta humoral a múltiplos antígenos, foram empregadas como modelo experimental para o estudo dos mecanismos regulatórios da resposta imune.

Foi feita uma avaliação comparativa de alguns aspectos da complexa rede de ativação imunológica, através de ensaios de estimulação linfocitária *in vitro* e *in vivo*, análise do perfil de linfocinas secretadas e isótipos específicos produzidos após imunização.

Ensaios *in vitro* utilizando mitógenos tais como PHA, Con A, SEB, anti-CD3 e rIL-2, cujos efeitos dependem da sua habilidade de estimular receptores envolvidos na ativação fisiológica dos linfócitos T não evidenciaram diferenças importantes entre as linhagens boa (HGP) e má respondedoras (LGP).

A resposta específica de linfócitos T induzida por antígenos protéicos e aloantígenos, entretanto evidenciou diferenças interlinhagens significativas, tanto nos ensaios de proliferação *in vitro* como na produção de IL-2. A hiporesposta de linfócitos T de LGP é portanto restrita a estímulos que envolvem o sítio de combinação para o antígeno no TCR.

A potencialidade de linfócitos B foi avaliada pela evolução do aparecimento de células secretoras de anticorpos em linfonodos, através de técnicas de ELISPOT para antígenos protéicos e no baço por técnicas de PFC e rosetas anti-SE. Os números foram muito superiores nos HGP, refletindo-se na grande diferença interlinhagens nos títulos de anticorpos séricos anti-proteína e anti-SE.

Aparentemente, no entanto a má resposta dos LGP não é devida essencialmente a um defeito na atividade destas células B, já que a resposta de anticorpos IgG anti-SE dos LGP foi corrigida pelo tratamento prévio dos animais com SEB, demonstrando-se ainda o efeito adjuvante da ativação policlonal de linfócitos T na produção de anticorpos.

Os níveis de linfocinas IFN γ , IL-2 e IL-10 produzidas por células ganglionares especificamente estimuladas em cultura por antígeno protéico diferem em HGP e LGP, sugerindo que nos HGP ocorre maior estimulação das duas subpopulações TH1 e TH2.

Coincidentemente, foi determinada superioridade dos HGP na produção dos diferentes isótipos IgG1, IgE e IgG2a, relacionados a estas 2 populações celulares. Maiores diferenças interlinhagens, entretanto, foram encontradas nos títulos de IgG2a, sugerindo maior deficiência dos LGP na capacidade de ativação da população TH1.

I - INTRODUÇÃO

Diversas linhagens de camundongos bons (H) e maus (L) produtores de anticorpos contra antígenos naturais complexos, foram produzidas por seleção genética bidirecional a partir de populações heterogêneas iniciais (BIOZZI et al., 1979).

Num trabalho conjunto entre as equipes dos laboratórios de Imunogenética do Instituto Curie de Paris e do Instituto Butantan de São Paulo, foram efetuadas cinco seleções independentes, utilizando diferentes antígenos selecionadores.

A seleção I (BIOZZI et al., 1971) foi obtida pela resposta primária a eritrócitos de carneiro (SE) e eritrócitos de pombo (PE); a seleção II (FEINGOLD et al., 1976) pela resposta primária a eritrócitos de carneiro (SE); as seleções III e IV (SIQUEIRA et al., 1976) pela resposta secundária a antígeno flagelar (Ag f) e antígeno somático (Ag s) respectivamente, de Salmonella typhimurium (S. tm) e Salmonella oranienburg (S. ora) e a seleção V (PASSOS et al., 1977) pela resposta secundária a soroalbumina bovina (BSA) e a gamaglobulina de coelho (RGG).

Nas seleções I, III, IV e V, os dois antígenos de mesma natureza, porém sem reatividade cruzada, foram alternados nas gerações consecutivas, evitando a interferência de anticorpos maternos e acelerando os processos de seleção.

Todas as seleções foram iniciadas a partir de populações heterogêneas e em cada geração, a resposta individual de anticorpos contra a dose ótima do antígeno selecionador foi avaliada.

Dessa maneira, formando-se casais não consanguíneos escolhidos dentro da população, que apresentavam altos ou baixos títulos de anticorpos e repetindo-se o processo em gerações consecutivas, gradativamente as linhagens H e L foram sendo selecionadas.

A divergência interlinhagens aumentou progressivamente em todos os experimentos até ser atingido o limite de seleção, quando as linhagens H e L foram consideradas homozigotas para os alelos relacionados ao caráter selecionador (BIOZZI et al., 1979). No limite de seleção as duas linhagens apresentavam os fenótipos extremos que são encontrados em populações heterogêneas.

A capacidade de resposta boa ou má foi o resultado do efeito aditivo de alelos de efeito "bom" ou "mau" localizados em vários loci independentes (controle poligênico), que foram acumulados progressivamente nas linhagens H e L durante o processo seletivo.

A análise genética das seleções mostrou vários parâmetros similares: os valores da herdabilidade (que representa a porcentagem do fenótipo parental realmente transmitido a progênie) foram próximos a 0,20 em todas as seleções. Os números de loci estimados para as diferentes seleções variaram entre 2 e 11 e foram obtidos a partir dos resultados da seleção e através da análise das médias e variâncias dos títulos de anticorpos dos híbridos F1 interlinhagens (HxL), segregantes F2 e retrocruzados (F1x H e F1x L). Os valores da variância genotípica (soma da variância aditiva e da variância de dominância) representam, aproximadamente, 50% da variância fenotípica da população original nas Seleções I a IV, enquanto a Seleção V apresentou um componente genético maior (76%). Esses dados destacam a importância da interação dos fatores genéticos e ambientais na regulação quantitativa da resposta de anticorpos contra os antígenos selecionadores. (BIOZZI et al., 1979; BIOZZI et al., 1980; SANT ANNA et al., 1982).

Nos vários experimentos foi demonstrado que os genes acumulados durante os processos seletivos apresentaram efeito multiespecífico, isto é, modificaram também a intensidade da resposta das linhagens contra antígenos

não relacionados aos de seleção (BIOZZI et al., 1979; SIQUEIRA et al., 1977; BIOZZI et al., 1982)

O efeito multiespecífico foi variável, sendo muito amplo nas seleções I, II e III, porém bastante restrito nas seleções IV e V, como consequência da pressão de seleção pela natureza diversa dos antígenos selecionadores e dos diferentes esquemas de imunização empregados durante cada experimento. A análise comparativa do efeito multiespecífico mostrou que provavelmente grupos não equivalentes de genes foram afetados nas linhagens H e L das várias seleções (SANT'ANNA et al., 1979; IBAÑEZ et al., 1988; DE FRANCO, 1989).

Vários estudos têm sido realizados para avaliar a expressão destes diferentes alelos ao nível das funções das células imunocompetentes.

A atividade macrofágica das linhagens H e L das seleções I e II (selecionadas pela resposta a uma injeção i.v. de eritrócitos heterólogos) foi bastante distinta. Nestas seleções, as linhagens L possuem macrófagos que catabolizam mais intensamente o antígeno e o apresentam menos eficientemente do que os macrófagos das linhagens H (BIOZZI et al., 1984; ADORINI et al., 1981; WIENER & BANDIERI, 1974).

Por outro lado nas seleções III e IV (selecionadas pela resposta secundária a antígenos bacterianos) essa diferença interlinhagens não foi observada (FERREIRA et al., 1985; GENNARI et al., 1987). Provavelmente nessas seleções, em razão do esquema de imunização e da natureza do antígeno, a modificação da atividade do macrófago não foi primordial na determinação do fenótipo.

Considerando estas diferenças na atividade de macrófagos entre os dois modelos de seleção (I e II por um lado e III e IV por outro) prosseguiu-se o

estudo das linhagens pela análise comparativa das outras células imunocompetentes em relação às suas funções efetoras e regulatórias.

As reações de imunidade mediada por células T *in vivo*, tais como rejeição a enxerto de pele e enxerto versus hospedeiro foram de igual intensidade nos animais H e L das seleções I, II e III (BIOZZI et al., 1979; FERREIRA et al., 1985), mostrando uma semelhança na função efetora destes linfócitos.

Entretanto, a contagem por diluição limite de células T esplênicas indutoras de hipersensibilidade tardia, de camundongos sensibilizados com o antígeno de seleção e transferidas para a pata de camundongos F₁ (HxL) demonstrou maior número destas células na linhagem H do que na linhagem L da seleção I (MARCHAL et al., 1982; MARCHAL & MILLON, 1984; MILLON et al., 1985).

Nas diversas linhagens foi ainda evidenciada alguma associação entre reação de hipersensibilidade tardia e intensidade da resposta inflamatória (OLIVEIRA, 1984; OLIVEIRA et al., 1985).

A depleção *in vivo* de células T CD4⁺ foi uma maneira de se estudar o papel desta subpopulação nas fases iniciais e efetoras da resposta imune. Camundongos H e L (seleções I e III) foram tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4 anteriormente à imunização com eritrócitos de carneiro e analisado o impacto desta depleção na produção de anticorpos. Pequenas doses de anti-CD4 bloquearam a resposta humoral de forma duradoura nos animais L, enquanto nos H o efeito foi breve e pouco intenso, mesmo com doses elevadas do monoclonal (COUDERC et al., 1989/1990; REIS et al., 1992).

Embora a proliferação *in vitro* não seja uma função efetora de célula T, como são a função auxiliar para células B ou citotoxicidade, os ensaios de proliferação são confiáveis e são muito usados para averiguar a competência

deste compartimento. Nos ensaios de proliferação foram utilizados linfócitos normais ou linfócitos provenientes de animais imunizados.

Foi observado que linfócitos T de H e L das seleções I e III foram igualmente estimulados *in vitro* por mitógenos tais como as lectinas PHA e ConA (LIACOPOULOS-BRIOT et al., 1974; FERREIRA et al., 1985).

Em estudos recentes do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan foi analisada a capacidade proliferativa de células T por ligação direta de fatores ao receptor T, empregando-se anticorpo monoclonal anti-CD3 ou superantígeno enterotoxina B de *Staphylococcus aureus*. Também sob estes estímulos não foram evidenciadas diferenças importantes no comportamento de linfócitos T de H e L das seleções IV-A e GS (CABRERA, 1993; CABRERA et al., in press ; MOUTON, comunicação pessoal).

Por outro lado, diferenças interlinhagens significantes foram detectadas na proliferação de linfócitos provenientes de animais imunizados das seleções I e III, quando cultivados na presença de antígeno. Enquanto linfócitos de H são ativados por pequenas doses do antígeno e atingem índices consideráveis de proliferação com doses maiores, os linfócitos dos L são fracamente estimulados, mesmo com doses elevadas (COUDERC et al., 1989/90; REIS et al., 1992) .

A ativação do compartimento T foi também avaliada pela medida de IL-2 secretada após 24 hs de cultura. Em experimentos realizados comparativamente nas seleções I e III, foi observado que para os linfócitos dos maus respondedores da seleção I (L_I), a baixa proliferação após estimulação antigênica é acompanhada de baixa produção de IL-2. Nos L_{III}, o defeito na ativação específica foi restrito à proliferação, uma vez que a produção de IL-2 foi comparável à de linfócitos de bons respondedores (COUDERC et al, 1989/90; REIS et al., 1992). É portanto provável que a deficiência na ativação específica

de linfócitos dos L_{III} esteja relacionada a uma expressão defectiva de receptores para IL-2 . A comparação destes resultados nas seleções I e III representa uma comprovação adicional de que diferentes mecanismos regulatórios operam nas linhagens homólogas H e L destes dois modelos de seleção.

A análise direta das subpopulações de células T CD4⁺, CD8⁺, linfócitos B IgG⁺ e IgD⁺ por citofluorimetria de fluxo das seleções I , III, GP e GS não mostrou diferenças nos números basais destas populações e na densidade de expressão destes receptores na membrana (REIS et al., 1992; COURDEC et al., 1989/1990 ; MOUTON, comunicação pessoal).

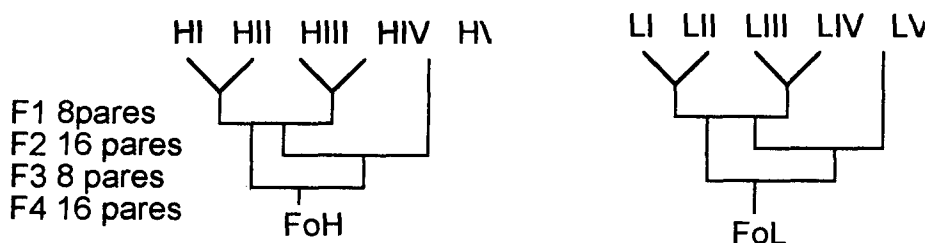
No estudo de atividade de linfócitos B foi encontrada uma relação direta entre o número de células produtoras de anticorpos no baço, detectadas pela técnica de células formadoras de placa de lise (PFC) e a resposta de anticorpos nas linhagens H e L das várias seleções. Dessa maneira, os camundongos H imunizados apresentam maior número de PFC do que os L , superioridade que se reflete nos títulos de anticorpos séricos. Essa diferença no número de PFC é decorrente de maior velocidade e tempo de duração da fase da multiplicação celular demonstrada nos camundongos H das seleções I e III (BIOZZI et al., 1972; CABRERA, 1993).

Foi recentemente avaliada a participação de linfócitos B como células apresentadoras de antígeno. Num sistema *in vitro*, hibridomas T específicos para peptídeos de OVA provenientes de híbridos F₁(HxL) da seleção I, foram estimulados por linfócitos B de animais coisogênicos H_I ou L_I, pulsados *in vitro* com este antígeno. Neste sistema, linfócitos B de H_I foram mais eficientes para estimular os clones híbridos de T do que os linfócitos B de maus respondedores, demonstrando que o processo de seleção induziu modificações a este nível de atividade de células B (DE FRANCO, comunicação pessoal).

A análise de anticorpos séricos demonstrou diferenças entre H e L em todos os isótipos em níveis basais. Embora as concentrações de anticorpos totais sejam sempre maiores nos H do que nos L, os níveis dos diferentes isótipos variam de seleção para seleção, conforme o imunógeno utilizado, sugerindo um papel chave da estrutura antigênica para a produção de determinado isótipo (SANT'ANNA et al., 1991).

Este conjunto de experimentos foi importante para demonstrar que, nos diversos processos de seleção artificial para a produção das linhagens H e L, ocorreu o envolvimento de grupos diferentes de genes, que se expressam em diferentes etapas de regulação da biossíntese de anticorpos.

Numa tentativa de reunir estes diferentes lotes gênicos em uma única linhagem H ou L, foi feito o inter cruzamento de linhagens homólogas das cinco primeiras seleções (I, II, III, IV e V) produzindo-se as populações F_0H e F_0L conforme esquema.



Estas populações (F_0H e F_0L) foram então submetidas a um processo seletivo unidirecional, em que o caráter selecionador foi a resposta de anticorpos à imunização multiantigênica, ou seja, a uma mistura de 3 antígenos de natureza diversa: eritrócitos heterólogos, antígenos bacterianos e proteínas heterólogas, que foram originalmente empregados nas primeiras seleções.

Duas novas seleções foram assim realizadas: GP (Geral Primária) selecionada pela análise da resposta primária aos multiantígenos de seleção e GS (Geral Secundária) que considerou as respostas primárias e secundárias aos

antígenos administrados simultaneamente. A seleção GP foi desenvolvida e está sendo mantida em São Paulo e a seleção GS em Paris (MOUTON et al., 1988).

As seleções GP e GS pelo fato de se originarem de F₀H e F₀L apresentam diferenças com relação à resposta a seleção quando comparadas às seleções originais. Em F₀H e F₀L os alelos de efeito bom ou mau, respectivamente devem aparecer numa frequência maior do que nas populações iniciais das seleções I, II, III, IV e V e conseqüentemente a variância genética foi menor, situando-se entre 37% e 47% (MOUTON et al., 1988).

Outra diferença relaciona-se ao número de antígenos utilizados no processo de imunização, sendo um na seleção II, dois nas seleções I, III, IV e V, oito na seleção GP e seis na seleção GS. Devido a essas modificações no processo de seleção, os valores da herdabilidade (h^2) foram de cerca de 0,4, valor significativamente superior a 0,2, constantemente observado nos primeiros experimentos de seleção (MOUTON et al., 1988).

As divergências interlinhagens no limite de separação nos processos GP e GS e nos originais são semelhantes quando se consideram as respostas aos antígenos selecionadores. Isso demonstra que em cada um dos cinco processos seletivos, foi afetada a totalidade dos alelos responsáveis pela alta ou baixa reatividade aos respectivos antígenos de seleção. Por outro lado, foi constatada nas novas linhagens H e L um aumento acentuado do efeito multiespecífico em relação às linhagens originais, demonstrando assim a esperada amplificação dos efeitos de seleção, objetivo inicial deste experimento. (DE FRANCO, 1989 ; MASSA, 1994).

Assim, em razão da constituição genética das linhagens H e L das seleções GP e GS e de suas características fenotípicas, elas representam um modelo excepcional para o estudo dos mecanismos de regulação da resposta imune.

Os ensaios iniciais *in vivo* foram realizados em paralelo nas seleções GP e GS e os resultados demonstraram identidade absoluta entre as linhagens homólogas das duas seleções. Por esta razão concentramos toda a experimentação com os animais da seleção GP, em vista da disponibilidade desses animais em nossa unidade.

OBJETIVOS

Utilizamos neste trabalho as linhagens boa e má respondedoras da seleção Geral Primária (GP), numa tentativa de analisar as complexas interações envolvidas na geração da imunidade, empregando ensaios variados que mimetizam os passos envolvidos na ativação das células imunocompetentes.

A atividade do compartimento T foi avaliada através de ensaios de proliferação *in vitro* onde linfócitos provenientes de animais normais ou imunizados, foram estimulados com antígenos, mitógenos e também aloantígenos.

A potencialidade de linfócitos B foi analisada pelo aparecimento de linfócitos secretores de anticorpos, estudados por técnica de ELISPOT para antígeno protéico e de formação de placa de lise ou de rosetas no baço, no curso da imunização com SE.

Foi investigado ainda o perfil de linfocinas secretadas por linfócitos, especificamente estimulados em cultura e isótipos específicos de anticorpos produzidos pelos animais de ambas as linhagens após imunização.

II - MATERIAL E MÉTODOS

II.1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos das linhagens boa (H) e má (L) produtoras de anticorpos da seleção GP da 26^a geração, com 3 a 4 meses de idade, obtidos no laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan.

II.2 - ANTÍGENOS E IMUNIZAÇÕES

H.2.1- Hemácias de carneiro

Hemácias de carneiro foram colhidas e conservadas em solução de Alsever. Para a obtenção da suspensão celular, as hemácias foram lavadas em solução fisiológica e a concentração determinada por lise e leitura espectrofotométrica em 545 nm e ajustadas de forma a conter $2,5 \times 10^8$ células/ml.

Os animais receberam uma injeção intravenosa de 5×10^8 hemácias contidas em 0.2 ml (dose ótima pré-determinada) e foram sangrados por punção retro-orbital em diferentes intervalos.

II.2.2- Gamaglobulinas

Gamaglobulina de cavalo (HoGG), KOCK-LIGHT Laborat.Ltd (lote nº 2854-1) e Gamaglobulina de coelho (RGG), SIGMA foram diluídas em solução fisiológica na concentração de 1 mg/ml e emulsificadas volume a volume (v/v) em Adjuvante Completo de Freund (CFA), SIGMA.

Os animais receberam um total de 100 µg de HoGG ou RGG em 0,2 ml da emulsão por via subcutânea, distribuídos nos 4 coxins plantares e na base da cauda (CORRADIN et al., 1977).

Sete a dez dias após a imunização, os animais foram sangrados e os linfonodos inguinais , braquiais e axilares retirados para os experimentos. Adicionalmente foi realizado um experimento em que os linfonodos foram retirados precocemente, no quarto dia após a imunização.

II.3 - MEIOS DE CULTURA

HANKS, GIBCO, suplementado com 5% de Soro Fetal Bovino inativado (FCS), CUTILAB.

RPMI simples: Meio RPMI 1640, DIFCO, pH 7,2 , estabilizado com 10 mM HEPES, SIGMA e 2mM de bicarbonato de sódio, MERCK, adicionado de 20 µg/ml de gentamicina e 2 mM de L-glutamina, MERCK.

RPMI completo: RPMI simples suplementado com 10% de FCS e $5 \times 10^{-5}M$ de 2-ME.

CLICK modificado: RPMI simples suplementado com 2% de soro normal de camundongo (H III+ L III v/v, inativado e filtrado); 1 mM de piruvato de sódio, BIOCHEMICAL e $5 \times 10^{-5}M$ de 2-ME. (LEONETTI et al., 1990).

II.4- ANTICORPOS MONOCLONAIS

II.4.1 - Anticorpo Monoclonal GK-1.5 anti-CD4

O Hibridoma GK-1.5, secretor de IgG_{2b} de rato anti-CD4 murino (DIALYNAS et al., 1983), foi mantido através de crescimento contínuo em garrafas de 50 ml, em meio RPMI-completo. Para a expansão do hibridoma, utilizamos camundongos BALB/c irradiados. Os animais, tratados 8 dias antes

com uma injeção intraperitoneal de 0,5 ml de pristane, foram irradiados com 5,5 Grey e 24 horas após receberam 5×10^6 células híbridas. O líquido ascítico foi colhido por punção abdominal a partir do 15º dia da injeção das células. O material coletado foi reunido, centrifugado a 175 g/10 min. e precipitado com sulfato de sódio a 18%. Após diálise exaustiva contra salina, o conteúdo de proteínas foi avaliado por espectrofotometria U.V. O teor de anticorpos anti-CD4 foi determinado por imunodifusão contra antissoro de camundongos anti- IgG_{2b} de rato.

II.4.2 - Anticorpo monoclonal anti-CD3

Hibridoma de hamster 145-2C11, secretor de anticorpo monoclonal anti-CD3 murino (LEO et al., 1987), foi mantido através de crescimento contínuo em garrafas de 50 ml em meio RPMI-simples, suplementado com 10% de FCS. Após 5 dias de cultura, o sobrenadante foi colhido e em seguida centrifugado a 175 g/10 min., filtrado e estocado a - 20°C.

II.4.3 - Anticorpos monoclonais anti-linfocinas.

Hibridomas de rato: S4B6, secretor de monoclonal IgG₁ anti-IL2 murino (MOSMANN et al., 1986; KUBO & CINADER, 1990); 11B11, secretor de monoclonal IgG_{2b} anti-IL4 murino (SWAIN et al., 1990); XMG 1.2, secretor de monoclonal IgG₁ anti IFN_γ murino (CHERWINSKI et al., 1987); AN18, secretor de monoclonal IgG₁ murino anti IFN_γ murino (CHERWINSKI et al., 1987); TRFK5, secretor de monoclonal IgG₁ anti-IL5 murino (SCHUMACHER et al, 1988) e TRFK4, secretor de monoclonal IgG_{2a} anti-IL5 murino (SCHUMACHER et al., 1988), 2A5, secretor de monoclonal anti-IL10 e SXc1 , secretor de monoclonal anti-IL10 murino, gentilmente cedidos pela

Dra Ises A. Abrahmsohn - Departamento de Imunologia ICB/USP, com autorização do DNAX Inc, e 32C1L e 20 F3, secretores de monoclonal anti-IL6, gentilmente cedidos pelo Dr Jacques Couderc - 1. Curie, foram mantidos através de crescimento contínuo em garrafas de 50 ml em meio RPMI completo. Após 5 dias de cultura, os sobrenadantes foram colhidos, purificados em coluna de proteína G-Sepharose, PHARMACIA, filtrados e estocados a -20°C.

II.4.4 - Anticorpo monoclonal anti-IgE.

Hibridoma de rato anti anticorpo IgE murino, HMK12 (HIRAYAMA et al., 1982) foi gentilmente cedido pelo Dr. Jacques Couderc, I. Curie e preparado conforme descrito no item anterior.

II.5- LINHAGENS CELULARES

II.5.1 - Células CTLL

Células T citotóxicas tumorais de origem murina; linhagem CTLL (GILLIS & SMITH, 1977) , foram mantidas através de crescimento contínuo em garrafas de 50ml, com RPMI-completo, acrescidos de 20% de meio condicionado.

Para a obtenção de Meio condicionado, fonte de fator de crescimento requerido pelas CTLL (GILLIS et al., 1978), foram preparadas suspensões de células esplênicas de camundongos normais, na concentração de 5×10^6 cel/ml, e cultivadas em garrafas de 250 ml com RPMI-simples, suplementado com 2% de FCS, adicionando 5 µg/ml de concanavalina A (ConA),

SIGMA. Após 24 horas a 37°C em atmosfera de CO₂, o sobrenadante foi centrifugado a 2600 g/10 min. e mantido a -20°C até o momento do uso.

II.5.2 - Células X-63

Linhagens celulares do mieloma X63 Ag 8-653 (KARASUYAMA et al., 1988), transfectadas com cDNA para IL-4 murina, juntamente com o gene de resistência ao aminoglicosídeo geneticina, um antibiótico de 4ª geração, foram mantidas em meio Click suplementado com 10% FCS.

Para eliminar clones sem atividade secretora de Interleucina, foi acrescentada à cultura das células X-63 Ag 8-653 X-4, solução de geneticina, GIBCO na concentração de 1 mg/ml.

II.6- ENSAIOS BIOLÓGICOS

II.6.1- ENSAIOS DE PROLIFERAÇÃO *in vitro*

II.6.1a- Proliferação induzida por mitógenos

Linfonodos mesentéricos, inguinais, braquiais e axilares de animais HGP e LGP foram homogeneizados em RPMI simples. As suspensões celulares individuais foram filtradas em nylon e centrifugadas a 800 rpm/10 minutos a 4°C. A concentração de células viáveis foi ajustada para 10⁷ células / ml em meio Click modificado após contagem em câmaras de Malassez, utilizando o corante Trypan blue.

Em placas de fundo plano (COSTAR ou CORNING) 50 µl da suspensão celular de 10⁷ células/ml foram cultivadas frente a doses crescentes de

SEB (0,0025 a 5,0 $\mu\text{g/ml}$) SIGMA; PHA (2,5 a 40,0 $\mu\text{g/ml}$) SIGMA e diluições crescentes de sobrenadante de cultura de hibridoma secretor de anti-CD3, a partir de uma diluição inicial de 1:50 do sobrenadante. Foram realizados controles, onde as células foram cultivadas apenas em meio de cultura completo. O volume final em cada poço era de 200 μl .

Os ensaios de estimulação com mitógenos foram feitos a 37°C e 5% de CO₂ em meio Click modificado, durante 48hs quando se utilizou anti-CD3, PHA ou ConA e durante 72 hs para o SEB, melhores tempos de cultura determinados previamente.

As culturas foram pulsadas com 25 μl de timidina tritiada (³HTdR; methyl-3H-thymidine, 2 Ci/mMol, DUPON) durante as últimas 18 horas de cultura.

As amostras foram colhidas com "cell harvester" semi-automático (PHD Cell Harvester, Cambridge technology , Inc.) e a radioatividade incorporada, determinada em cintilador , BECKMAN LS 100 c).

As culturas foram feitas em triplicata, tanto os controles (meio de cultura) como as reações (meio de cultura + mitógeno) e o resultado expresso como a média aritmética das contagens por minuto (cpm) dos ensaios individuais.

II.6.1b- Proliferação antígeno-específica

Quatro a dez dias após a imunização com HoGG ou RGG, linfonodos inguinais, braquiais e axilares foram homogeneizados em meio RPMI simples e processados conforme descrito acima.

Em placas de fundo plano (COSTAR ou CORNING), 5x 10⁵ células/ poço foram cultivadas durante 96 horas , na presença de doses crescentes

de HoGG (de 0,1 a 200 $\mu\text{g/ml}$) ou RGG (33 a 330 $\mu\text{g/ml}$). Nas últimas 18 horas , as culturas foram pulsadas com 25 μl de timidina tritiada (0,01mCi/ml). Como controle de especificidade utilizou-se BGG 200 $\mu\text{g/ml}$ e como controle positivo PHA 40 $\mu\text{g/ml}$.

II.6.1c - Inibição da Proliferação

Células ganglionares foram colocadas em cultura na presença de doses crescentes de anticorpo monoclonal GK 1.5 (0,08 μg a 2,5 $\mu\text{g/ml}$) durante trinta minutos a 37°C. Em seguida foram adicionados 200 $\mu\text{g/ml}$ de HoGG ou 330 $\mu\text{g/ml}$ de RGG e as culturas mantidas a 37°C por 96 horas e a proliferação avaliada pela incorporação de timidina tritiada conforme item anterior.

II.6.1d - Proliferação na presença de IL-2 exógena

IL-2 recombinante humana, Russel Ucla (3,3 a 1000 U/ml) foi adicionada às culturas de linfócitos por um período de 96 horas, sendo colocada a timidina tritiada nas últimas 18 hs.

II.6.2 - ATIVIDADE DE INTERLEUCINA-2

Em placas de microcultura de fundo plano, 100 μl de suspensões de linfonodos (10^7 /ml) foram estimulados na presença de várias diluições dos mitógenos ou do antígeno específico em meio Click. Após 24 hs de cultura, foram colhidos 100 μl do sobrenadante de cada poço e transferidos para as mesmas posições de uma outra placa de 96 poços.

Sobre os 100 μ l de meio condicionado foram adicionados 100 μ l de uma suspensão (1×10^5 cels/ml) de células CTLL em meio RPMI completo e cultivadas por 24 hs, com pulso de 3 HTdR nas últimas 6 hs.

Para a determinação da curva padrão, foram utilizadas 6 doses conhecidas de rIL-2 humana (Russel Ucla rIL-2) a partir de 200 μ g/ml na razão 4 em poços contendo 1×10^4 CTLL. A curva de IL-2 foi estabelecida através do método dos probitos, considerando que 1 Unidade de Interleucina 2 corresponde a quantidade de IL-2 que induz 50% do máximo de proliferação das CTLL. Os sobrenadantes de cultura de células na presença de mitógenos ou antígeno foram confrontados com a curva e expressos em unidades de IL-2 ou cpm.

II.6.3 - CULTURA MISTA DE LINFÓCITOS (MLR)

Suspensões celulares de linfonodos de camundongos normais HGP e LGP foram utilizados nos experimentos de MLR unidirecional e bidirecional.

II.6.3a - MLR bidirecional.

Foram feitas várias combinações pareadas de linfócitos de camundongos HGP e LGP, ou seja reações intralinhagens (HxH e LxL) ou interlinhagens (HxL) em placas de 96 poços. As reações foram realizadas com $5.10^5 \times 5.10^5$ células em triplicata, num volume de 200 μ l de meio Click modificado.

Após 96 horas de cultura, a proliferação foi medida pela incorporação de 3 HTdR, pulso de 18 horas. O controle positivo foi a estimulação com PHA.

II.6.3b - MLR unidirecional.

5×10^5 células de linfonodos HGP ou LGP (população respondedora) foram cultivadas em presença de igual concentração de células de linfonodos HGP , ou LGP irradiadas com 1650 rad/s (população estimuladora) num volume total de 200 μ l de meio Click modificado.

A proliferação foi medida após 96 horas de cultura, como acima.

II.6.4 - DETERMINAÇÃO DE CÉLULAS FORMADORAS DE PLACAS DE LISE.

Camundongos HGP e LGP foram imunizados com hemácias de carneiro, conforme descrito em II.2.1a. A 100 μ l de concentração apropriada de células do baço desses camundongos retirados 2, 3, 4 , 5 e 10 dias após a imunização, foram adicionados 25 μ l de SE a 10%; 25 μ l de soro normal de cobaias diluído 1:3, como fonte de complemento; 50 μ l de meio de Hanks (PFCdireto) ou 50 μ l de soro de cobaia anti- IgG de camundongo diluído 1:80 (PFC indireto). Volumes de 200 μ l dessas suspensões foram distribuídos em câmaras formadas pela justaposição de 2 lâminas de microscópio, coladas por fita adesiva de dupla face (CUNNINGHAM, 1965). Após 1 hora a 37°C foram contados os halos de lise em cada câmara e feita a correção para n^o de células formadoras de placa por baço.

II.6.5 - DETERMINAÇÃO DE ROSETAS IMUNES.

O número de rosetas formadas por células do baço H_{GP} e L_{GP} foi determinado misturando-se 6×10^6 células esplênicas com $2,4 \times 10^7$ SE e 50 μ l de soro normal de camundongo num volume final de 1 ml com PBS. Após centrifugação a 1000 rpm por 7 minutos e incubação por 4 horas a 4°C, as células foram resuspensas suavemente e o número de rosetas contado em câmaras de Malassez.

II.6.6 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS SECRETORAS DE ANTICORPO ANTI-HoGG POR TÉCNICA DE ELISPOT.

Placas NUNC de 96 poços foram sensibilizadas com 10 μ g/ml de HoGG (50 μ l/poço), incubadas por 2 horas a 37°C e lavadas 3x com PBS pH 7,2. A seguir foram saturadas com 200 μ l/poço de PBS com gelatina a 1% e deixadas na geladeira até o dia seguinte (SEDGWICK & HOLT, 1983).

Quatro camundongos H_{GP} e 4 camundongos L_{GP} imunizados 9 dias antes com HoGG (1mg/ml) + ACF foram sangrados e tiveram seus linfonodos inguinais, braquiais e axilares processados em meio RPMI simples. Após 3 lavagens em meio RPMI simples, as células de cada camundongo foram resuspensas em 1 ml de meio RPMI com 5% FCS e passadas em agulha fina de seringa de 1 ml. As células viáveis foram contadas em Trypan blue e a concentração ajustada para $2,5 \times 10^6$ células/ml.

Em placas de 96 poços preparadas no dia anterior, como descrito no primeiro parágrafo e previamente lavadas 3x com PBS, foram plaqueadas em duplicata, as suspensões celulares (200 μ l/poço) em várias concentrações ($2,5 \times 10^6$ /ml; 5×10^5 /ml; 10^5 /ml e 2×10^4 /ml). Evitando movimentar a placa em

excesso, a mesma foi mantida a 37°C por 2 horas. A seguir foram feitas 5 ou mais lavagens com PBS-Tween, controlando a retirada de todas as células por visualização ao microscópio invertido. Em seguida foram acrescentados 50 µl/poço de anti IgG total de camundongo conjugado com fosfatase alcalina e deixado 1 hora a 37°C, e a seguir foram acrescentados 100 µl/poço do substrato para o ELISPOT { Tampão 2-amino-2-methyl-1-propanol (AMP) + 5 bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (5-BCIP) + agarose 0,6% }. Após 30-45 minutos, a reação foi interrompida com NaOH 1N e feita a contagem dos "spots" em lupa com luz incidente.

II.6.7 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE LINFOCINAS PRODUZIDAS NO DECORRER DA ESTIMULAÇÃO ESPECÍFICA

Em placas de cultura de 24 poços (COSTAR), 1,0 ml de suspensões individuais de linfonodos (10^7 / ml) foram estimulados na presença de 1,0 ml de meio completo, 150 µg/ml HoGG ou 150 µg/ml HoGG + rIL-2.

Os meios condicionados de 24, 48, 72 e 96 horas foram coletados assepticamente e guardados aliquoteados em tubos Eppendorf a -20° C, para dosagem posterior de IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IFN γ .

II.6.7a - Dosagem de Interleucina -2 e Interleucina-4

Para a dosagem das 2 interleucinas foi feito um "pool" dos sobrenadantes de cada linhagem, em cada dia de coleta.

Em placas de 96 poços, foi feito um protocolo para se averiguar na proliferação das CTLL, a influência do monoclonal S4B6 (anti IL-2) e 11B11

(anti IL-4) sobre os meios condicionados e sobrenadante de X-63 secretora de IL-4 murina.

Em poços contendo 100 μ l de meio condicionado ou sobrenadante de X-63 foram misturados 50 μ l de meio de cultura completo, monoclonal S4B6 ou 11B11. Após 30 minutos a 37°C em 5% CO₂, foram acrescentados 50 μ l de células CTLL (2×10^5 /ml) e a seguir as placas voltaram à estufa por mais 24 horas. Nas últimas 6 horas foi feito um pulso com ³HTdR e então as células coletadas no cell harvester e a leitura realizada no cintilador.

II.6.7b - Dosagem de IL-5, IL-6, IL-10 e IFN γ

Para a dosagem destes mediadores foi utilizada a reação de ELISA por captura (SEDGWICH & CZERKINKY, 1992) . Os anticorpos de captura foram empregados na concentração ideal (Tabela I) para o "coating" de placas de ELISA. Após incubação durante a noite e lavagem das placas com PBS, foi adicionada solução bloqueadora (PBS com 1% de gelatina e 0,1% de Tween 20) por 2 horas a 37°C. Após lavagem com PBS, foram aplicados 50 μ l das amostras não diluídas e incubadas por 1 hora a 37°C e 1 hora a temperatura ambiente. As placas foram lavadas em PBS-Tween, colocados 50 μ l do segundo anticorpo biotilado e incubadas por 1 hora a 37°C. Após lavagem e incubação com avidina- alcalino- fosfatase, SIGMA na diluição de 1:4000 em PBS-Tween, por 1 hora a 37°C, seguida por outra lavagem, foi adicionado o substrato PNPP, SIGMA em tampão Tris-NaCl. A reação foi interrompida após 1 hora a temperatura ambiente, pela adição de 50 μ l de NaOH 1N e a leitura realizada em 405 nm.

Tabela I - Anticorpos monoclonais utilizados nas reações de ELISA por captura para dosagem de linfocinas.

Linfocinas	Anticorpo de captura (concentração)	Anticorpo biotilado (concentração)
IFNγ	XMG 1,2 (10 $\mu\text{g/ml}$)	AN18 (4 $\mu\text{g/ml}$)
IL-5	TRFK5 (5 $\mu\text{g/ml}$)	TRFK4 (1 $\mu\text{g/ml}$)
IL-6	20F3 (5 $\mu\text{g/ml}$)	32C1L (10 $\mu\text{g/ml}$)
IL-10	2A5 (2 $\mu\text{g/ml}$)	SXc1 (0,5 $\mu\text{g/ml}$)

II.6.7c - Biotinilação de anticorpos

Um volume de 200 μl de solução de act-Biotina (2 mg/ 0,5 ml) em N-dimethylformamida, SIGMA D- 8654 foi adicionada, sob agitação a solução de anticorpos (10 mg proteína em 10 ml de tampão bicarbonato de sódio 0,2 M pH= 8,8 contendo NaCl 0,15M). Após agitação a 20-25 $^{\circ}\text{C}$ por 5 a 15 minutos, a reação foi interrompida pela adição de 100 ml de NH_4Cl ou PBS por 36 hs a 4 $^{\circ}\text{C}$. Os anticorpos assim biotilados foram aliquotados e congelados a -20 $^{\circ}\text{C}$.

II.7- DETERMINAÇÃO DOS TÍTULOS DE ANTICORPOS

II.7.1- Anticorpos anti-SE

A técnica de hemaglutinação direta em microplacas (SEVERSON & THOMPSON, 1966) foi utilizada para a determinação dos títulos de anticorpos anti SE. A reação foi realizada em placas de fundo em U, misturando-se 25 μl de soro diluído (na razão 2 a partir de soro puro) em salina tamponada (PBS pH 7,2) contendo 0,1% de gelatina , DIFCO e 25 μl de suspensão de eritrócitos

de carneiro, na concentração de 10^8 SE/ml. As placas foram mantidas à temperatura ambiente e a leitura realizada após 2 horas de reação.

Para a dosagem de IgG anti-SE os soros foram tratados com 2 Mercaptoetanol (2-ME) SIGMA 0,2M durante 1 hora e a seguir diluídos e dosados, como acima.

II.7.2 Anticorpos anti HoGG.

A técnica de ELISA por captura foi utilizada para a dosagem de IgG e isotipos específicos IgG1, IgG2a e IgE anti-HoGG.

II.7.2a - Dosagem de IgG total e isotipos IgG1 e IgG2a anti-HoGG.

Solução de HoGG (10 μ g/ml) foi adicionada a microplacas de ELISA (50 ul/poço) e mantidas a temperatura ambiente "overnight". Após bloqueio dos sítios livres com PBS-tween gelatina a 1% foram adicionadas as diluições seriadas dos soros (50 μ l) e incubadas por 2 horas a temperatura ambiente. Após lavagem 3x com PBS-tween foram aplicados os soros de coelho anti-IgG total (SIGMA) ou anti-isotipos IgG₁ ou IgG_{2a} (ZYMED, San Francisco CA) conjugados a fosfatase alcalina, SIGMA. O substrato foi adicionado e a reação lida após 30 minutos em fotômetro Multiskan (Titertek). Os resultados são representados como títulos em \log_2 para os valores de absorbância de 30% dos valores dos níveis máximos de "plateau", comumente usado. Foram dosados soros de animais não imunizados como controle.

II.7.2b - Dosagem de IgE anti-HoGG.

A sensibilização foi feita por 2 horas a 37°C com 50 μ l/poço de solução de anticorpo monoclonal HMK12 de rato (HIRANO et al., 1989) anti-

IgE de camundongo (5 μ g/ml) em microplacas de ELISA, NUNC. O bloqueio foi feito com PBS 1% gelatina a 4 $^{\circ}$ C, durante a noite. As placas foram lavadas 3 vezes com PBS-Tween a 0,05% após dissolução da gelatina a 37 $^{\circ}$ C e a seguir foram aplicadas as amostras diluídas em PBS-Tween e deixadas por 1 hora a 37 $^{\circ}$ C. Após lavagem 3 vezes com PBS-Tween foram colocados 50 μ l/poço de HoGG biotilado (40 μ g/ml) para a dosagem de IgE específico anti-HoGG . Após 1 hora a 37 $^{\circ}$ C, as placas foram lavadas 4 vezes com PBS-Tween e foram adicionados 50 μ l/poço de avidina 1:2000 em PBS-Tween. Depois de 45 minutos a temperatura ambiente, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-Tween e a seguir cobertas com substrato (50 μ l/poço). A reação foi interrompida com NaOH 1N após 1 hora a temperatura ambiente e a leitura feita a 405 nm. Os resultados foram expressos como no item II.7.2a.

II.7.2c - Biotinilação de HoGG

A biotinilação foi feita utilizando 200 μ g de Biotina, SIGMA para 1 mg de proteína. 60 μ l de solução de Biotina (5 mg/ml) foi adicionada a 1,5 ml de HoGG (1 mg/ml em PBS). Após agitação por 1 hora a temperatura ambiente, foi feita diálise contra PBS durante 36 horas. A solução de HoGG (1mg/ml) foi aliquotada e mantida a -20 $^{\circ}$ C.

II.8 - ANÁLISE DE DADOS

A partir dos títulos individuais de aglutininas, expressos em \log_2 da recíproca da maior diluição positiva dos soros, foram calculadas as médias e desvios padrão para cada linhagem de camundongos. O teste "t" de Student foi utilizado para verificar o grau de significância entre as médias.

As unidades de Interleucina 2 contidas nos sobrenadantes das culturas foram determinadas utilizando o método dos probitos.

Os valores de proliferação foram obtidos pela média aritmética de triplicatas (cpm) de culturas individuais, para cada grupo em cada linhagem e expressos como média e erro padrão. O teste de Wilcoxon- Mann-Whitney foi utilizado para calcular a significância das diferenças.

O nível de rejeição para todas as análises estatísticas efetuadas foi de 5%.

III - RESULTADOS

III.1 - ESTUDO DA POTENCIALIDADE DOS LINFÓCITOS T.

III.1.1. - ENSAIOS BIOLÓGICOS DA ATIVIDADE T *in vitro*.

III.1.1a - Proliferação induzida por lectinas.

Os mitógenos PHA e Con A foram utilizados na avaliação da estimulação policlonal de células T.

Tanto a PHA como a ConA são lectinas que se ligam a açúcares presentes na membrana plasmática. A ligação da PHA a resíduos de N-acetilgalactosamina e a ligação da ConA a alfa-D manose ou alfa-D glicose, situados próximos ao receptor de célula T promove a proliferação das células (WEISS, 1989).

Embora esta estimulação não envolva processamento e apresentação, ela necessita de fatores liberados por células acessórias.

Na figura 1 estão representados os valores médios de proliferação e os erros padrão de células de linfonodos de 4 animais HGP e 4 animais LGP frente a doses crescentes de PHA. Não foram encontradas diferenças significativas interlinhagens na capacidade proliferativa destas células, com nenhuma das 3 doses ensaiadas.

A concanavalina A, usada em muitos dos experimentos, como controle, também induziu proliferação semelhante dos linfócitos das duas linhagens.

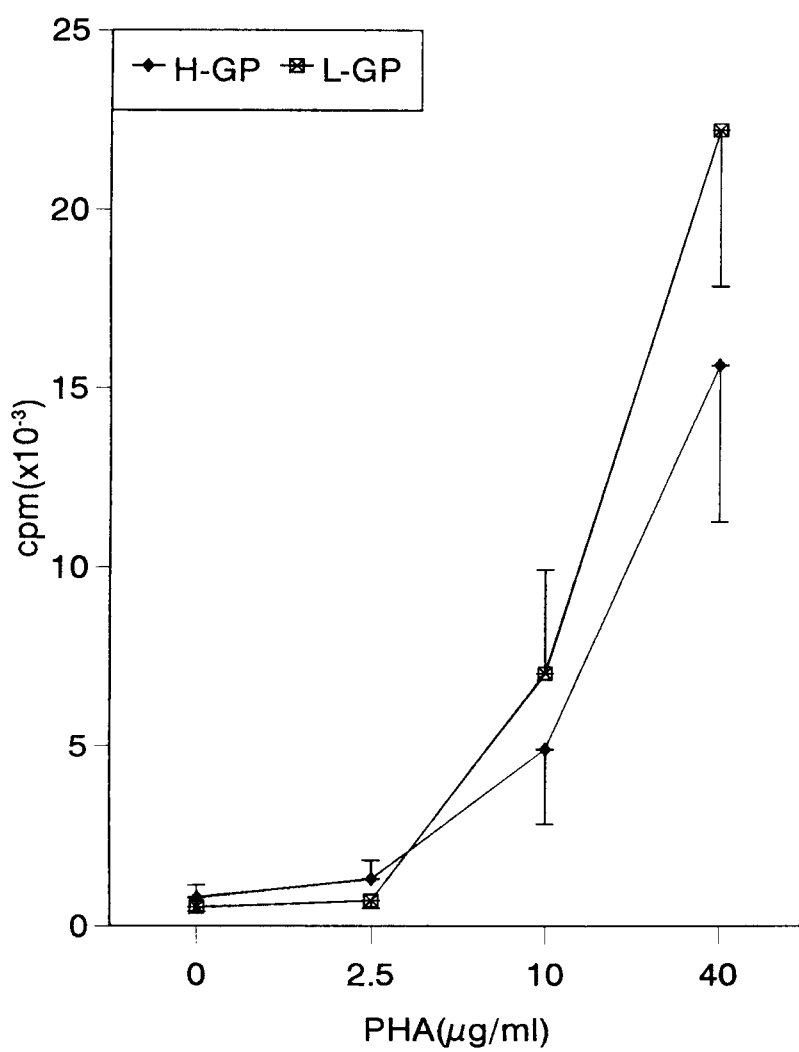


Figura 1 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 4 camundongos HGP e 4 camundongos LGP normais, na presença de doses crescentes de PHA em cultura de 48 horas. Resultados expressos pela média em cpm e erro padrão.

III.1.1b - Proliferação induzida pela Enterotoxina B de Staphylococcus aureus e anticorpo monoclonal anti-CD3.

A enterotoxina B (SEB) induz proliferação T independente de processamento por APC. O melhor tempo de cultura foi determinado previamente., mas dependente da interação entre a região variável do TCR e a região não polimórfica das moléculas do MHC de classe II (HERMAN et al., 1991).

A ativação via anticorpo anti-CD3 promove estímulo semelhante ao do antígeno ocupando o TCR, uma vez que o complexo molecular CD3 é responsável pela transdução do sinal para o interior da célula (MARASHOVSKY et al., 1991).

Células obtidas de linfonodos de 4 camundongos normais H_{GP} e 4 L_{GP} foram estimuladas individualmente com concentrações variadas de SEB durante 72 horas (Figura 2).

Suspensões celulares dos mesmos animais foram estimuladas individualmente com diluições seriadas do monoclonal anti-CD3 durante 48 horas (Figura 3). O melhor tempo de cultura foi determinado previamente.

Podemos observar que tanto frente ao SEB como com anti-CD3 não foram observadas diferenças significantes entre as 2 seleções de animais.

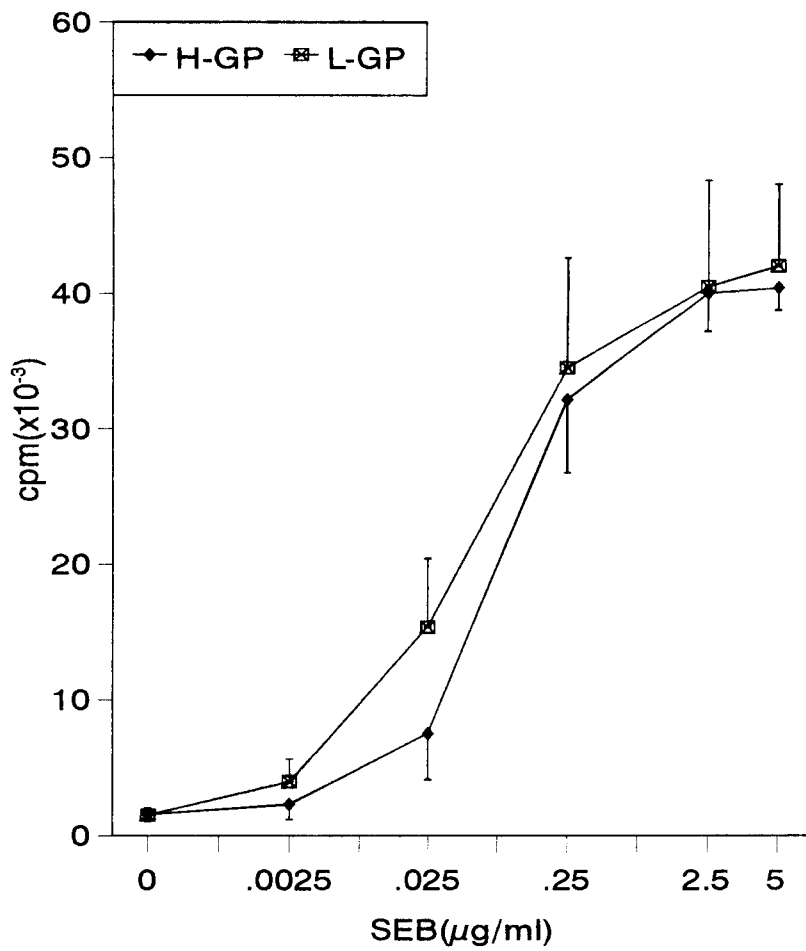


Figura 2 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 4 camundongos HGP e 4 LGP normais na presença de doses crescentes de SEB em cultura de 72 horas. Resultados expressos pela média em cpm e erro padrão.

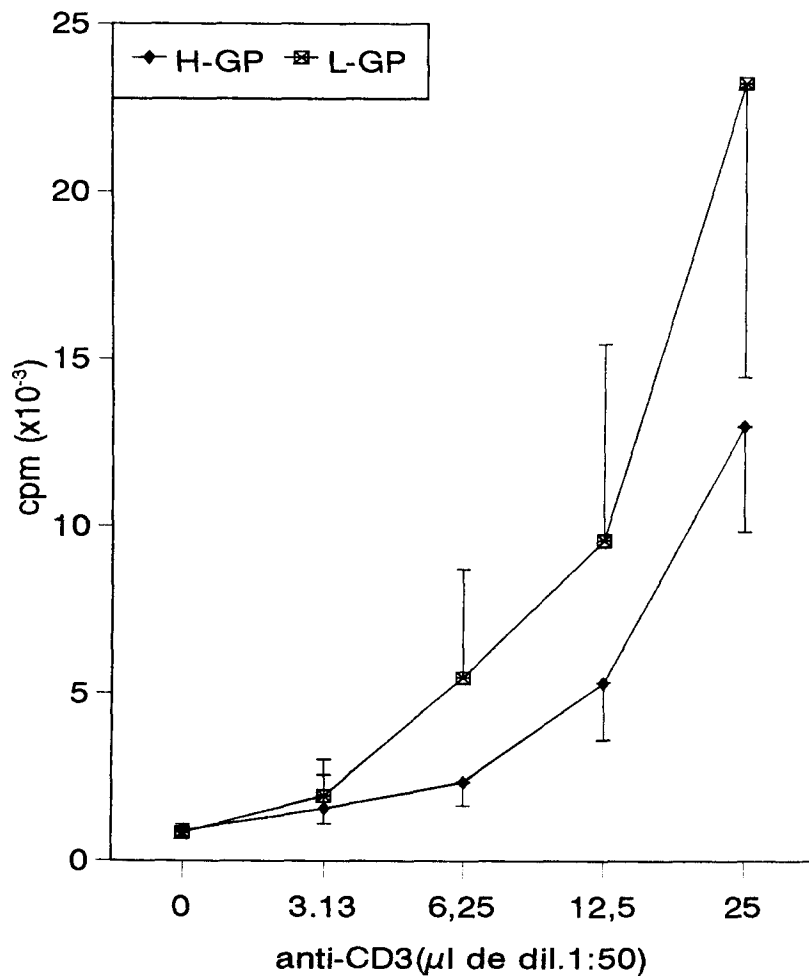


Figura 3 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 4 camundongos HGP e 4 LGP normais , na presença de várias diluições do anticorpo monoclonal anti- CD3 em cultura de 48 horas. Resultados expressos pela média aritmética das cpm e erro padrão.

III.1.1c - Proliferação específica induzida por HoGG.

Suspensões celulares individuais obtidas dos linfonodos axilares, braquiais e inguinais de camundongos H_{GP} e L_{GP}, imunizados previamente com 100 ug de HoGG em adjuvante completo de Freund, como descrito em II.2.2, página 12, foram cultivadas na presença de concentrações crescentes de HoGG (1 a 200 ug/ml). Os linfonodos foram coletados aos 4 dias e entre 7 a 10 dias pós-imunização.

Para verificar se havia diferença no período inicial na estimulação específica interlinhagens, foi feito um experimento com suspensões de células ganglionares de camundongos H_{GP} e L_{GP} coletadas no quarto dia pós-imunização. Não houve diferença entre o controle e as reações em todas as doses estudadas em cultura de 96hs. Portanto, no 4^o-dia pós-imunização não deve existir um número de células responsivas ao HoGG, que garanta proliferação *in vitro*.

A figura 4 mostra a curva de proliferação específica de suspensões celulares obtidas 7 a 10 dias após a imunização dos animais. O máximo de proliferação específica foi alcançado nas 96 hs de cultura.

Em ambas as linhagens observamos proliferação dependente da dose do antígeno, porém a intensidade da resposta de H é muito maior do que a dos L, que inclusive não responde às doses mais baixas do antígeno. Pelo fato dos animais terem sido imunizados, existe um nível de estimulação basal que também é significativamente maior nos H_{GP}.

A inibição provocada pelo monoclonal GK 1.5 na cultura com HoGG (200 ug/ml) pode ser vista na figura 5 e foi dependente da dose do inibidor, sendo que altas doses do monoclonal foram necessárias para a inibição dos linfócitos de H_{GP}.

III.1.1d - Proliferação específica induzida por RGG.

Suspensões celulares individuais de linfonodos de camundongos imunizados previamente com RGG foram cultivadas na presença de doses crescentes deste antígeno (33 a 330 $\mu\text{g/ml}$).

A figura 6 mostra que para a linhagem H ocorre proliferação dose dependente enquanto que a linhagem L responde pobremente, mesmo com as maiores doses de RGG. A inibição provocada pelo monoclonal GK 1.5 pode ser vista na figura 7.

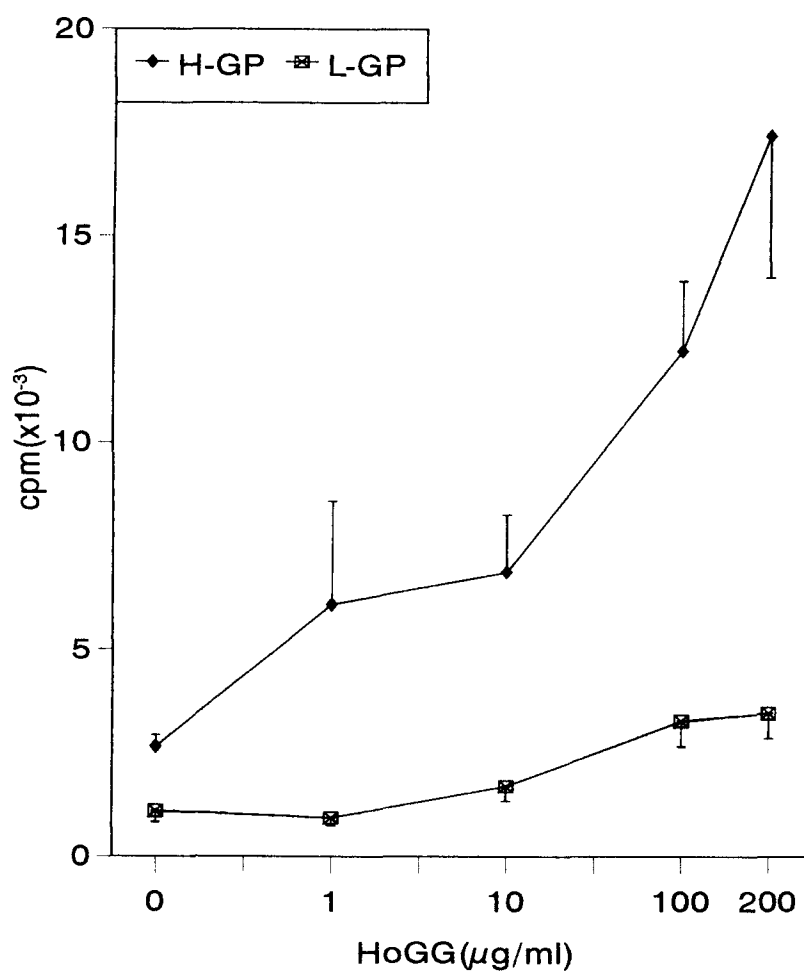


Figura 4 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 9 camundongos H_{GP} e 9 L_{GP} imunizados 9 dias antes com HoGG, na presença de doses crescentes de HoGG em cultura de 96 hs. Resultados expressos pela média em cpm e erro padrão.

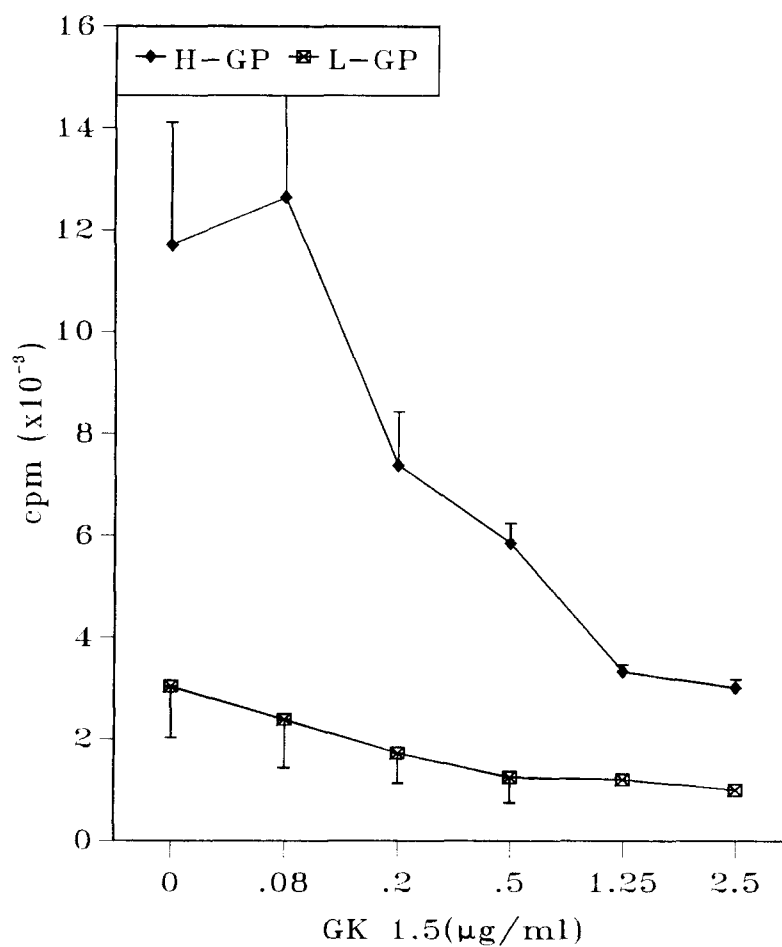


Figura 5 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 9 camundongos HGP e 9 LGP imunizados previamente com HoGG, na presença de HoGG (200 ug/ml) e concentrações crescentes do anticorpo monoclonal GK 1.5. Resultados expressos em cpm e erro padrão.

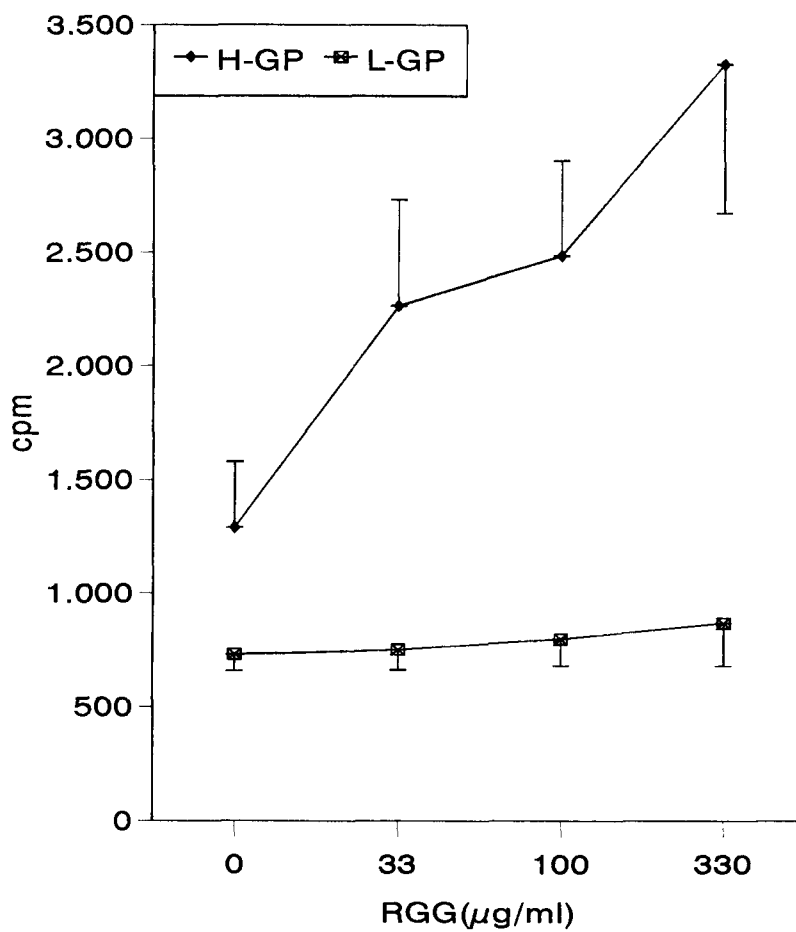


Figura 6 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 4 camundongos HGP e 4 LGP imunizados previamente com RGG(9 dias antes), na presença de concentrações crescentes de RGG em cultura de 96 hs. Resultados expressos pela média e erro padrão.

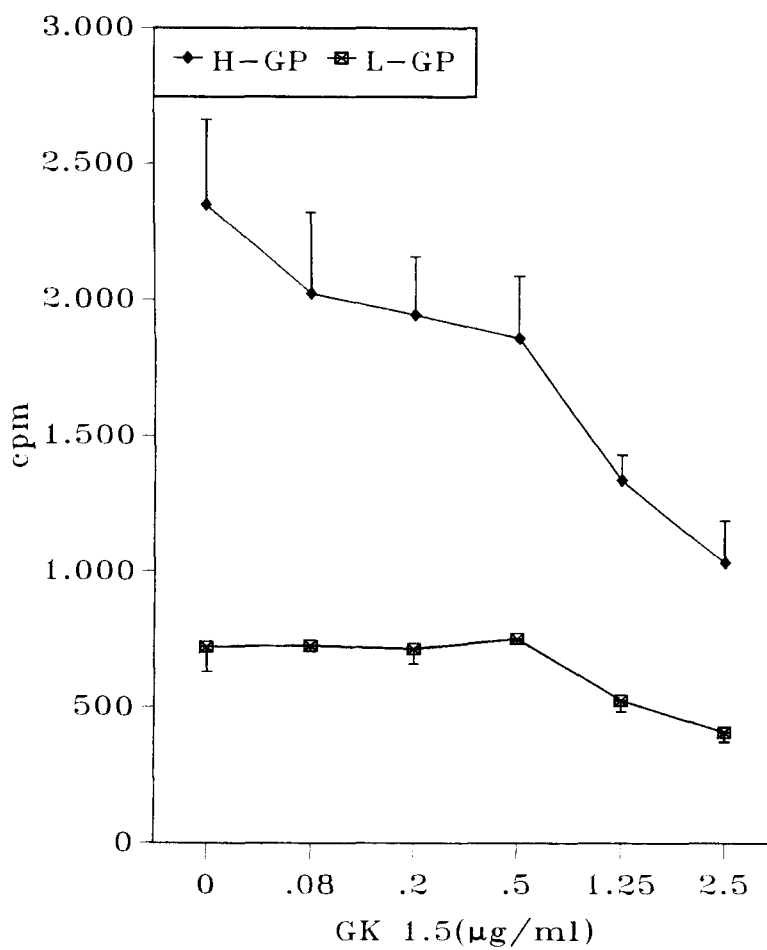


Figura 7 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 4 camundongos HGP e 4 LGP imunizados previamente com RGG, na presença de RGG (330 µg/ml) e doses crescentes do anticorpo monoclonal GK 1.5. Resultados expressos pela média das cpm e erro padrão.

III.1.1e - Proliferação induzida por IL-2 recombinante.

Fatores limitantes de proliferação podem ser a baixa produção de interleucina-2 e/ou a expressão de receptores de IL-2 (IL-2R) de alta afinidade.

Para verificar possíveis diferenças interlinhagens ao nível de expressão de IL-2R realizamos experimentos de proliferação de linfócitos de animais previamente imunizados com HoGG, adicionando concentrações variadas de rIL-2 (3,3 a 1000 U/ml).

A figura 8 concentrações iguais ou menores que 33 U não induzem proliferação das células de HGP ou LGP e à medida que se adicionou concentrações maiores de rIL-2 houve um grande aumento na proliferação em todas as culturas. Embora os HGP tendam a apresentar maior proliferação que os LGP frente a doses altas de rIL-2, as diferenças não chegam a ser significativas.

A adição de HoGG em dose subestimulante (10 µg/ml) não alterou o perfil de estimulação induzido pela IL-2 exógena.

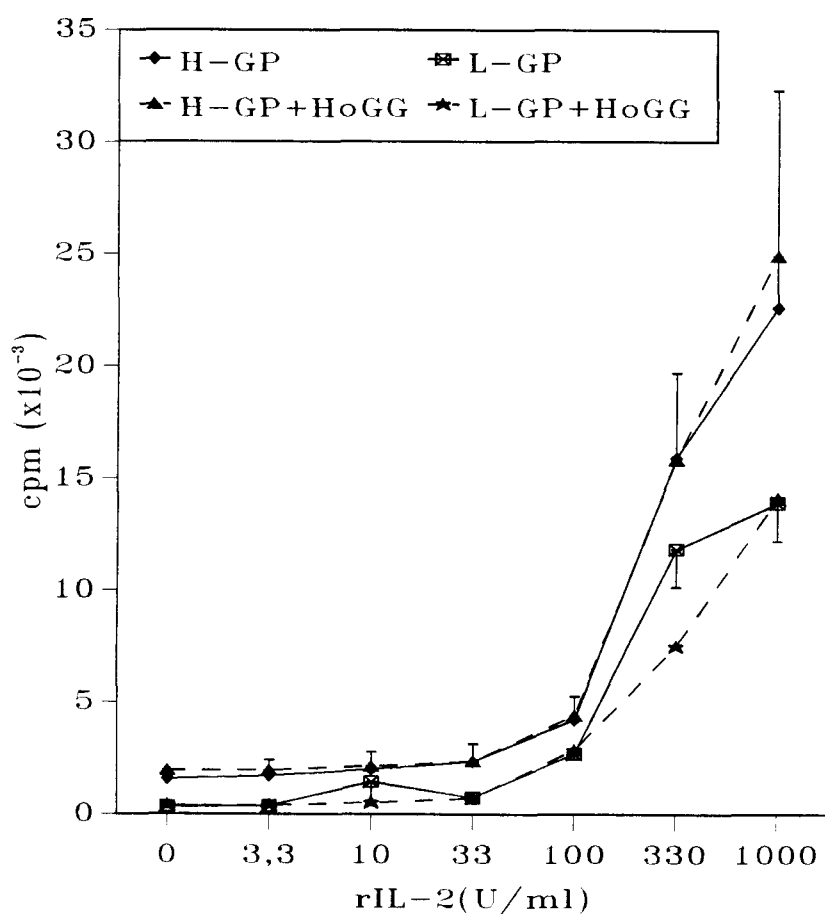


Figura 8 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 4 camundongos HGP e 4 LGP imunizados previamente com HoGG na presença de doses crescentes de rIL-2 e com adição ou não de dose subestimulante do antígeno (HoGG 10 µg/ml). Resultados expressos pelas médias aritméticas das amostras individuais.

III.1.1f - Atividade de Interleucina-2 presente nos sobrenadantes.

A figura 9 mostra a proliferação (cpm) de células CTLL na presença de meios condicionados de culturas de 24 horas de linfócitos ganglionares estimulados com SEB, anti-CD3 e HoGG.

A quantidade de IL-2 presente nos sobrenadantes verificada pela proliferação das CTLL aumentou com o aumento da concentração do SEB (figura 9a) ou HoGG (figura 9c). Nas culturas com anti-CD3, o meio condicionado de 24 horas permitiu a detecção de IL-2, apenas nas maiores concentrações do monoclonal (figura 9b).

Enquanto para o SEB e anti-CD3 não houve diferença significativa quanto a atividade de IL-2 produzida pelas linhagens HGP e LGP, na resposta específica ao HoGG a produção de IL-2 pelo HGP foi maior, havendo uma associação entre proliferação específica e produção de IL-2 com todas as doses estudadas.

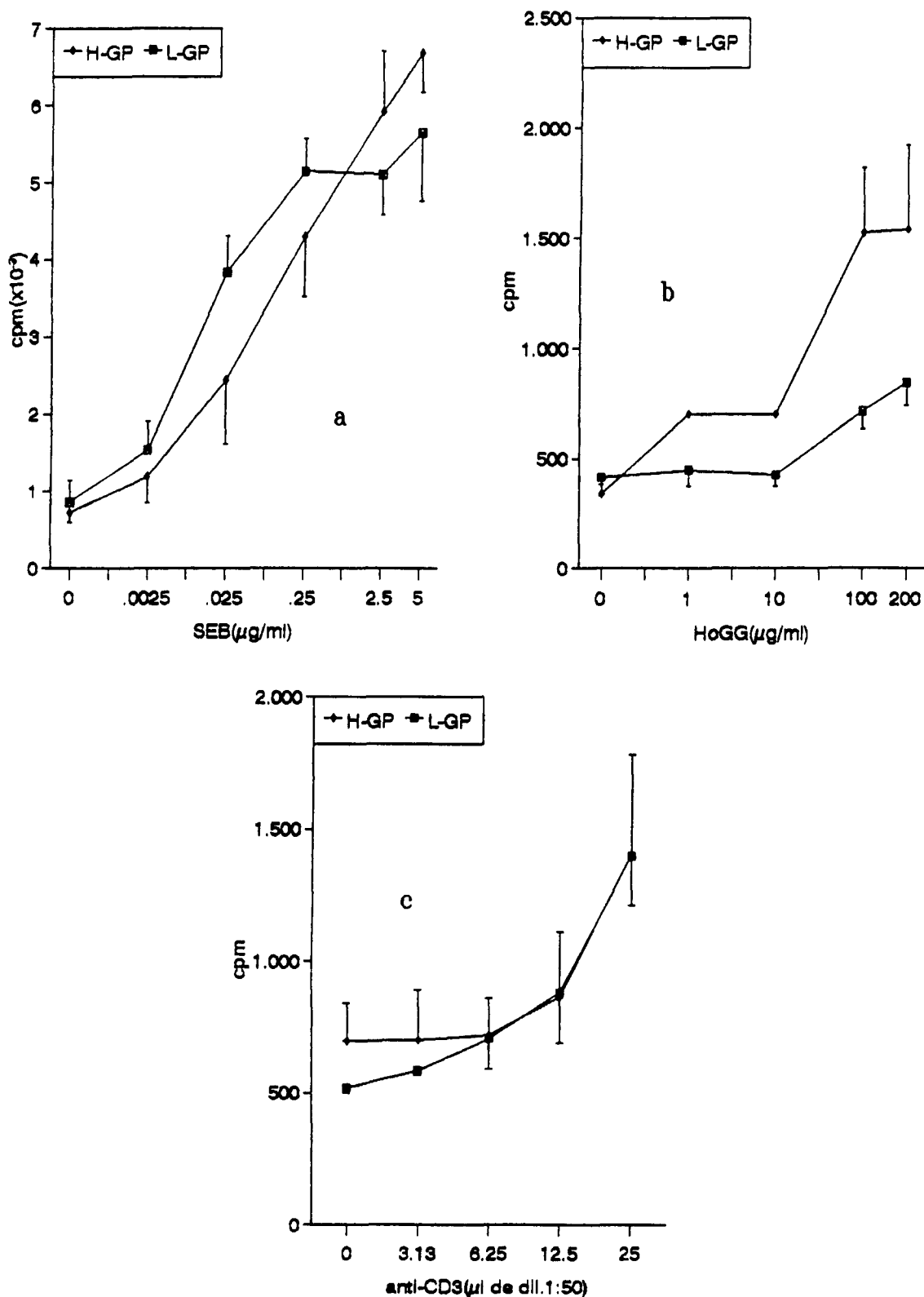


Figura 9 - Proliferação de células CTLL em culturas de 24 horas na presença de meios condicionados obtidos pela cultura *in vitro* de linfócitos ganglionares de 6 camundongos H_{GP} e 6 camundongos L_{GP} com diversas concentrações de : a) SEB ; b) anti-CD3; c) HoGG. Resultados expressos pelas médias dos cpm e erro padrão das amostras individuais.

III.1.1g - Cultura mista de linfócitos .

Além da ativação policlonal por mitógenos, uma outra maneira de se avaliar proliferação de células T que não foram sensibilizadas *in vivo* é através da resposta a aloantígenos de membrana, na cultura mista de linfócitos (MLR).

Na MLR bidirecional, os maiores valores de cpm aconteceram nas culturas H x L e também nas culturas H x H. Isso indica que os animais H utilizados neste experimento, não são isogênicos enquanto os animais L podem estar mais próximos com relação ao H-2 (Tabela 1).

Os resultados de cultura mista unidirecional de 4 camundongos H e 4 camundongos L, obtidos em 32 diferentes combinações H_{GP} x L*_{GP} irradiados ou L_{GP} x H*_{GP} irradiados, mostram que existe uma maior resposta dos linfócitos H_{GP} aos aloantígenos de linfócitos L*_{GP} irradiados do que o inverso (Tabela 2).

Portanto, além de se comportarem diferentemente em relação a resposta específica ao antígeno utilizado no processo de imunização, as duas linhagens da seleção GP parecem diferir também na resposta a aloantígenos, que independe de processamento.

Tabela 1 - Cultura mista bidirecional de linfócitos ganglionares de camundongos H_{GP} e camundongos L_{GP}.

HxH		HxL		LxL		H		L	
\bar{x}	Ep	\bar{x}	Ep	\bar{x}	Ep	\bar{x}	Ep	\bar{x}	Ep
35.700	7.700	47.000	14.000	7.900	1.300	1.290	700	1.100	460
19.000	5.000	22.000	4.800	4.500	1.200	250	80	600	280
32.000	9.300	32.000	4.400	1.200	200	500	120	200	50

Resultados em cpm e erro padrão de combinações HxH; HxL; LxL e controles H e L, onde foram utilizados 4 animais de cada linhagem em cada um dos 3 experimentos independentes.

Tabela 2 - Cultura mista unidirecional de linfócitos ganglionares de 4 camundongos H_{GP} e 4 camundongos L_{GP}.

Células Respondedoras	Células Estimuladoras				
	L ₅ *	L ₆ *	L ₇ *	L ₈ *	-
H ₁	1858	1080	1034	1644	669
H ₂	11586	9852	7487	15879	181
H ₃	7156	12711	10111	18933	426
H ₄	5249	2041	2897	2613	699
	H ₁ *	H ₂ *	H ₃ *	H ₄ *	-
L ₅	358	570	579	1606	85
L ₆	270	738	688	742	215
L ₇	505	2341	2057	1743	140
L ₈	1893	4235	4284	3718	321

Resultados em cpm de células respondedoras (H₁, H₂, H₃, H₄, L₅, L₆, L₇, L₈) contra células estimuladoras (L₅*, L₆*, L₇*, L₈*, H₁*, H₂*, H₃*, H₄*).

III.2 - ESTUDO DA POTENCIALIDADE DOS LINFÓCITOS B.

III.2a - Resposta de H_{GP} e L_{GP} a imunização com SE: Determinação de células formadoras de placas de lise e rosetas no baço e dosagem de anticorpos circulantes anti-SE.

O número de rosetas e de células secretoras de anticorpos anti-SE foi determinado em camundongos H_{GP} e L_{GP} em diferentes intervalos de tempo após imunização com uma injeção de 5×10^8 SE por via endovenosa.

O número de células do baço, que fazem roseta com SE aumentou progressivamente até o máximo no 5^o dia de imunização, quando o número de rosetas de H_{GP} foi 17 vezes maior que o dos L_{GP} (Figura 10 b).

O número de células secretoras de IgM (PFC diretas) alcançou o máximo também no 5^o dia, para as 2 linhagens. O número de PFC/ baço na linhagem H_{GP} foi cerca de 300 vezes superior ao da linhagem L_{GP} (Figura 10a).

Células secretoras de IgG (PFC indiretas) foram evidenciadas a partir do 5^o dia e o número de PFC nos H_{GP} foi 455 vezes maior do que o dos L_{GP} (Figura 10 a).

A produção de anticorpos circulantes avaliada por hemaglutinação obedeceu o mesmo padrão de resposta do baço.. Títulos altos de anticorpos IgG foram encontrados apenas nos camundongos bons respondedores. Nos maus respondedores os títulos foram insignificantes, semelhantes ao dos controles, mostrando a deficiência dos L_{GP} na produção desta classe de anticorpos neste esquema de imunização.

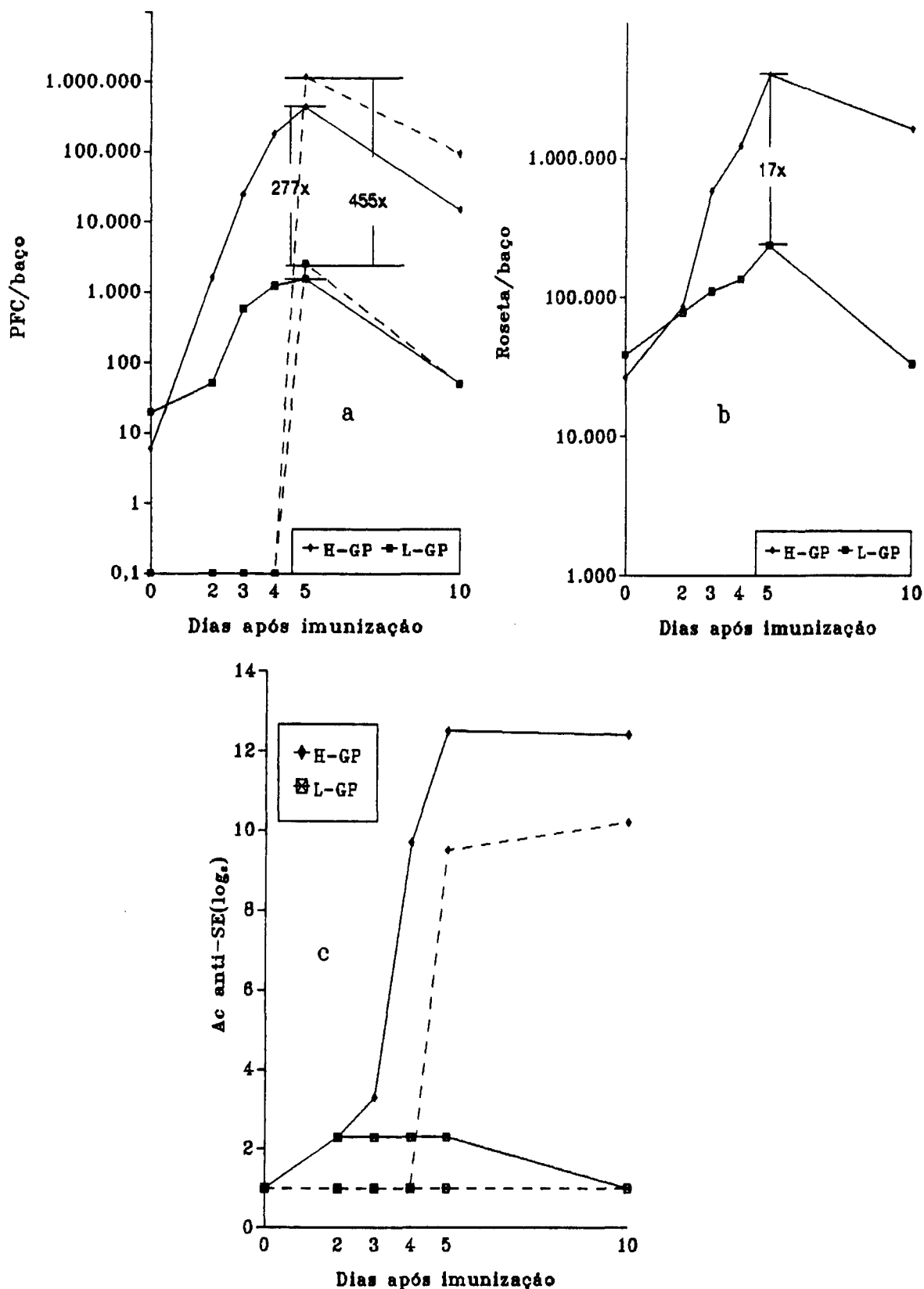


Figura 10 - Curva temporal do aparecimento de PFC, Rosetas e anticorpos anti-SE no baço e soro de camundongos H_{GP} e L_{GP} imunizados com SE. a) Determinação do número de PFC direta (—) e indireta (---). b) Determinação do número de rosetas. c) Determinação do título de anticorpos: total (—) e IgG (---).

III.2b - Resposta de H_{GP} e L_{GP} a Imunização com HoGG: Determinação do número de células secretoras de anticorpos anti-HoGG nos linfonodos por técnica de ELISPOT e dosagem de IgG anti-HoGG no soro por ELISA.

O número de células ganglionares secretoras de anticorpos anti-HoGG foi determinado em 4 camundongos H_{GP} e 4 camundongos L_{GP} imunizados 9 dias antes com HoGG em CFA.

O ensaio de ELISPOT realizado individualmente, utilizando número variado de células mostrou que os camundongos H_{GP}, de uma maneira bastante homogênea apresentam maior número de células secretoras de anticorpos anti-HoGG do que os L_{GP}. A média do número de células secretoras de anticorpos/ 10⁶ células ganglionares é cerca de 8 vezes maior nos camundongos H_{GP} do que nos L_{GP} (Tabela 3).

Tabela 3 - Determinação do número de células secretoras de anticorpos anti-HoGG por técnica de ELISPOT .

Cam.	Número de células plaqueadas				\bar{x} /10 ⁶	$\bar{x} \pm sd$
	4x10 ³	2x10 ⁴	10 ⁵	0,5x10 ⁶		
H1	3,3(750)	12(600)	64(640)	>>	663	723± 165
H2	3,3(750)	13(650)	64(640)	>>	680	
H3	3,3(750)	26(1300)	84(840)	>>	963	
H4	1,3(325)	16(800)	63(630)	>>	585	
L5	0	0	2,5(25)	21(42)	34	87± 73
L6	0	0	2(20)	22(44)	32	
L7	0	1(50)	11(110)	65(130)	97	
L8	0	3,25(163)	21(210)	96(192)	188	

O número entre parêntesis = número de células secretoras de anticorpos em 10⁶ células ganglionares

O soro desses mesmos animais analisados por ensaio de ELISA mostrou que o título de anticorpos anti-HoGG foi também cerca de 8 vezes maior nos H_{GP} do que nos L_{GP} (Figura 11).

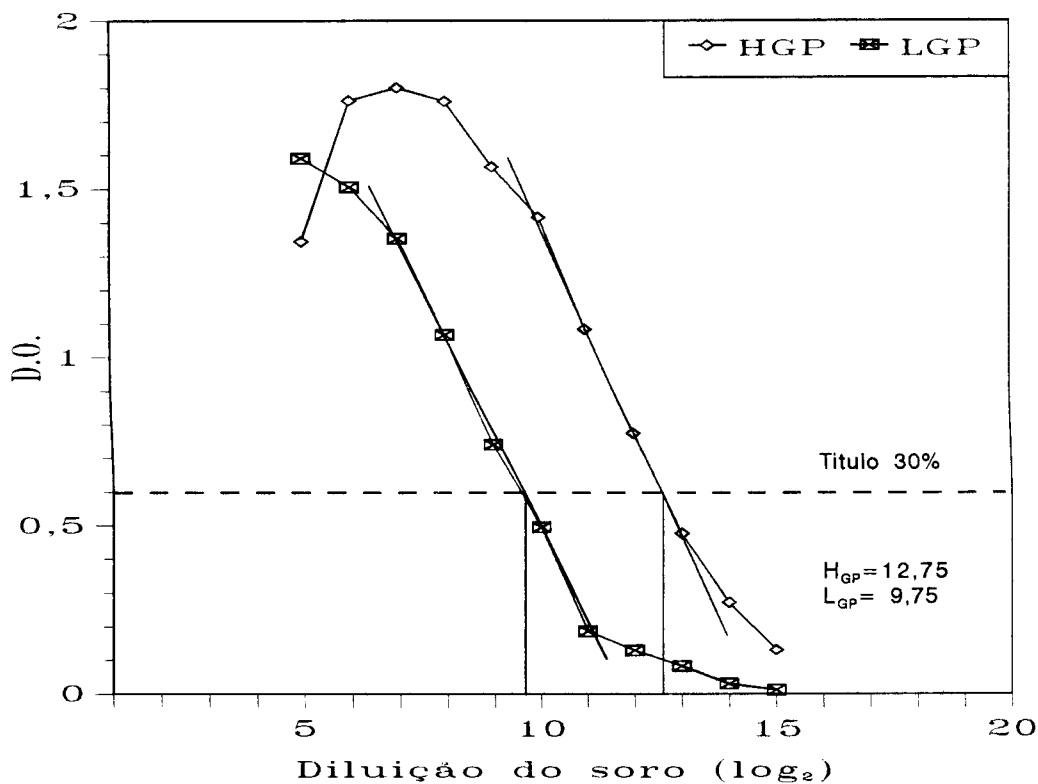


Figura 11 - Dosagem de IgG total anti-HoGG por ensaio de ELISA por captura no pool de soros de camundongos H_{GP} e L_{GP} imunizados previamente com HoGG+CFA.

III.3 - MODULAÇÃO DA RESPOSTA DE ANTICORPOS ANTI-SE POR SEB.

A partir dos resultados da diferente potencialidade dos linfócitos B de H_GP e L_GP evidenciada pelo aparecimento de PFC e anticorpos anti-SE e também do alto efeito mitogênico do SEB sobre linfócitos T provenientes destes animais, resolvemos estudar o efeito *in vivo* deste mitógeno sobre a produção de anticorpos anti-SE.

Grupos equivalentes de camundongos das linhagens H_GP e L_GP (5 animais/grupo) receberam injeção i.p. de 50 µg de SEB, dez minutos antes da injeção i.v. de 5×10^8 SE. Os grupos controles receberam apenas SE.

A tabela 4 mostra os resultados dos títulos de anticorpos anti-SE (\log_2) de 3 animais H_GP e 2 L_GP após 5, 12 e 19 dias de imunização. Os demais animais não foram considerados porque morreram antes do término do experimento ou estavam muito debilitados em consequência dos efeitos tóxicos do SEB. Enquanto nos camundongos H_GP não ocorreu alteração dos níveis de anticorpos anti-SE produzidos, nos camundongos L_GP foi evidente a modulação da resposta anti-SE dos animais tratados, que passaram a produzir anticorpos do tipo IgG.

Tabela 4 - Cinética da produção de anticorpos anti-SE em camundongos imunizados com eritrócitos de carneiro após tratamento com SEB.

		Título de anticorpos anti-SE (log2)					
		Dias após imunização					
Linagem	SEB	5 dias		12 dias		19 dias	
		Total	2-MeR	Total	2-MeR	Total	2-MeR
HGP	-	9	2	9	9	10	7
	-	10	2	9	11	7	8
	+	10	2	12	13	11	13
	+	9	<2	12	13	10	10
	+	7	<2	8	9	8	8
LGP	-	5	<2	2	<2	2	<2
	-	4	<2	2	<2	2	<2
	+	6	4	7	7	7	8
	+	5	3	6	4	8	6

III.4 - AVALIAÇÃO DA ESTIMULAÇÃO DAS SUBPOPULAÇÕES TH1 e TH2 DE HGP E LGP POR ANTÍGENO PROTÉICO.

III.4.1- PERFIL DE LINFOCINAS SECRETADAS EM CULTURA.

Nossos resultados indicam que a resposta dos LGP contra antígenos timo dependentes é prejudicada em decorrência de uma estimulação específica insuficiente do compartimento T.

Com o objetivo de analisar se esta deficiência está associada à participação das subpopulações TH1 e TH2 na resposta específica de HGP e LGP, estudamos o perfil de linfocinas secretadas por linfócitos sensibilizados após estimulação específica *in vitro*.

Suspensões individuais de linfócitos de 6 animais HGP e 6 animais LGP foram cultivadas com 150 µg de HoGG previamente determinada como dose estimulante (Figura 4), em placas de 24 poços, em alíquotas de 10^7 células/poço, num volume final de 2 ml. Em suspensões provenientes de 3 camundongos de cada linhagem foi adicionada também à cultura 10 U/ml de rIL-2 (dose subestimulante, conforme figura 8), com o objetivo de avaliar um provável efeito coestimulador para a secreção de outras linfocinas.

A proliferação das várias suspensões celulares foi controlada em cultura em placas de 96 poços após 96 horas de estimulação específica (Figura 12) e os níveis das diferentes interleucinas foram avaliados nos sobrenadantes coletados nas 24, 48, 72 e 96 horas de cultura.

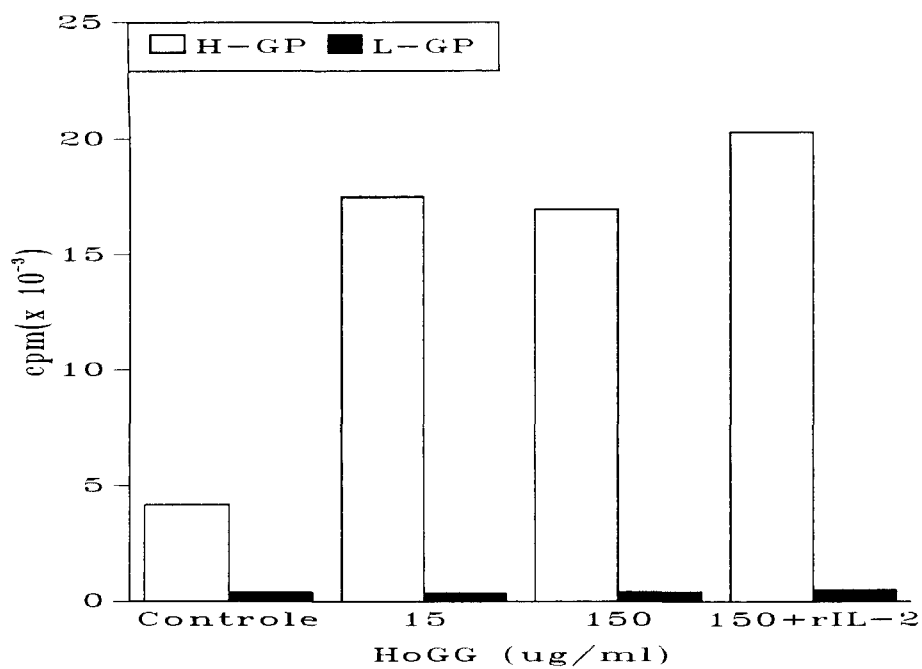


Figura 12 - Proliferação *in vitro* de linfócitos ganglionares de 6 camundongos HGP e 6 LGP previamente imunizados com HoGG, na presença de HoGG e também HoGG + rIL-2, durante 5 dias .

III.4.1a - Dosagem de Interferon gama.

O ensaio de ELISA por captura foi padronizado empregando IFN_γ murino e o método se mostrou sensível para determinar concentrações de IFN_γ na faixa de 8 a 125 ng/ml (Figura 13).

Na tabela 5 estão representadas as concentrações de IFN_γ nos sobrenadantes de cultura de linfócitos de camundongos H e L de 1 a 4 dias após estimulação antigênica. Todos os sobrenadantes de 4 dias dos HGP são positivos para IFN_γ , enquanto apenas um dos sobrenadantes dos LGP testados foi positivo. O máximo de produção do fator acontece aos 3 e 4 dias de cultura. Foi interessante observar o efeito da adição da dose submitogênica de rIL-2; níveis consideráveis de IFN_γ foram detectados nos sobrenadantes das culturas de linfócitos de HGP já a partir do primeiro dia. Com o sobrenadante dos LGP este fenômeno não foi evidente.

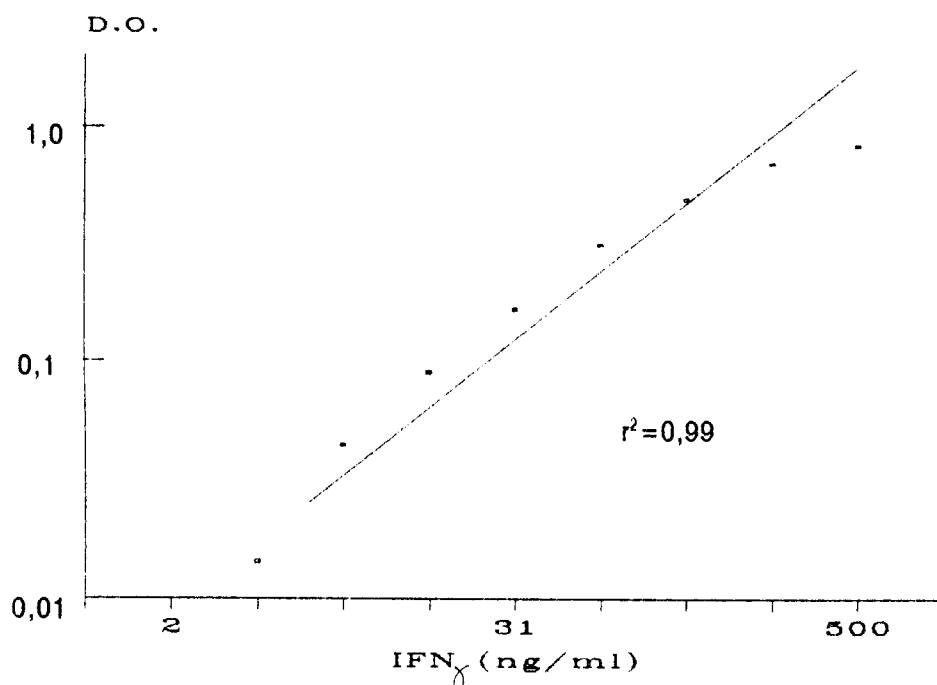


Figura 13 - Curva padrão de IFN_γ recombinante murino, estabelecida em ensaios de ELISA com o emprego dos anticorpos monoclonais XMG 1.2 e AN 18 anti- IFN_γ murino.

Tabela 5 - Dosagem de IFN γ em sobrenadantes de cultura de linfócitos HGP e LGP estimulados especificamente com HoGG.

Linhagem	Camundongo número	rIL-2 10 U	IFN γ ng/ml Dias de cultura			
			1	2	3	4
HGP	1	-	<8	9,3	12,5	16,2
	2	-	<8	<8	<8	10,7
	3	-	<8	<8	<8	11,1
	4	+	12,2	15,6	19,5	13,8
	5	+	10,4	12,2	15,1	13,3
	6	+	11,2	11,9	20,4	39,8
LGP	7	-	<8	<8	NR	NR
	8	-	<8	<8	11,9	NR
	9	-	<8	12,9	27,9	<8
	10	+	<8	<8	<8	9,6
	11	+	<8	NR	NR	<8
	12	+	<8	<8	<8	<8

Sobrenadantes controle negativos para IFN γ

III.4.1b - Dosagem de IL-5 e IL-6.

A curva padrão de rIL-5 está representada na fig. 14, indicando que o teste é sensível para detectar concentrações de 1 a 50 ng/ml desta interleucina. O ensaio para IL-6 com a rIL-6 murina onde o método se mostrou sensível para dosagem de concentrações acima de 0,3 ng/ml, está representado na figura 15. Não foi detectada IL-5, nem IL-6 nos sobrenadantes de linfócitos de HGP e LGP estimulados com HoGG em nenhum dos tempos e condições analisados.

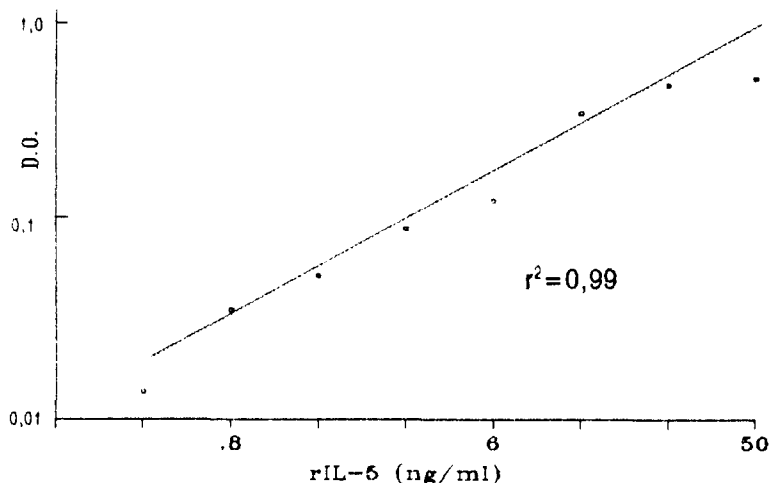


Figura 14 - Curva padrão de IL-5 recombinante murino estabelecida em ensaios de ELISA com emprego de anticorpos monoclonais TRFK 4 e TRFK 5 anti-IL-5.

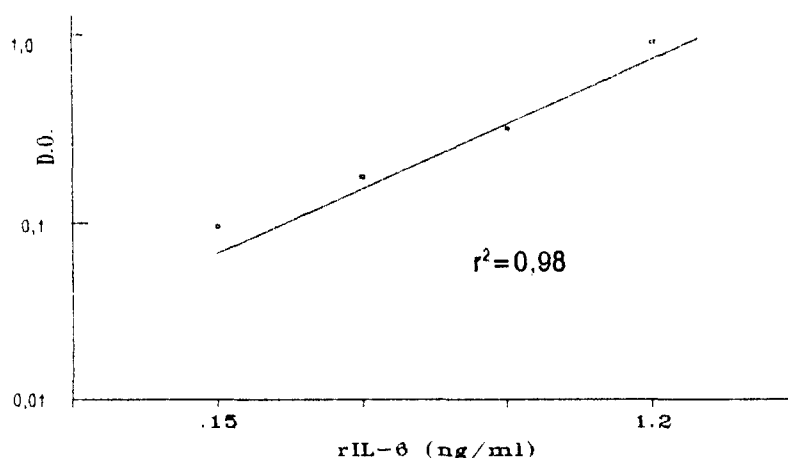


Figura 15 - Curva padrão de IL-6 recombinante murino estabelecida em ensaios de ELISA com emprego de anticorpos monoclonais 20F3 e 32C11.

III.4.1c - Dosagem de IL-10.

As dosagens de IL-10 foram realizadas no Laboratório de Imunologia Celular do Instituto de Ciências Biomédicas da USP.

O efeito da rIL-2 adicionada às culturas provocou antecipação do aparecimento de IL-10 nos bons respondedores. O ensaio de IL-10 realizado no “pool” de sobrenadantes de cultura estimulados especificamente não detectou sua presença nos maus respondedores em qualquer tempo, mesmo na presença de rIL-2.

Tabela 6 - Dosagem de IL-10 no sobrenadante de cultura de linfócitos de HGP e LGP estimulados especificamente com HoGG.

		IL-10 (ng/ml), horas de cultura			
Linhagem	rIL-2(10U)	24 hs	48 hs	72 hs	96 hs
HGP	-	<3	<3	<3	11,35
LGP	-	<3	<3	<3	<3
HGP	+	<3	5,48	10,45	
LGP	+	<3	<3	<3	

III.4.1d - Dosagem de IL-2 e IL-4.

A estimativa dos níveis de IL-2 e IL-4 presentes nos sobrenadantes foi feita pelo ensaio biológico de estimulação de células CTLL.

A figura 16a mostra as curvas de proliferação da CTLL frente a concentrações variadas de IL-2 recombinante humana e de sobrenadante de cultura de célula X63 transformada, que carrega o gene de IL-4 murino. A presença de IL-4 neste sobrenadante foi confirmada pelo alto poder inibitório do anticorpo monoclonal anti IL-4 murino, proveniente de sobrenadante de cultura do hibridoma 11B11.

Foram feitos "pools" dos sobrenadantes das culturas individuais dos animais H e L colhidos após 1, 2 e 3 dias de estimulação com HoGG em cultura. A 10^4 CTLL/poço foram adicionados 50 ul dos sobrenadantes num volume final de 200 ul. A culturas suplementares foi adicionado anticorpo anti IL-2 murino (sobrenadante do hibridoma S4B6) e/ou anticorpo anti IL-4 (hibridoma 11B11). Os resultados estão apresentados na figura 16b e tabela 7.

É evidente a diferença na produção de IL-2 por linfócitos de H_{GP} e L_{GP}. O máximo da resposta de H_{GP} acontece nas primeiras 24 horas de cultura e a presença de IL-2 é confirmada pela inibição total da resposta da CTLL quando o anticorpo anti IL-2 é adicionado à cultura (Figura 16b).

Apesar da completa inibição por anti IL-2, foi verificada também uma redução da resposta da CTLL ao sobrenadante de culturas do H_{GP} de 24 e 48 horas, por anticorpo anti IL-4. Este efeito pode ser indicativo da presença de IL-4 nos sobrenadantes, provavelmente em concentrações que seriam insuficientes por si só para estimular as CTLL, mas que teriam efeito sinérgico com IL-2.

Nos sobrenadantes das culturas dos linfócitos de L_{GP}, os níveis de IL-2 detectados foram baixos, pouco superiores ao limite de sensibilidade do método.

Tabela 7 - Concentração de Interleucina 2 no Sobrenadante de cultura de linfócitos pré-sensibilizados de H_{GP} e L_{GP} após estimulação *in vitro* com HoGG.

Unidades de IL-2/ml		
Tempo (horas) de estimulação <i>in vitro</i>	H _{GP}	L _{GP}
24	1,26	0,18
48	0,28	0,18
72	0,08	0,18

* Unidades de IL-2 determinadas pelo método dos probitos.

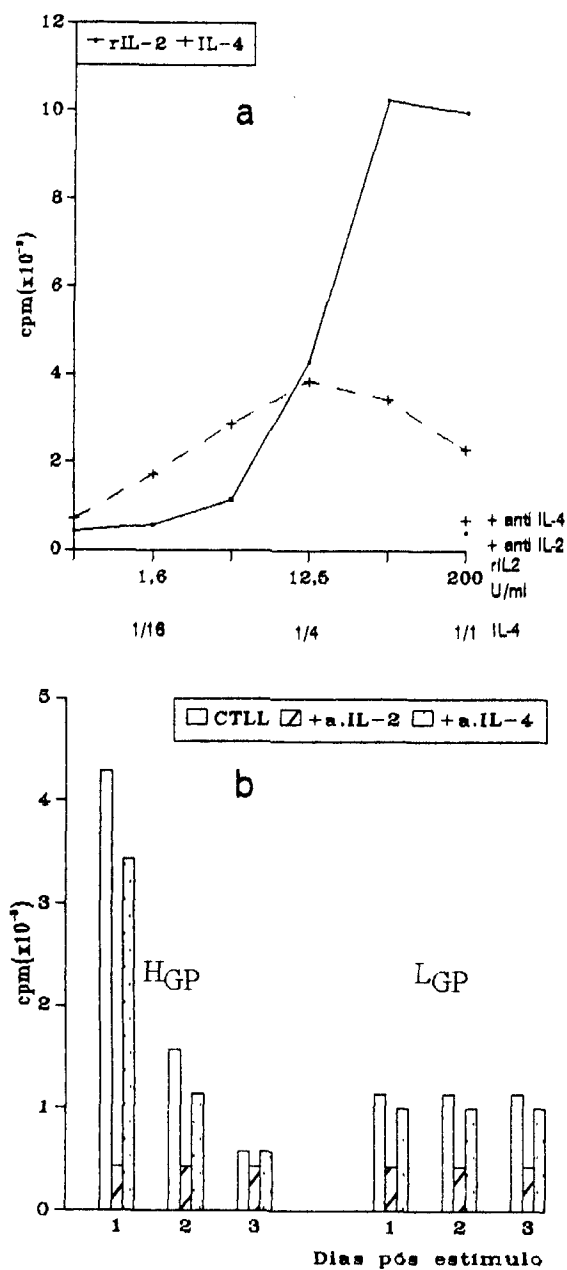


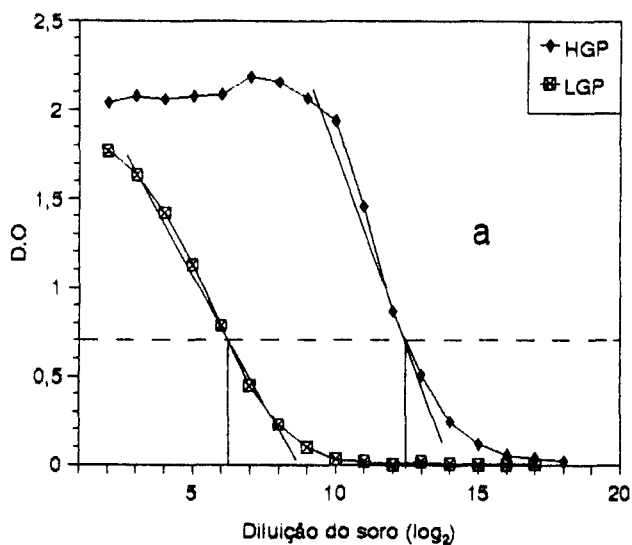
Figura 16 - Proliferação de células CTLL em cultura de 24 horas. a) Crescimento das CTLL frente a doses crescentes de rIL-2 (___) e diferentes diluições de IL-4 (- - -). b) Efeito dos anticorpos monoclonais anti IL-2 (Hibridoma S4B6) e anti IL-4 (Hibridoma 11B11) na proliferação de CTLL induzida por sobrenadante de culturas de linfócitos H e L pré-sensibilizados e estimulados especificamente. Sobrenadantes colhidos 1, 2 e 3 dias após estímulo antigênico *in vitro*.

III.4.2 - DOSAGEM DE ISÓTIPOS IgG₁, IgE e IgG_{2a} ESPECÍFICOS ANTI-HoGG.

Os soros dos mesmos animais analisados nos testes de proliferação foram colhidos no momento do sacrifício, ou seja, 9 dias após a imunização com 100 µg de HoGG em CFA.

Foi feito o “pool” das amostras individuais de HGP e de LGP e dosados os isótipos IgG₁/ IgE e IgG_{2a} anti-HoGG (Figura 17), conhecidamente relacionados à atividade de TH2 e TH1, respectivamente.

Camundongos HGP produziram maiores níveis dos 3 isótipos, entretanto a maior diferença encontrada entre HGP e LGP foi nos títulos de IgG_{2a}.

**IgG_{2a} anti-HoGG**HGP $r=0,996$

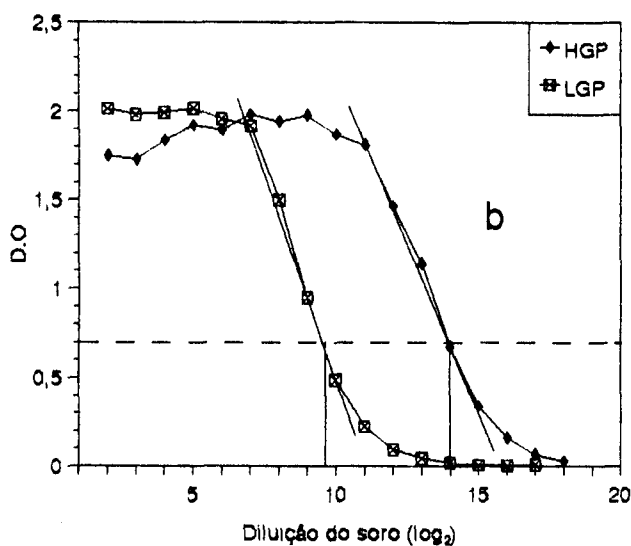
DO=0,70;

conc=12,5

LGP $r=0,999$

DO=0,70;

conc=6,25

**IgG₁ anti-HoGG**HGP $r=0,998$

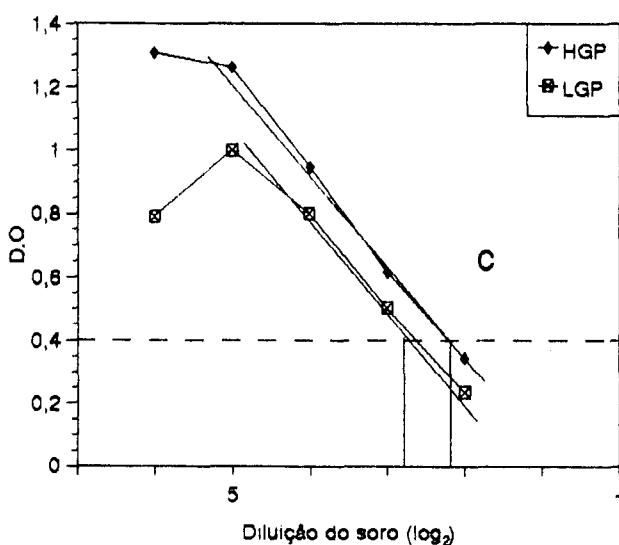
DO=0,70;

conc=14

LGP $r=0,999$

DO=0,70;

conc=9,56

**IgE anti HoGG**HGP $r=1,0$

DO=0,40;

conc=7,75

LGP $r=1,0$

DO=0,40;

conc=7,25

Figura 17 - Dosagem de isótipos específicos IgG_{2a}, IgG₁ e IgE no "pool" de soros de camundongos HGP e LGP imunizados com HoGG.

IV - DISCUSSÃO

As linhagens H e L da seleção GP foram empregadas para o estudo de alguns mecanismos que participam da regulação da intensidade da resposta imune específica.

Para a obtenção de HGP e LGP, as 5 linhagens boas respondedoras e as 5 más respondedoras, provenientes das seleções I a V originalmente descritas (BIOZZI et al., 1979), foram inter cruzadas para a produção de 2 populações com proporção balanceada dos 5 genomas. Estas populações, F₀H e F₀L, foram então submetidas a seleções unidirecionais nas quais o caráter fenotípico selecionador era, respectivamente a produção elevada ou baixa de anticorpos à imunização pluri antigênica.

O resultado final deste experimento demonstrou uma amplificação significativa dos caracteres de alta ou baixa produção de anticorpos das novas linhagens, em relação às das seleções originais, especialmente quando se considera a modificação geral da resposta contra antígenos não relacionados com os da seleção (DE FRANCO, 1989; MASSA, 1994).

Os diferentes lotes gênicos afetados em cada uma das seleções tiveram seus alelos de efeito bom ou mau reunidos nas linhagens HGP e LGP, que portanto devem se expressar nas diferentes etapas da regulação da síntese quantitativa de anticorpos.

A expressão destes genes ao nível da atividade das células imunocompetentes foi estudada na seleção GP e os resultados comparados aos das outras seleções.

Examinamos inicialmente a resposta de linfócitos T ganglionares a mitógenos e antígenos protéicos.

As diferentes subpopulações de células T regulam a maioria das fases da resposta imune, sendo essenciais para a ativação, proliferação e

diferenciação das células B, para a diferenciação de células T precursoras em efetoras, além de participarem também nas reações inflamatórias.

Embora sabendo da dificuldade de definir e caracterizar mecanismos envolvidos na ativação de linfócitos T, utilizando suspensões não purificadas de células linfóides, foi com essa mistura heterogênea de células que realizamos nossos experimentos. Entretanto, todas as determinações foram efetuadas nas mesmas condições para as suspensões de H e L, permitindo portanto a comparação dos resultados.

A resposta induzida pelos mitógenos PHA e ConA requer ligação cruzada dos receptores de superfície para essas lectinas, próximos ao TCR além da participação de sinais co-estimulatórios derivados dos macrófagos (KERN et al., 1985; PALACIOS, 1985).

A figura 1 mostra que não foram encontradas diferenças significativas na resposta a várias concentrações de PHA. A resposta a ConA, usada como controle de proliferação em muitos experimentos, também não mostrou diferenças interlinhagens, portanto à primeira vista as diferenças entre as 2 linhagens não parecem estar relacionadas aos sinais dos macrófagos.

De todos os estimuladores policlonais de células T, os superantígenos são os que mais de perto mimetizam o reconhecimento do antígeno específico. Enterotoxinas de estafilococos (SE) de A a E, TSST-1 e toxina exfoliante (MIETHKE et al., 1993) são produzidas por diferentes linhagens de *Staphylococcus aureus* e causam envenenamento alimentar, síndrome do choque tóxico e síndrome de pele escaldada, respectivamente.

Estas toxinas compartilham a habilidade de se ligar a moléculas de MHC de classe II, fora do sítio convencional de ligação ao antígeno. O complexo assim formado MHC de classe II / toxina interage com o TCR e isto leva a ativação de uma proporção muito maior de células T do que o observado no caso

de qualquer antígeno, sendo por essa razão denominados "superantígenos". Diferentemente dos antígenos convencionais, aparentemente os superantígenos não requerem processamento antes da sua apresentação por moléculas do MHC de classe II (QASIM et al., 1991; HERMAN et al., 1991). A ativação provocada pelo SEB não é restrita pelo MHC, pois o mesmo se liga a região não polimórfica da molécula do MHC de classe II das APCs e a células T que expressem as regiões V β 3, 7, 8.1-8.3, 17 do TCR (MARRACK & KAPPLER, 1990; WHITE et al., 1989; GASCOIGNE et al., 1991; FRASER, 1989). Também para este mitógeno não foram detectadas diferenças significativas interlinhagens (Figura 2), apesar de uma resposta aparentemente maior dos L a doses baixas do SEB.

A estimulação do TCR foi também estudada pelo emprego do anticorpo monoclonal anti-CD3 dirigido contra a cadeia ϵ do complexo CD3 (BLUESTONE et al., 1987; LEO et al., 1987). O complexo CD3, presente na membrana de linfócitos T periféricos, é um conjunto de 5 cadeias polipeptídicas ($\gamma, \delta, \epsilon, \zeta, \eta$) fisicamente associado ao heterodímero TCR e é responsável pela transdução dos sinais de ativação para o citoplasma das células T (IRVING & WEISS, 1991; LETOURNEUR & KLAUSNER, 1992; WEGENER et al., 1992).

A estimulação pode ocorrer pela adição de monoclonal anti-CD3 solúvel ou fixado a placas de cultura. No primeiro caso, a ação estimulatória do monoclonal necessita da participação de APCs, que possuam receptores para a porção Fc do monoclonal (SCHWAB et al., 1985; BEKOFF et al., 1986).

Como mostrado na figura 3, é observada uma tendência de maior atividade dos linfócitos de L. Portanto, aparentemente não existem deficiências na capacidade proliferativa dos linfócitos T das linhagens L, quando induzida por mitógenos. Esses resultados sugerem ainda que não deve haver deficiência nos camundongos L_{GP} quanto à densidade da expressão das moléculas de superfície da membrana de linfócitos T: TCR, CD3 ou de receptores Fc de suas APC.

É interessante citar resultados de proliferação com SEB e anti-CD3 nas seleções I e III (COUDERC, comunicação pessoal). Sistemáticamente é observada superioridade de resposta das linhagens más respondedoras. A proliferação mais baixa dos camundongos bons respondedores frente ao SEB poderia ser explicada pelo maior número de células de memória nesta linhagem, resultante de uma maior ativação natural, pois de acordo com LEE & VITTEA, 1992 e ROTT et al., 1992, células de memória são anérgicas ao estímulo provocado por SEB.

Além disso, embora a ligação do TCR às enterotoxinas bacterianas e ao anti-CD3 conduza as células a proliferação, ela pode também induzir a morte programada (apoptose) de células pré-ativadas, caracterizada pela quebra do DNA genômico em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases (DAMLE et al., 1993; BOEHME & LENARDO, 1993). Estudos preliminares do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan, com o DNA extraído de linfócitos ganglionares estimulados com estes agentes, demonstraram a ocorrência de apoptose apenas nos HGP, refletindo o estado de ativação destas células. A baixa atividade ao SEB poderia em parte ser devida à esse mecanismo. No DNA extraído de linfócitos estimulados especificamente por HoGG esse fenômeno não pôde ser observado (GOMES, comunicação pessoal).

As células T auxiliares, cuja maioria expressa CD4 nas suas membranas, realizam suas funções tanto por interações diretas células T - células alvo, como também pela secreção de citocinas.

A ativação de células T CD4⁺ por antígenos protéicos resulta da ocupação do receptor de célula T (TCR) pelo peptídeo imunogênico ligado à molécula do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II, junto com o sinal co-estimulatório da célula apresentadora de antígeno (APC) (MUELLER et al., 1989).

Vários parâmetros podem ser utilizados para acompanhar a ativação dessas células, entre eles proliferação, produção de linfocinas, atividade citolítica e geração de segundos mensageiros. Processos regulatórios podem afetá-los diferencialmente, então a proliferação celular pode ser dissociada da produção de linfocinas; os segundos mensageiros, normalmente expressos coordenadamente, podem ser modulados isoladamente (FITCH et al., 1993).

A atividade dos linfócitos T CD4⁺ foi estudada em ensaios *in vitro* através da proliferação específica com 2 proteínas heterólogas HoGG e RGG e também pela produção de interleucinas no sobrenadante de cultura de linfócitos estimulados especificamente com HoGG.

Com relação à proliferação específica (figuras 4 e 6), as diferenças interlinhagens são significativas.

O heterodímero $\alpha\beta$ TCR e o complexo CD3 são as moléculas chave envolvidas no reconhecimento do antígeno pelos linfócitos T auxiliares ou citotóxicos restritos pelo MHC.

Durante o processamento de um antígeno pelas APCs, vários peptídeos são gerados, que são capazes de se ligar a moléculas do MHC de classe II. Usando um painel de 12 peptídeos imunogênicos derivados de 8 proteínas diferentes e 4 tipos de moléculas purificadas de classe II (A^d, E^d, A^k, E^k), BUUS et al., 1987 descreveram uma forte correlação entre afinidade de ligação e capacidade do peptídeo ser apresentado pela molécula do MHC. Provavelmente, os determinantes com maior afinidade pelo MHC geram uma melhor resposta de T, do que peptídeos que se ligam fracamente. Poderíamos então supor que, células das linhagens HGP e LGP apresentando diferentes especificidades do MHC, poderiam ter diferentes afinidades de ligação com os peptídeos resultantes do processamento pelas respectivas APCs. No entanto, trabalhos realizados com camundongos das linhagens H e L da seleção I, que são homogêneas em relação

ao H-2 e que apresentam as especificidades H_{2q} e H_{2s} respectivamente, demonstraram que o fenótipo de alta ou baixa resposta de anticorpos é pouco dependente destas especificidades. A observação foi comprovada pela manutenção das características de alta ou baixa capacidade de produção de anticorpos em camundongos coisogênicos, ou seja H₁-H_{2s} e L₁-H_{2q} (MOUTON, comunicação pessoal, BIOZZI et al., 1979).

Portanto, a afinidade dos peptídeos ao MHC não deve ser a principal causa da diferença de resposta de anticorpos entre H_{GP} e L_{GP}. Com relação à estimulação de linfócitos T por peptídeos que tenham baixa afinidade de ligação ao MHC, KARJALAINEN, K., 1994 explica que o "crosslinking" do TCR aumenta a concentração local do TCR e desloca o equilíbrio para o estado de ligação TCR-MHC peptídeo. Além disso, uma mudança conformacional do complexo TCR aumentaria sua afinidade intrínseca, explicando o paradoxo da alta sensibilidade das células T a seus alvos, a despeito da baixa afinidade dos seus TCR.

SRINIVASAN et al., 1993, trabalhando num sistema *in vitro*, com citocromo c, demonstraram que peptídeos de 23 ou mais resíduos são mais eficientes para estimular uma resposta T do que peptídeos com 12 amino ácidos. Os autores evidenciam que os peptídeos maiores não devem se acomodar dentro do sítio de ligação do antígeno, porém os resíduos que ficam para fora da fenda promovem uma maior afinidade de ligação ao MHC.

Um possível catabolismo elevado do antígeno nos macrófagos de L, poderia gerar peptídeos menores, que promoveriam ligação de menor afinidade entre MHC e TCR.

Evidências desta alteração na atividade de macrófagos das linhagens más respondedoras selecionadas foram obtidos em experimentos, onde a degradação do antígeno era compensada por seu suprimento contínuo, através

de injeções repetidas ou emulsão em CFA, ou onde se interferia diretamente sobre o metabolismo de macrófagos locais pelo tratamento dos animais com sílica (GENNARI et al., 1987.)

Nestas condições os maus respondedores das seleções I e II produziram níveis de anticorpos comparáveis aos dos bons respondedores, enquanto a resposta dos maus respondedores das seleções III e IV não era absolutamente modificada. Um comportamento intermediário foi observado nos animais LGP, que sob estas condições de imunização passaram a apresentar títulos superiores de anticorpos, porém, ainda significativamente diferentes dos níveis dos HGP (DE FRANCO, comunicação pessoal).

Assim, embora aparentemente exista um comprometimento da função macrofágica na seleção GP, este provavelmente não representa o mecanismo regulatório único ou preponderante na determinação de ativação do compartimento T auxiliar de H e L.

A ativação de linfócitos T depende também, entre outros fatores, da participação de moléculas CD4. Este receptor, situado na célula T muito próximo ao TCR, funciona como molécula de adesão, pelo fato de se ligar à regiões não polimórficas da molécula de MHC ligada ao peptídeo imunogênico, presente na superfície da APC (DOYLE & STROMINGER, 1987; MARRACK & KAPPLER, 1986).

Quando a afinidade do TCR ao complexo peptídeo - MHC é baixa, moléculas de adesão, como por exemplo CD4 podem ter uma importância maior para a estimulação dos linfócitos T. O efeito do monoclonal GK 1.5 foi analisado nos ensaios de proliferação específica *in vitro*, com as maiores doses dos antígenos HoGG e RGG (Figuras 5 e 7). Altas doses do monoclonal GK 1.5 foram necessárias para a inibição da proliferação de linfócitos de HGP, indicando que o CD4 não seria o fator de maior importância na estimulação específica.

Experimentos *in vivo* realizados anteriormente, já mostravam que a resposta anti-SE de H_{GP} e L_{GP} era diferentemente modulada pela injeção prévia de GK 1.5 em várias concentrações. Coincidentemente aos experimentos *in vitro*, a dose de anticorpo monoclonal requerida para induzir 50% de inibição de anticorpos totais e da classe IgG é muito alta nos bons respondedores, e além disso, diferentemente dos H_{GP}, os animais L_{GP} não se recuperam do bloqueio dessa resposta (DE FRANCO, comunicação pessoal).

Resultados semelhantes foram também encontrados nas seleções I e III (COUDERC, 1989/90; REIS et al., 1992).

A capacidade de ativação específica de linfócitos T foi também estimada em ensaios de cultura mista de linfócitos (MLR). Essas reações são provocadas pelo reconhecimento das moléculas do MHC estranho por células específicas alorreativas. Estas reconhecem resíduos polimórficos, que são variações na sequência de amino ácidos das moléculas do MHC estranho, que são confinadas a região de ligação do peptídeo. Essa resposta independe de processamento (COESHOTT et al., 1986; MINAMI et al., 1980) e se acredita que a superfície tridimensional dos determinantes reconhecidos pelo TCR na molécula do MHC estranho, sejam semelhantes ao MHC próprio ligado a peptídeo estranho.

Na MLR bidirecional (Tabela 2) os maiores valores aconteceram para as combinações interlinhagens (H_{GP}x L_{GP}) e intralinhagens (H_{GP}x H_{GP}), mostrando que os camundongos H_{GP} ainda são muito heterogêneos com relação ao H-2 e que os L_{GP} são mais homogêneos ou que apresentam menor capacidade de ativação por aloantígenos. Os resultados encontrados na MLR unidirecional (Tabela 3) entretanto, mostram que, nas várias combinações analisadas, ocorreu uma maior resposta dos H_{GP} do que dos L_{GP} aos linfócitos

irradiados. Fica portanto demonstrado que também na resposta proliferativa a aloantígenos, os linfócitos L_{GP} se mostraram deficientes.

É interessante relatar que reações de MLR apresentadas por linfócitos de H e L da seleção I foram de igual intensidade (COUDERC et al., 1989/1990). Pelo fato da MLR não necessitar de processamento por macrófago, esse achado reforça que as diferenças encontradas na resposta específica a antígenos na seleção I sejam devidas essencialmente a atividade de macrófagos. Por outro lado, os resultados da seleção GP reforçam envolvimento maior dos linfócitos T.

A proliferação de células T pode ser prejudicada pela falha na produção de IL-2 e/ou pela expressão diminuída de receptores de IL-2 (IL-2R) de alta afinidade.

Esse último aspecto foi averiguado indiretamente, através da adição de rIL-2 à cultura. Linfócitos ganglionares de animais H_{GP} e L_{GP} sensibilizados ou não, responderam igualmente ao estímulo promovido pela rIL-2, portanto não deve haver diferença constitutiva na expressão de receptores para esta linfocina.

Pelo conjunto de resultados obtidos, a hiporesposta dos linfócitos T de L_{GP} parece seletiva ao TCR, provavelmente associada a um defeito de gerar eventos iniciais de ativação efetivos, após estimulação através dos seus sítios de combinação para o antígeno.

A deficiência dos camundongos L em produzir anticorpos poderia ainda ser resultante de modificações na atividade dos linfócitos B.

A curva temporal do aparecimento de PFC anti-SE no baço (Figura 10a) mostra que os números de PFC no baço das 2 linhagens divergem rapidamente após imunização, devido a uma expansão mais rápida e duradoura dos clones de H_{GP}. A partir do 30º dia, o número de PFC nos L_{GP} permanece

constante até a fase de declínio, enquanto nos H_{GP} o número de placas aumenta exponencialmente até o 5^o dia. Apesar do aparecimento de pequeno número de PFCs indiretas no baço dos L_{GP} até o 5^o dia de cultura, isto não se reflete no título de anticorpos séricos da classe IgG (Figura 10c).

A atividade B avaliada por ELISPOT nos linfonodos de camundongos da seleção GP submetidos ao esquema de imunização com antígeno protéico mostrou que no 9^o dia pós-imunização já existe um maior número de células secretoras de anticorpos anti-HoGG nos H_{GP} (Tabela 4). Esse número se reflete nos títulos de anticorpos séricos anti-HoGG detectados por ELISA, com H_{GP} apresentando títulos 8x maiores do que L_{GP} (Figura 11). Essa diferença nos títulos de anticorpos aumenta com o decorrer do tempo, no 30^o dia os títulos de anticorpos dos H_{GP} chegam a ser cerca de 200 x maiores do que nos L_{GP}.

Esta aparente deficiência de ativação de linfócitos B nos L_{GP} pode entretanto ser decorrente de mecanismos regulatórios anteriores.

A constatação de que o tratamento prévio *in vivo* com SEB promoveu a produção de altos títulos de anticorpos anti-SE, inclusive da classe IgG nos animais L_{GP}, constitui uma evidência indireta de que não existe defeito intrínseco das células envolvidas na formação de anticorpos. Mostra também que o SEB, ativador policlonal de linfócitos T, contribuiu decisivamente para o início e manutenção da resposta imune ao SE. Mac DONALD et al., 1991 mostraram que a administração do SEB *in vivo* leva a uma expansão inicial e hiperreatividade de células T, seguida por uma grande redução destas células.

COLE et al., 1993, trabalhando com o superantígeno MAM, proveniente do *Mycoplasma arthritidis*, mostraram que a injeção de MAM *in vivo* em camundongos, provoca um aumento nas respostas de anticorpo ao SE e OVA, uma diminuição das respostas de rejeição de enxerto e menor sensibilidade

ao DNCB. Os autores sugerem que o MAM induz a secreção de linfocinas de padrão TH2, favorecendo a ativação de células B com formação de anticorpos autoimunes da classe IgG1.

Embora muitos tipos celulares possam sintetizar citocinas em baixas concentrações, as células T CD4⁺ diferenciadas em efetoras, secretam níveis altos de citocinas, que podem afetar células que estejam em seu microambiente.

As citocinas, apesar de serem pleiotrópicas apresentam algumas funções definidas nas respostas de células particulares do sistema imune e, além disso, essas moléculas frequentemente sinergizam ou antagonizam os efeitos de outras citocinas (FITCH et al., 1993).

A compartimentalização de células T em TH1 , produtoras de IL-2, IFN γ , LT e TH2, produtoras de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 entre outras , foi relatada pela primeira vez por MOSMANN et al., 1986. Células T CD4⁺ , sob condições apropriadas se diferenciam em populações efetoras polarizadas, com padrões particulares de secreção de citocina (SWAIN et al., 1993; LEBMAN et al., 1988; SWAIN et al., 1991). Essa diferenciação é citocina dependente: IFN γ e TGF β favorecem a diferenciação de células TH1, enquanto IL-4 promove a diferenciação de células TH2. Dependendo do tipo de APC presente (HSIEH et al., 1992) a IL-10, além de inibir a diferenciação de TH1 (FIORENTINO et al., 1991), pode também promover o desenvolvimento de células efetoras TH2(MOSMANN & MOORE, 1991). Além disso, IL-4 antagoniza a ação do IFN γ e vice-versa.

Quando as citocinas polarizantes estão ausentes ou presentes em níveis muito baixos, as células efetoras se desenvolvem em TH0 e secretam a maioria das citocinas (SWAIN et al. , 1993).

Numa tentativa de avaliar a possível diferença interlinhagens na capacidade de ativação de TH1 e TH2, estudamos o perfil de linfocinas secretadas por linfócitos de camundongos HGP e LGP imunizados com HoGG, através da análise do sobrenadante de cultura com o antígeno, coletados em diferentes tempos.

Neste modelo de avaliação da resposta a um antígeno protéico, os linfócitos de HGP apresentaram níveis maiores de IFN γ , IL-2 e IL-10 do que os LGP. Desde que é atribuída à população TH1 a biossíntese de IFN γ e IL-2 (CHER et al., 1987) e à TH2 a biossíntese de IL-10, podemos deduzir que entre as duas linhagens de camundongos existe diferença na capacidade de ativação da duas subpopulações por este esquema de imunização. Foi interessante observar o efeito da adição de dose submitogênica de rIL-2 na cultura, enquanto nos HGP aconteceu uma antecipação na produção de IFN γ e IL-10, nos LGP não houve qualquer alteração.

A liberação de citocinas do tipo TH1 num processo de imunização conduz a um envolvimento maior de reações imunes mediadas por células, como a hipersensibilidade tardia (DTH), rejeição de transplantes e ao auxílio a produção de IgG_{2a} e IgM. Por outro lado, quando o perfil liberado é do tipo TH2, ocorre uma maior ativação da resposta imune humoral com produção de IgG1 e IgE (CHER & MOSMANN, 1987; MOSMANN & COFFMAN, 1987; MOSMANN & MOORE, 1991).

A análise dos níveis de IgG₁, IgG_{2a} e IgE no "pool" de soros dos animais HGP e LGP imunizados com HoGG, mostrou que os HGP produzem maiores títulos desses isótipos. Observamos que a diferença HxL nos títulos de IgG₁ é de 20x e de IgE é de 2x, enquanto de IgG_{2a} é de cerca de 80x (Figura 17).

Aparentemente, portanto a grande diferença de H e L neste sistema resulta principalmente de uma fraca estimulação da subpopulação TH1 nos LGP. Estes achados são compactáveis com o perfil de linfocinas encontradas nas culturas de H e L, e corroboram ainda resultados de estudos anteriores com relação ao desenvolvimento de hipersensibilidade tardia a SE (OLIVEIRA, 1984). Os HGP produziram reações de intensidade significativamente maiores do que os LGP; apesar da participação de componente não específico nesse tipo de resposta, esses resultados indicam um maior envolvimento de células do tipo TH1 nos animais HGP.

A análise global dos resultados obtidos nos vários experimentos mostra que, a divergência na intensidade da resposta humoral dos animais HGP e LGP deve ser decorrente de modificações em várias etapas do processo de resposta imune, desde o processamento e apresentação do antígeno até a diferenciação de células efectoras.

A produção limitada de anticorpos nos LGP deve-se a função prejudicada dos macrófagos ou outras APCs, aliada a deficiência de um sinal de ativação específico apropriado para células T, com conseqüente desequilíbrio de subpopulações TH1 e TH2, que interfere na diferenciação e expansão de células B.

Nas tabelas a seguir, procuramos reunir várias particularidades das seleções e principais diferenças interlinhagens encontradas em ensaios *in vivo* e *in vitro*.

Seleção	Nº de loci selecionados	Diferenças interlinhagens		
		Intensidade do efeito multiespecífico	Atividade catabólica de macrófagos	DTH
I	9-11	++++	++++	-
II	2-8	+++	++++	-
III	4-7	++++	-	-
IV	2-4	++	-	++
V	2-4	+	NR	NR
GP	2-11*	+++++	++	+++
GS	2-11*	+++++	++	+++

* Os intervalos determinam os valores calculados para os diversos antígenos utilizados na seleção (MASSA, 1994).

Seleção	Diferenças interlinhagens					
	Ativação Th Ag específica		Ativação policlonal			
	Proliferação in vitro	Produção de IL-2	PHA	ConA	SEB	anti-CD3
I	+++	+++	-	-	+	+
III	+++	-	-	-	+	+
GP	++++	++++	-	-	+	+

Os ensaios funcionais apresentados neste trabalho demonstram portanto que a seleção GP representa uma síntese de todos os experimentos de seleção realizados no programa de estudo do Controle Poligênico da Resposta Quantitativa de Anticorpos.

As particularidades definidas em cada uma das seleções originais são identificadas na seleção GP. Comprovadamente esta seleção reuniu nas suas linhagens boa e má produtora de anticorpos todos os alelos relacionados à boa e má resposta, respectivamente, que haviam sido segregados nos primeiros experimentos de seleção.

Pelo fato de dispormos desses genomas correspondentes a fenótipos extremos para a resposta quantitativa de anticorpos, a sequência lógica de estudos será avaliar o polimorfismo genotípico, que poderá explicar a nível molecular, a diversidade fenotípica encontrada entre as linhagens selecionadas.

V - CONCLUSÕES

Os ensaios realizados com os camundongos da seleção GP permitem as seguintes conclusões:

1 - A potencialidade de linfócitos B avaliada por PFC e rosetas anti-SE no baço e por ELISPOT anti-HoGG nos linfonodos foi muito superior nos H_{GP} e se refletiu nos títulos de anticorpos séricos.

2 - A correção da resposta de anticorpos a eritrócitos de carneiro nos animais L_{GP} por estimulação policlonal dos linfócitos T *in vivo* pelo tratamento prévio com SEB indica que não existe um defeito intrínseco nos linfócitos B destes animais.

3 - A hiporesposta de linfócitos T de L_{GP} avaliada em ensaios de estimulação *in vitro* se restringe a estímulos que envolvem o sítio de combinação para o antígeno no TCR.

4 - Os níveis de linfocinas (IL-2, IFN γ e IL-10) produzidas *in vitro* em resposta ao HoGG são maiores nos H_{GP}, sugerindo um maior nível de estimulação das duas subpopulações TH1 e TH2 como resposta à imunização por este antígeno protéico.

5 - A produção dos isótipos IgG₁, IgE e IgG_{2a} anti-HoGG coincide com o perfil de estimulação de subpopulações T detectado neste sistema *in vitro*. Maiores diferenças interlinhagens são evidentes nos títulos de IgG_{2a}, sugerindo deficiência mais acentuada dos L_{GP} na capacidade de ativação da subpopulação TH1.

VI - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ADORINI, L. & DORIA, G. Defective antigen presentation by macrophages from mice genetically selected for low antibody response. **Eur. J. Immunol.**, **11**: 984-89, 1981.

BEKOFF, M.; KUBO, R.; GREY, H.M. Activation requirements for normal T cells: accessory cell-dependent and -independent stimulation by anti-receptor antibodies. **J. Immunol.**, **137**: 1411-9, 1986.

BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; DECREUSEFON, C. Cytodynamics of the immune response in two lines of mice genetically selected for "high" and "low" antibody synthesis. **J. Exp. Med.**, **135**: 1071-94, 1972.

BIOZZI, G.; STIFFEL, C.; MOUTON, D.; BOUTHILLIER, Y.; DECREUSEFON, C.- Genetic regulation of the function of antibody-producing cells. Progress in Immunology. In: FIRST INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY. Ed. B. Amos, New York, Academic Press, 1971, pp. 530-45.

* DE ACORDO COM:
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS.
Referências bibliográficas: NB-66. in: Normas ABNT sobre documentação. Rio de Janeiro, 1978. p.13-20.

SERIAL sources for the BIOSIS data base. Philadelphia, BIOSIS, 1990.

BIOZZI, G.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O.A.; PASSOS, H.C.; GENNARI, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; HEUMANN, A. M.; BOUTHILLIER, Y.; IBAÑEZ, O.M.; STIFFEL, C.; SIQUEIRA, M. - Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, **85**: 31-98, 1979.

BIOZZI, G.; MOUTON, D.; STIFFEL, C. ; BOUTHILLIER, Y. A major role of the macrophage in quantitative genetic regulation of immunoresponsiveness and antiinfectious immunity. **Adv. Immunol.**, **36**: 189-234, 1984.

BIOZZI, G.; SIQUEIRA, M.; STIFFEL, C.; IBAÑEZ, O.M.; MOUTON, D.; FERREIRA, V.C.A.. - Genetic selections for relevant immunological functions. In: IMMUNOLOGY 80 - Progress in Immunology IV. Ed. M. Fougereau & Dausset, London, Academic Press, 1980, pp. 423-57.

BIOZZI, G.; CABRERA, W.H.; MOUTON, D.; IBAÑEZ, O.M. - Restricted and general polygenic regulation of antibody responsiveness. In: IMMUNOGENETICS AND IMMUNE REGULATION, B. Benacerraf (ed), Masson, Milan, 1982, pp. 31-60.

BLUESTONE, J. A.; PARDOLL, D.; SHARROW, S.O.; FOWLKES, B.J. Characterization of murine thymocytes with CD3-associated T- cell receptor structures. **Nature**, **326**: 82-4, 1987.

BOEHME, S.A. & LENARDO, M.J. Propriocidal apoptosis of mature T lymphocytes occurs at S phase of the cell cycle. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 1552-60, 1993

BUUS, S.; SETTE, A.; COLON, S. M.; MILES, C.; GREY, H.M. The relationship between major histocompatibility complex (MHC) restriction and the capacity of Ia to bind immunogenic peptides. **Science**, **235**: 1353-58, 1987.

CABRERA, W.H.; SIQUEIRA, M.; TAKAHASHI, N.S.H.; RIBEIRO, O.G.; MOUTON, D.; IBANEZ, O.M. Specific and non - specific T-cell activation in high and low antibody- producing mice (SELECTION IV-A), **Scandin. J. Immunol** (in press).

CABRERA, W.H. - **Mecanismos regulatórios da resposta humoral de camundongos bons e maus respondedores obtidos por seleção genética bidirecional**. São Paulo, 1993 (Tese de Doutorado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

CHER, D.J. & MOSMANN, T.R. Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-Type hypersensitivity is mediated by TH1 clones. **J. Immunol.**, **138**: 3688-94, 1987.

CHERWINSKI, H.; SCHUMACHER, J.; BROWN, K.; MOSMANN, T. Two types of mouse helper T cell clone. III. Further differences in lymphokine synthesis between TH1 and TH2 clones revealed by RNA

hybridization, functionally monospecific bioassays, and monoclonal antibodies. **J. Exp. Med.**, **166**: 1229-44, 1987.

COESHOTT, C.M.; CHESNUT, R.W.; KUBO, R.T.; GRAMMER, S.F.; JENIS, D.M.; GREY, H.M. Ia- specific mixed leucocyte reactive T cell hybridomas: Analysis of their specificity by using purified class II MHC molecules in a synthetic membrane system. **J. Immunol.**, **136**: 2832-38, 1986.

COLE, B.C.; AHMED, E.; ARANEO, B.A.; SHELBY, J.; KAMERATH, C.; WEI, S.H.; MCCALL, S.; ATKIN, C. L. Immunomodulation *in vivo* by the *Micoplasma arthritidis* Superantigen, MAM. **Clinical Infectious Diseases, Suppl.1**: 163-9, 1993.

CORRADIN, G., ETLINGER, H.M., CHILLER, M. Lymphocyte specificity to protein antigens. I. Characterization of the antigen induced *in vitro* T cell dependent proliferative response with lymph node cells from primed mice. **J. Immunol.** **119**: 1048-55, 1977.

COUDERC, J.; BOUTHILLIER, Y.; MEVEL, J.C.; MOUTON, D. Evaluation of T helper function in lines of mice selected for high or low antibody production: quantitative inhibition of immune responses by anti-L₃T₄⁺ monoclonal antibody. **Immunol. Lett.**, **23**: 21-6, 1989/1990.

CUNNINGHAM, A.J. A Method of Increased Sensivity for detecting Single Antibody-Forming Cells. *Nature*, (London) **207**: 1106-11, 1965.

DAMLE, N.K.; LEYTZE, G.; KIUSSMAN, K.; LEDBETTER, J.A. Activation with Superantigens induces programmed death in antigen-primed CD4⁺ class II⁺ major histocompatibility complex T lymphocytes via a CD11a/CD18- dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.*, **23**: 1513-22 , 1993.

DE FRANCO, M. **Controle Poligênico Multi-específico da Resposta Imune: Estudo comparativo das respostas a proteínas heterólogas em linhagens de camundongos bons e maus respondedores.** São Paulo, 1989 (Tese de Mestrado - Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

DIALYNAS, D.P.; QUAN, Z.S.; WALL, K.A.; PIERRES, A.; QUINTANS, M.; LOKEN, R.; PIERRES, M.; FITCH, F.W. - Characterization of the murine T cell surface molecule, designated L3T4, identified by monoclonal antibody GK-1.5: similarity of L3T4 to the humann Leu-3/T4 molecule. *J. Immunol*, **131**: 2445-51, 1983.

DOYLE, C. & STROMINGER, J.L. Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature*, **330**: 256-59, 1987.

FEINGOLD, N.; FEINGOLD, J.; MOUTON, D.; BOUTHYLLIER, Y.; STIFFEL, C; BIOZZI, G. Polygenic regulation of antibody synthesis to sheep erythrocytes in the mouse: a genetic analysis. **Eur. J. Immunol.** 6: 43-51, 1976.

FERREIRA, V.; GENNARI, M.; REIS, M.H.; SIQUEIRA, M. STIFFEL, C.; MOUTON, D.; BIOZZI, G. Potentialities of immunocompetent cells in high and low antibody producing lines of mice obtained by selective breedings for responsiveness to flagellar or somatic antigens of Salmonellae. **J. Immunogenet.**, 12: 309-19, 1985.

FIorentino, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W.; O GARRA, A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by TH1 cells. **J. Immunol.** , 146: 3444-51, 1991.

FITCH, F.W.; McKISIC, M.D.; LANCKIM, D.W.; GAJEWSKI, T.F. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. **Annu. Rev. Immunol.**, 11: 29-48, 1993.

FRASER, J.D. High-affinity binding of staphylococcal enterotoxins A and B to HLA-DR. **Nature**, 339: 221-23, 1989.

GASCOIGNE, N.R.J. & AMES, K.T. Direct binding of secreted T-cell receptor β chain to superantigen associated with class II major

histocompatibility complex protein. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, **88**: 613-16, 1991.

GENNARI, M.; BOUTHILLIER, Y.; IBAÑEZ, O.M.; FERREIRA, V.C.A.; MEVEL, J.C.; REIS, M.H.; PIATTI, R.M.; RIBEIRO, O.G.; BIOZZI, G. Effect of silica on the genetic regulation of antibody responsiveness. **Ann. Immunol.**, (Inst. Pasteur), **138**: 359-70, 1987.

GILLIS, S.; FERM, M.M.; OU, W.; SMITH, K.A. - T Cell Growth Factor parameters of production and a Quantitative Microassay for activity. **J. Immunol.**, **120**: 2027-32, 1978.

GILLIS, S. & SMITH, K.A. - In vitro generation of tumor-specific cytotoxic lymphocytes. Secondary allogeneic mixed tumor lymphocyte culture of normal murine spleen cells. **J. Exp. Med.**, **146**: 468-82, 1977.

HERMAN, A.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P.; PULLEN, M.A. SUPERANTIGENS: Mechanism of T-cell stimulation and role in immune responses. **Ann. Rev. Immunol.**, **9**: 745-72, 1991.

HIRANO, T.; YAMAKA, N.; MIYAJIMA, H.; MAEDA, K.; TAKAI, S.; UEDA, A.; TANIGUCHI, O.; HASHIMOTO, H.; HIROSE, S.; OKUMURA, K. & OVARY, Z. An improved method for the detection of IgE antibody of defined specificity by ELISA using rat monoclonal anti-IgE antibody. **J. Immunol. Meth.**, **119**: 145-150, 1989.

HIRAYAMA, N.; HIRANO, T.; KÖHLER, G.; KURATA, A.; OKUMURA, K. & OVARY, Z. Biological activities of antinitrophenyl and antidinitrophenyl mouse monoclonal antibodies. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **79**: 613, 1982.

HSIEH, C-S.; HEIMBERGER, A.D.; GOLD, . S.; O GARRA, A.; MURPHY, K.M. Differential regulation of T helper phenotype development by IL-4 and IL-10 in an α/β TCR transgenic system. **Proc. Natl. Acad. Sci. , 89**: 6065-69, 1992.

IBAÑEZ, O.M.; MOUTON, D.; OLIVEIRA, S.L.; RIBEIRO, O.G.; PIATTI, R.M.; SANT'ANNA, O.A.; MASSA, S.; BIOZZI, G.; SIQUEIRA, M. Poligenic control of quantitative antibody responsiveness: restrictions of the multispecific effect related to the selection antigen. **Immunogenetics**, **28**: 6-12, 1988.

IRVING, B.A. & WEISS, A. The cytoplasmic domain of the T cell receptor zeta chain is sufficient to couple to receptor-associated signal transduction pathway. **Cell**, **64**: 891-901, 1991.

KARASUYAMA, H. & MELCHERS, F. Establishment of mouse cell lines wich constitutively secrete large quantities of interleukin 2, 3, 4 or 5 using modified cDNA expression vectors. **Eur. J. Immunol.**, **18**: 97, 1988.

KARJALAINEN, K. High sensitivity, low affinity- paradox of T-cell receptor recognition. **Curr. Opinion in Immunol.**, **6**: 9-12, 1994.

- KERN, J. A.; DANIEL, R.P.; NOWELL, P. C. Accessory cells provide more than one signal for lectin mitogen-stimulated proliferation of human lymphocytes. **J. Leukocyte Biol.**, **38**: 495-507, 1985.
- KUBO, M. & CINADER, B. Polymorphism of age-related changes in interleukin (IL) production: differential changes of helper subpopulations, synthesizing IL-2, IL-3 and IL-4. **Eur. J. Immunol.**, **20**: 1289-96, 1990.
- LEBMAN, D.A. & COFFMAN, R.L. Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures. **J. Exp. Med.**, **168**: 853-62, 1988.
- LEE, W. T. & VITETTA, E.S. Memory T cells are anergic to the superantigen staphylococcal enterotoxin B. **J. Exp. Med.**, **176**: 575-9, 1992.
- LEO, O.; FOO, M.; SACHIS, D.; SAMELSON, L.E.; BLUESTONE, J.A. Identification of a monoclonal antibody specific for a murine T₃ polypeptide. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**: 1374 -78, 1987.
- LEONETTI, M.; PILLET, L.; MAILLERE, B.; LAMTHANH, H.; FRACHON, P.; COUDERC, J.; MÉNEZ, A. Immunization with a peptide having both T cell and conformationally restricted B cell

epitopes elicits neutralizing antisera against a snake neurotoxin. **J. Immunol.**, **145**: 4214-21, 1990.

LETOURNEUR, F. & KLAUSNER, R.D. Activation of T cell by a tyrosine kinase activation domain in the cytoplasmic tail of CD3_ε. **Science**, **255**: 79-82, 1992.

LIACOPOULOS-BRIOT, M.; MOUTON, D.; STIFFEL, C.; LAMBERT, F.; DECREUSEFON, C.; BOUTHYLLIER, Y.; BIOZZI, G. Réponse à la phitohématagglutinine des lymphocytes de deux lignées de souris génétiquement sélectionnées pour une forte et une faible synthèse d'anticorps. **Ann. Immunol.**, (Inst. Pasteur) **125**: 393-404, 1974.

MacDONALD, H.R.; BASCHIERI, S.; LEE, R.K. Clonal expansion preceds anergy and death of Vβ8⁺ peripheral T cells responding to staphylococcal enterotoxin B in vivo. **Eur. J. Immunol.** **21**: 1963-66, 1991.

MARASHOVSKY, E.; PECH, M. H.; KELSON, A. High-frequency of single CD4⁺ T cells to proliferate and secrete cytokines using anti-receptor antibodies and IL-2. **Int. Immunol.**, **3**: 255-64, 1991.

MARCHAL, G.; SEMAN, M.; MILON, G.; TRUFFA-BACHI, P.; ZILBERFARB, V. Local adoptive transfer of skin delayed-type hypersensitivity initiated by a single T lymphocyte. **J. Immunol.**, **129**: 954-58, 1982.

MARCHAL, G. & MILON, G. Numeration of DTH-mediating T lymphocytes in mice under optimal titration conditions. **Ann. Immunol.**, (Inst. Pasteur), **135C**: 353-64, 1984.

MARRACK, P. & KAPPLER, J. W. The antigen-specific, major histocompatibility complex- restricted receptor on T cells. **Adv. in Immunol.**, **38**: 1-30, 1986.

MARRACK, P. & KAPPLER, J. W. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. **Science**, **248**: 705-10, 1990.

MASSA, S. - **Análise genética e características imunológicas de camundongos com fenótipos amplificados de boa ou má produção de anticorpos (Seleção GP)**. São Paulo, 1994 (Tese de Doutorado. Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo).

MIETHKE, T.; DUSCHEK, K.; WAHL, C.; HEEG, K.; WAGNER, H. Pathogenesis of the toxic shock syndrome. T cell mediated lethal shock caused by the superantigen TSST-1. **Eur. J. Immunol.**, **23**: 1494-1500, 1993.

MILON, G.; MARCHAL, G.; MOUTON, D.; BIOZZI, G. - Higher Number of DTH-Mediating T Cells Developed After Immunization of High as Opposed to Low Antibody Responder Mice: Relation to Accessory Cell Function. In: **GENETIC control of host resistance to infection and malignancy**. Ed. E. Skamene. New York, Alan R. Liss, Inc., 1985, pp 623-8.

MINAMI, M.; SHREFFLER, D.C.; COWING, C. Characterization of the stimulator cells in the murine primary mixed leucocyte response. **J. Immunol.** **124**: 1314-21, 1980.

MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I- Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, **136**: 2348-56, 1986.

MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. Two types of mouse helper T-cell clone. Implications for immune regulation. **Immunol. Today**, **8**: 223-7, 1987.

MOSMANN, T.R. & MOORE, K.W. The role of IL-10 in cross regulation of Th1 and Th2 responses. **Immunol. Today** **12**: A49, 1991.

MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILLIER, Y.; IBAÑEZ, O.M.; FERREIRA, V.C.A.; MEVEL, J.C.; REIS, M.H.; PIATTI, R.M.; STIFFEL, C.; BIOZZI, G. - Genetic Regulation of Multispecific Antibody Responsiveness: Improvement of "High" and "Low" characters. **Eur. J. Immunol.**, **18**: 41-9, 1988.

MUELLER, D.L.; JENKINS, M.K.; SCHWARTZ, R.H. Clonal expansion versus functional clonal inactivation: a costimulatory

signalling pathway determines the outcome of T cell antigen receptor occupancy. **Annu. Rev. Immunol.** 7: 445-80, 1989.

OLIVEIRA, S.L. - **Estudo da expressão fenotípica dos genes que regulam a resposta quantitativa de anticorpos ao nível da imunidade mediada por células.** São Paulo, 1984 (Tese de Mestrado. Departamento de Microbiologia e Imunologia da E.P.M.).

OLIVEIRA, S.L.; IBÁÑEZ, O.M.; MOUTON, D.; SANT'ANNA, O.A.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. - Independent Polygenic Regulation of Quantitative Responsiveness and Expression of Delayed-Type Hypersensitivity (DTH). **Exp. Clin. Immunogenet.**, 2:223-33, 1985.

PALACIOS, R. Mechanisms by which accessory cells contribute in growth of resting T lymphocytes initiated by OKT3 antibody. **Eur. J. Immunol.**, 15: 645-51, 1985.

PASSOS, H.C.; SIQUEIRA, M.; REIS, M.H.; FERREIRA, V.C.A.; IBÁÑEZ, O.M.; SANT'ANNA, O.A.; BIOZZI, G. Genetic control of immune response to protein antigens. 1-Two-way selective breeding of mice for quantitative antibody responsiveness to bovine serum albumin and rabbit gamma-globulin. **J. Immunol.**, 119: 1439-44, 1977.

QASIM, W.; KEHOE, M.A.; ROBINSON, J.H. Does staphylococcal enterotoxin B bind directly to murine T cells? **Immunology**, **73**: 433-7, 1991.

REIS, M.H.; IBAÑEZ, O.M.; CABRERA, W.H.; RIBEIRO, O.G.; MOUTON, D.; SIQUEIRA, M.; COUDERC, J. T-helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4⁺ monoclonal antibody. **Immunology**, **75**: 80-5, 1992.

ROTT, O.; WEKERLE, H.; FLEICHER, B. Protection from experimental allergic encephalomyelitis by application of a bacterial superantigen. **Int. Immunol.**, **3**: 347-53, 1992.

SANT'ANNA, O.A.; FERREIRA, V.C.A.; REIS, M.H.; GENNARI, M.; IBAÑEZ, O.M.; ESTEVES, M.; MOUTON, D.; BIOZZI, G. Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to the flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. **J. Immunogenetics**, **9**: 191-205, 1982.

SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILLIER, Y.; SIQUEIRA, M.; BIOZZI, G. Differences in the genetic control of primary and secondary antibody responses. **Immunology**, **37**: 849-56, 1979.

SANT'ANNA, O.A.; BOUTHILLIER, Y.; MEVEL, J.C.; DE FRANCO, M.; MOUTON, D. Isotypic distribution of antibody

responses in lines of mice selected for high or low immunoresponsiveness. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, **24**: 407-16, 1991.

SCHUMACHER, J.; O'GARRA, A.; SHRADER, B.; VAN KIMENADE, A.; BOND, M.; MOSMANN, T.; COFFMAN, R. The characterization of four monoclonal antibodies specific for mouse IL-5 and development of mouse and human IL-5 enzyme-linked immunosorbent. **J. Immunol.**, **141**: 1576-81, 1988.

SCHWAB, R.; CROW, M.K.; RUSSO, C.; WEKSLER, M.E. Requirements for T cell activation by OKT3 monoclonal antibody: role of modulation of T3 molecules and interleukin 1. **J. Immunol.**, **135**: 1714-18, 1985.

SEDGWICK, J.D. & CZERKINSKY, C.C. Detection of cell-surface molecules, secreted products of single cells and cellular proliferation by enzyme immunoassay. **J. Immunol. Meth.**, **150**: 159-75, 1992.

SEDGWICK, J.D. & HOLT, P.G. A solid-phase immunoenzymatic technique for the enumeration of specific antibody-secreting cells. **J. Immunol. Meth.**, **57**: 301-309, 1983.

SEVERSON, C.D. & THOMPSON, J.S. Quantitative semi-microagglutination. **J. Immunol.**, **96**: 785-9, 1966.

SIQUEIRA, M.; BANDIERI, A.; REIS, M.S.; SANT'ANNA, O. A.; BIOZZI, G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness

to flagellar and somatic antigens of Salmonellae. **Eur.J.Immunol.**, 6: 241-9, 1976.

SIQUEIRA, M.; ESTEVES, M. B.; IBÁÑEZ, O.M.; FERREIRA, V.C.A.; SANT'ANNA, O. A.; REIS, M. H.; BIOZZI, G. Nonspecific genetic regulation of antibody responsiveness in the mouse. **Eur. J. Immunol.**,7: 195-203, 1977.

SRINIVASAN, M.; DOMANICO, S.Z.; KAUMAYA, P.T.P.; PIERCE, S.K. Peptides of 23 residues or greater are required to stimulate a high affinity class II- restricted T cell response. **Eur. J. Immunol.** , 23: 1011-16, 1993.

SWAIN, S.L.; BRADLEY, L.M.; CROFT, M.; TONKONOGY, S.; ATKINS, S.; WEINBERG, A.D.; HUSTON, G. Helper T-cell subsets: phenotype, function and the role of lymphokines in regulating their development. **Immunol. Rev.** 123: 113-44, 1991.

SWAIN, S.L.; WEINBERG, A.D.; ENGLISH, M.; HUSTON, G. IL-4 directs development of TH2-like helper effectors. **J. Immunol.**, 145: 3796-806, 1990.

SWAIN, S.L. Polarized patterns of cytokine secretion. **Current Biology**, 3: 115-117, 1993.

WEGENER, A.M.K.; LETOURNEUR, F.; HOEVELER, A.; BROCKER, T.; LUTON, F.; MALISSEN, B. The T cell receptor /

CD3 complex is composed of at least two autonomous transduction modules. **Cell**, **68**: 83-97, 1992.

WEISS, A. T Lymphocytes Activation. In: **FUNDAMENTAL Immunology** Ed. W.E.Paul, New York, Raven Press, 1989. pp. 365-75.

WHITE, J.; HERMAN, A.; PULLEN, A.M.; KUBO, R.; KAPPLER, J.W.; MARRACK, P. The V β -specific superantigen staphylococcal enterotoxin B: stimulation of mature T Cells and clonal deletion in neonatal mice. **Cell**, **56**: 27-35, 1989.

WIENER, E. & BANDIERI, A. Differences in antigen handling by peritoneal macrophages from the Biozzi high and low responder lines of mice. **Eur. J. Immunol.**, **4**: 457-63, 1974.

ABSTRACT

Genetically selected mice according to the intensity of their humoral response to multiple antigens, were employed as an experimental model to study the regulatory mechanisms of the immune response.

Some aspects of the complex net of immunologic activation were examined using *in vitro* and *in vivo* assays of lymphocytes stimulation, the profile of secreted lymphokines and the antibody isotypes produced after immunization.

In vitro assays using mitogens such as PHA, Con A, SEB, anti-CD3 and rIL-2, whose effects depend on their ability to stimulate receptors involved in the physiologic activation of T lymphocytes, did not show important differences between HGP and LGP lines.

The specific T cell response induced by proteic antigens and alloantigens demonstrated striking interline differences, both in the proliferative assays and IL-2 production. The low response of T lymphocytes of the LGP line is therefore restricted to stimulus involving the combining site for antigen at T Cell Receptor (TCR).

The potentiality of B lymphocytes was evaluated by the appearance of antibody secreting cells in the lymph nodes (LN) through the ELISPOT assay for proteic antigen and in the spleen through PFC and rosettes anti-SE techniques. Total numbers were higher in HGP line, and this response was reflected in the great interline difference on seric antibody levels.

Since the previous treatment with SEB corrected the response of IgG anti-SE of LGP, showing the adjuvant effect of polyclonal activation of T lymphocytes on the antibody production, it seems that the weak response of LGP is not essentially due to a defect in the activity of these B cells.

The levels of lymphokines, $IFN\gamma$, IL-10 and IL-2 produced by *in vitro* assays by sensitized LN cells in response to proteic antigens were different in HGP and LGP, suggesting that in the former group there is a higher stimulation of TH1 and TH2 subsets.

Coincidentally, the superiority of HGP was confirmed in the production of distinct IgG₁, IgE e IgG_{2a} isotypes. Nevertheless a larger interline difference was found in the levels of IgG_{2a}, suggesting a poor ability of TH1 activation in the LGP line.