

**Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas
Área de Imunologia**

**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CELULARES E
HUMORAIS RELACIONADAS COM A IDADE
EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Patricia Ucelli

**Campinas
1998**

Uc3e

36447/BC

Patricia Ucelli



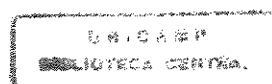
**ESTUDO DAS ALTERAÇÕES CELULARES E HUMORAIS
RELACIONADAS COM A IDADE EM CAMUNDONGOS BALB/c**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
curso de Pós-Graduação em Imunologia
do Departamento de Microbiologia e
Imunologia do Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas
como parte dos requisitos para obtenção
do grau de Mestre em Ciências
Biológicas, na área de Imunologia.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Patricia Ucelli
e aprovada pela Comissão Julgadora
11/12/98 Wirla M. S. C. Tamashiro

Orientadora: Profa Dra Wirla M. S. C. Tamashiro

**CAMPINAS
1998**



9903947

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	
V.	Ex.
TOMBO BC/	36447
PROC.	229/99
C	<input type="checkbox"/>
D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	R\$ 11,00
DATA	03/02/99
N.º CPD	

CM-00120665-4

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Ucelli, Patricia

Uc2e Estudo das alterações celulares e humorais relacionadas com a idade em camundongos BALB/c/Patricia Ucelli. -- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
109f.:ilus.

Orientadora: Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Envelhecimento. 2. Imunidade. 3. Linfócitos. 4. Anticorpos.
I.Tamashiro, Wirla Maria da Silva Cunha. II.Universidade Estadual de Campinas.Instituto de Biologia. III. Título.

Campinas, 11 de dezembro de 1998.

BANCA EXAMINADORA

TITULARES:

Prof.ª Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro (orientadora) Wirla M. S. C. Tamashiro
Wirla Maria da Silva Cunha Tamashiro assinatura

Prof. Dr. João Santana da Silva

assinatura

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada

assinatura

SUPLENTE:

Prof.ª. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

assinatura

Trabalho realizado no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, contando com auxílio da FAPESP através da concessão de bolsa de Mestrado e auxílio pesquisa.

-Aos meus pais, irmãos e familiares, pelo apoio constante e incondicional durante todas as etapas da minha formação

-Ao André, pelo crédito irrestrito e confiança

AGRADECIMENTOS

- Ao órgão de fomento à Pesquisa FAPESP, pelo apoio financeiro ao desenvolvimento desse trabalho através dos processos nº 94/4219-4 (bolsa) e 94/6277-1 (auxílio pesquisa);
- À Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro, pela amizade, orientação e apoio em toda minha formação como Bióloga;
- À amiga Ellen Heidi Costa, pelo auxílio experimental e apoio nas horas difíceis;
- Aos funcionários Airton e Elizabeth, pelo auxílio durante a fase experimental;
- À funcionária do Hemocentro, Fernanda Gonçalves Pereira, pelo auxílio durante ensaios de citometria de fluxo;
- Aos professores e funcionários do DMI, em especial aos funcionários das secretarias de Graduação e Pós-Graduação e aos funcionários do Biotério, que sempre souberam colaborar com o andamento das pesquisas;
- Aos colegas de laboratório, Rose, Luciana e Patricia Léo e aos amigos do curso de Pós-Graduação, pelo auxílio, carinho e amizade;
- À Profa. Dra. Maria Silvia Gatti, pela análise e correção;
- Aos professores Dr. João Santana, Dra. Júlia Sakaruda e Dra. Dagmar Stach-Machado pela análise e correção prévia desta dissertação;
- À todos que, direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho;

Meu muito obrigado!

ABREVIATURAS

ACF –	Adjuvante Completo de Freund
BO-SU-	Biotina-succinamida
BSA -	Soro albumina bovina
Con-A -	Concanavalina A
DMSO -	Dimetilsulfoxido
DN -	Duplo negativas .
DNA –	Ácido nucleico
ELISA –	Enzyme linked immunoabsorbant assay
GVH -	Reação de enxerto versus hospedeiro
H ₂ SO ₄ –	Ácido sulfúrico
HEPES –	N-[2-hydroxyethyl] piperazine N'[2-ethanesulfoic acid]
IFN-γ -	Interferon gamma
Ig -	Imunoglobulina
IL-1β -	Interleucina 1 beta
IL-10 –	Interleucina 10
IL-2 –	Interleucina 2
IL-2R –	Receptor de IL-2
IL-3 -	Interleucina 3
IL-4 –	Interleucina 4
IL-5 –	Interleucina 5
IL-6 –	Interleucina 6

Im -	Intramuscular
ip -	Intraperitoneal
LPS -	Lipopolissacarídeo
MHC -	Complexo de histocompatibilidade principal
MTT -	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide
OPD -	Ortofenilenodiamina
OVA -	Ovoalbumina
PBS -	Salina tamponada
PC -	Fosforilcolina
PHA -	Fito-hemaglutinina
PMA -	Ionomicina+acetato miristato forbol
SDS -	Dodecilsulfato de sódio
SRBC -	Hemáceas de sangue de carneiro
TCR -	Receptor de células T
TH1 -	Linfócitos T auxiliares tipo 1
TH2 -	Linfócitos T auxiliares tipo 2
TNF- α -	Fator de necrose tumoral alfa
TNP -	2, 4 ,6 Trinitrophenyl acid

SUMÁRIO

	Página
I – Introdução.....	1
1 – Envelhecimento.....	2
1.1 – Aspectos Gerais.....	2
1.2 – Envelhecimento e Sistema Imunológico.....	3
1.2.1 – Aspectos Gerais do Envelhecimento Imunológico.....	4
1.2.2 – Resposta Celular.....	7
1.2.3 – Resposta Humoral.....	12
II – Objetivos.....	16
III – Materiais e Métodos.....	18
1 – Animais.....	19
2 – Antígenos.....	20
3 – Lectinas.....	21
4 – Anticorpos.....	21
4.1 – Imunoglobulina de Coelho Anti- Imunoglobulina de Camundongo	
Marcada com Peroxidase.....	21
4.2 – Anticorpos Anti- Citocinas.....	24
5 – Imunização de Camundongos com TNP-BSA.....	26
5.1 – Imunização Segundo Esquema de Duas Doses (Resposta Secundária)....	27
5.2 - Imunização Segundo Esquema de Uma Dose (Resposta Primária).....	28
6 – Cultura de Células.....	29
6.1 – Cultura de Células Esplênicas Totais.....	29

6.2 – Atividade do Mitógeno Con-A sobre a Proliferação de Linfócitos.....	30
7 – Preparo de Sobrenadantes de Cultura de Células Esplênicas Estimuladas com Com-A	32
8 – Titulação de Soros Imunes.....	33
8.1 – Titulação por ELISA.....	33
8.2 – Representação dos Resultados.....	35
9 – Dosagem de Citocinas.....	36
9.1 – Dosagem de IL-4.....	37
9.2 – Dosagem de IFN- γ	39
9.3 – Dosagem de IL-2.....	40
9.4 – Dosagem de IL-10.....	41
10 – Células Esplênicas Totais.....	41
11 – Dosagem de Proteínas.....	43
12 – Análise Estatística.....	44
IV – Resultados.....	45
1 - Produção de Anticorpos Durante o Desenvolvimento Pós-Natal de Camundongos.....	46
1.1 – A Resposta Imune Primária.....	46
1.2 – A Resposta Imune Secundária.....	50
2 – Resposta Proliferativa.....	54
2.1 – Resposta Proliferativa de Linfócitos de Camundongos Naive.....	55
2.2 – Resposta Proliferativa de Linfócitos de Camundongos Imunizados.....	55
3 – Níveis de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de Células Esplênicas.....	63

6.2 – Atividade do Mitógeno Con-A sobre a Proliferação de Linfócitos.....	30
7 – Preparo de Sobrenadantes de Cultura de Células Esplênicas Estimuladas com Com-A	32
8 – Titulação de Soros Imunes.....	33
8.1 – Titulação por ELISA.....	33
8.2 – Representação dos Resultados.....	35
9 – Dosagem de Citocinas.....	36
9.1 – Dosagem de IL-4.....	37
9.2 – Dosagem de IFN- γ	39
9.3 – Dosagem de IL-2.....	40
9.4 – Dosagem de IL-10.....	40
10 – Células Esplênicas Totais.....	41
11 – Dosagem de Proteínas.....	43
12 – Análise Estatística.....	44
IV – Resultados.....	45
1 - Produção de Anticorpos Durante o Desenvolvimento Pós-Natal de Camundongos.....	46
1.1 – A Resposta Imune Primária.....	46
1.2 – A Resposta Imune Secundária.....	50
2 – Resposta Proliferativa.....	54
2.1 – Resposta Proliferativa de Linfócitos de Camundongos Naive.....	55
2.2 – Resposta Proliferativa de Linfócitos de Camundongos Imunizados.....	55
3 – Níveis de Citocinas em Sobrenadantes de Cultura de Células Esplênicas.....	63

3.1 – Níveis de IL-2 e IFN- γ Liberados por Células Esplênicas de Camundongos BALB/c.....	63
3.2 – Níveis de IL-4 e IL-10 Liberados por Células Esplênicas de Camundongos BALB/c.....	71
4 – Subpopulações de Células T.....	77
V - Discussão.....	80
VI – Conclusão.....	93
VII – Resumo.....	97
VIII - Bibliografia.....	99

I – INTRODUÇÃO

1 - ENVELHECIMENTO

1.1 - ASPECTOS GERAIS

O envelhecimento está se tornando um dos temas mais críticos do planeta do ponto de vista sócio-econômico e biológico. A população mundial cresce numa taxa anual de 1,7% ao ano, mas a proporção de pessoas acima de 65 anos de idade está crescendo numa proporção de 2,5% ao ano. Dessa forma, as mudanças demográficas relacionadas com a estrutura etária da população global estão criando novas demandas nos sistemas de saúde (DEAN, 1997).

É sabido que as funções fisiológicas do organismo geralmente declinam com a idade numa função linear. Muitos investigadores afirmam que o envelhecimento dos indivíduos é causado pela senescência em alguns tipos celulares. Inicialmente, diversos estudos sobre o envelhecimento do organismo, de órgãos e tecidos foram conduzidos. Entretanto, estudos atuais buscam o entendimento do envelhecimento numa base celular e molecular (MAKINODAN & YUNIS, 1977)

Estudos em animais e humanos mostraram outras características alteradas em linfócitos de indivíduos envelhecidos, incluindo: aparente decréscimo na capacidade de utilização de IL-2 e produção anormal de receptores para citocinas; aumento da injúria celular causada por agentes ambientais; decréscimo na habilidade de apresentação e “capping” de antígenos; aumento na supressão da resposta de células T por células aderentes; prejuízo na comunicação célula a célula e metabolismo de lipídes alterado

(TU *et al.*, 1995). Imperfeições no sistema de defesa celular que protegem contra a fixação de injúria no DNA poderiam levar a um acúmulo de mutações que, por si só, ou em conjunto com outras alterações relacionadas com a idade, contribuiriam para o desenvolvimento de patologias relacionadas com o envelhecimento (BARNETT & KING, 1995).

Alterações na transdução de sinal têm sido relacionadas com o envelhecimento. Eventos como a mobilização de cálcio, quebra de fosfatidilinositol, acúmulo de transcritos de proto-oncogenes, expressão de marcadores de ativação e síntese de novas proteínas são deficientes em indivíduos envelhecidos, além de estarem sendo conduzidos estudos com relação à atividade de proteína quinase e as funções da proteína G.(FÜLOP, 1994)

Do ponto de vista imunológico, a sobrevivência dos organismos mamíferos está relacionada com a habilidade do mecanismo de defesa do hospedeiro de perceber e responder a uma grande variedade de desafios. Para a manutenção da homeostase do organismo, a resposta imunológica deve ser efetiva contra o desafio e então diminuir quando a resposta não se torna mais necessária (MAKINODAN & YUNIS, 1977). Mas, com o avanço da idade em mamíferos, ocorre um decréscimo gradativo das funções do sistema imunológico.

1.2 - ENVELHECIMENTO E SISTEMA IMUNOLÓGICO

A senescência imunológica foi primeiramente sugerida em 1929, pelos pesquisadores FRIEDBERGER *et al.* e THOMSEN & KETTEL (Appud. PRICE &

MAKINODAN, 1976 - A e B). Esses pesquisadores mensuraram os níveis de anticorpos naturais contra os antígenos A e B do grupo sanguíneo em humanos e contra hemáceas de carneiro e coelho em função da idade. Pelos resultados foi possível observar diminuição dos níveis de anticorpos em indivíduos de idade mais avançada.

Estudos realizados em camundongos mostraram que, com o envelhecimento, ocorrem alterações na produção, maturação e regulação das células linfóides, as quais são apontadas como responsáveis pela maior incidência de doenças infecciosas e tumorais em indivíduos idosos (KISHIMOTO *et al.*, 1976). Sendo o sistema imune bastante afetado pelo envelhecimento, o entendimento das alterações desse sistema relacionadas com a idade, pode ser de grande valia no estudo de doenças que apresentam maior incidência na fase tardia.

1.2.1 - ASPECTOS GERAIS DO ENVELHECIMENTO IMUNOLÓGICO

Sabe-se que o processo de seleção de linfócitos que ocorre no timo é crítico na habilidade do sistema imune em discriminar o próprio e o não próprio. Células T $CD4^{+}$ (T auxiliares) e T $CD8^{+}$ (T citotóxica) maduras saem do timo e migram para o sangue, linfonodos e tecidos linfóides periféricos. O timo, conhecido como um órgão de diferenciação de células precursoras comprometidas com a linhagem T, sofre alterações marcantes em função da idade (TOICHI *et al.*, 1997).

Muitos trabalhos tem reportado que os defeitos nas células T, especialmente células T $CD4^{+}$, são um dos responsáveis pelo declínio relacionado com a idade na resposta imune. Esses trabalhos são geralmente bem aceitos porque a involução tímica

após a puberdade precede o declínio da imunidade. (PAWELEC, 1995 e TOICHI *et al.*, 1997)

É conhecido de longa data que a massa linfóide do timo decresce com a idade, como resultado da atrofia do córtex, coincidindo com a maturidade sexual do indivíduo (MAKINODAN & KAY, 1980). A involução tímica pode ser relacionada com diversos fatores, tanto fatores intrínsecos quanto extrínsecos. Com o avanço da idade, a capacidade tímica de promover a diferenciação de células T declina juntamente com mudanças na composição das subpopulações de células T produzidas (HIROKAWA *et al.*, 1994).

A involução tímica que ocorre com a idade é provavelmente um fator determinante das alterações das funções dos linfócitos T periféricos. Esse processo de involução envolve, além da perda progressiva da arquitetura normal do órgão e da composição celular, uma significativa redução na produção de linfócitos T maduros. THOMAN (1995) demonstrou que várias etapas distintas na seqüência de desenvolvimento dos linfócitos sofreram o impacto do envelhecimento. Estudos em camundongos C57Bl/6 mostraram que, no intervalo de 14 a 17 meses de idade, ocorreram significantes perturbações nas frequências de muitas subpopulações de células CD4⁻ CD8⁻ (duplo negativas - DN). Isso incluiu um aumento na porcentagem dos primeiros progenitores tímicos. As alterações que ocorreram na fase tardia do período de vida do animal incluíram um decréscimo na fração de células T imaturas, células duplo positivas e um aumento nas frações duplo negativas e T CD4⁺. Essas alterações são consistentes com a possibilidade que a involução tímica resulte de um ou mais bloqueios “do desenvolvimento”, que limitam as transições diferenciativas dentro da população DN. Além disso, a despeito da queda de 80% no número de

células tímicas totais entre 2 e 24 semanas de vida dos animais estudados, a subpopulação de células T DN CD3⁺ sofreu declínio de apenas 20% durante esse período. Essa porcentagem marcante de células DN CD3⁺ viabiliza a hipótese que um caminho de diferenciação alternativo de células T desempenhe um papel incrivelmente significativo com o avanço da idade (THOMAN, 1995).

Um outro evento resultante da involução do timo com o envelhecimento é um desbalanço clonal de células, no qual o número de células T helper/inducer autoantígeno-específicas aumentou. Como consequência, os níveis de autoanticorpos circulantes aumentaram em função da idade, enquanto a resposta a antígenos estranhos declinou. Esse resultado foi originado do estudo da doença autoimune da tireóide em mulheres e estudos utilizando timectomia de animais recém-nascidos de uma linhagem (Obese Strain Chickens) que desenvolve espontaneamente tireoidite autoimune (HIROKAWA *et. al.*, 1994, ROSE, 1994 e ROWLEY *et. al.*, 1968).

As alterações no ambiente intratímico podem também estar ligadas à expressão reduzida de moléculas de MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) em células epiteliais e ao decréscimo da produção e secreção de hormônio tímico e citocinas (DORIA & FRASCA, 1994).

Com relação à fatores extrínsecos, estudos recentes mostraram que, ao menos em parte, as manifestações ocasionadas pelo envelhecimento, nos compartimentos de linfócitos T, podem ser devidas a alterações nas “stem cells” geradas na medula óssea. Entretanto, ainda não está esclarecido como as células linfhemopoiéticas na medula óssea são afetadas pelo envelhecimento (SHARP *et al.*, 1990). Observou-se que as células progenitoras de linfócitos apresentaram frequência reduzida na medula óssea de camundongos velhos, em comparação com a frequência dessas células em animais

mais jovens. No entanto, isso poderia ser compensado pelo fato que as células provenientes de animais velhos possuem capacidade de se replicar logo após a chegada ao timo, enquanto as células de animais jovens se multiplicam mais lentamente (SHARP *et al.*, 1991), provavelmente devido ao fato das primeiras estarem em estágios mais avançados de desenvolvimento (GLOBERSON, 1994).

1.2.2 - RESPOSTA CELULAR

Os linfócitos T são a segunda maior classe de linfócitos, sendo que esses são divididos em duas populações funcionalmente distintas, os linfócitos T helper (ou auxiliares) e os linfócitos T citotóxicos. Os linfócitos T auxiliares, em resposta à ativação antigênica, secretam citocinas, cujas funções estão relacionadas com a proliferação e diferenciação de células T, tanto quanto de outras células como células B e macrófagos. As citocinas também estão envolvidas na resposta inflamatória, proporcionando importantes ligações entre imunidade natural e específica. Em camundongos, células T CD4⁺ (auxiliares) podem ser divididas em duas subpopulações funcionais distinguíveis através do padrão de secreção de interleucinas. A interleucina -2 (IL-2) e o interferon- γ (IFN- γ) e linfotóxina são citocinas geralmente liberadas pela subpopulação T helper 1 (TH₁). As citocinas liberadas pelas células T helper 1, particularmente o IFN γ , parecem dirigir a resposta do hospedeiro para um padrão inflamatório e para a produção de anticorpos da classe IgG1. Interleucina-4 (IL-4), interleucina-5 (IL-5), interleucina 6 (IL-6) e interleucina -10 (IL-10) são secretadas principalmente por células da subpopulação T helper 2 (TH₂). As citocinas liberadas

por T helper 2 parecem influenciar uma resposta imune relacionada com a produção de anticorpos. A citocina IL-10 parece ter uma ação regulatória sobre a atividade e expansão de clones T helper 1. (MOSMANN *et al.*, 1986; MOSMANN and COFFMAN, 1987).

A subdivisão das células T em células naive e de memória mostraram que IL-2 é geralmente produzida por células naive, enquanto as citocinas IL-3, IL-4, IL-5 e IFN- γ são predominantemente produzidas por células de memória.

As subpopulações de células TH₁ e TH₂ sofrem mudanças notáveis, relacionadas com o aumento da idade. Este desbalanço em indivíduos de idade mais avançada pode estar relacionado com uma resposta imune insuficiente (CAKMAN *et al.*, 1996). Alguns autores observaram que o número de células TH₂ aumenta com o envelhecimento, enquanto o número de células TH₁ mantém-se constante ou declina com a idade (ALBRIGHT & ALBRIGHT, 1994 e CINADER, 1994).

Por outro lado, alguns estudos mostraram um decréscimo na secreção de interferon- γ (IFN- γ) e interleucina 2 (IL-2) após estimulação, em indivíduos de idade mais avançada, enquanto as alterações nas citocinas relacionadas com a subpopulação TH₂ têm apresentado controvérsias. Outros trabalhos sobre as alterações relacionadas com a idade no perfil de secreção de citocinas sugerem, no entanto, a ocorrência de redução na síntese de IL-2 e IL-4 e liberação de formas solúveis de IL-2R (DORIA & FRASCA, 1994, FRASCA *et al.*, 1994), contribuindo significativamente para o decréscimo na resposta proliferativa de células T, observado com o envelhecimento.

Verificou-se também que as células T CD4⁺ de memória de camundongos jovens secretam mais IL-4 que as células de doadores velhos, quando ativadas com

anticorpos anti-CD3 e colocadas em cultura por 7 a 10 dias na presença de IL-2 (PAWELEC *et al.*, 1995 e WITKOWSKI *et al.*, 1994). Em alguns estudos utilizando cultura de curto termo de células T estimuladas com mitógenos, foi verificado um aumento na secreção de IL-4 com o avanço da idade (WITKOWSKI *et al.*, 1994). Em ensaios conduzidos utilizando camundongos SAMP8 (camundongos com imunosenescência acelerada) e Con-A como estímulo, AOKI *et al.*, (1995) mostraram um aumento na produção de IFN- γ , IL-3, IL-4 e IL-5 e um decréscimo na produção de IL-2. No entanto, os camundongos controle (linhagem AKR), não mostraram aumento de IL-2, mas apresentaram aumento na produção de IFN- γ e IL-4.

BORN *et al.*, (1995) reportaram a produção *in vitro* de IL-1 β e TNF- α após estimulação mitogênica de células mononucleares com LPS, enquanto a produção de IL-2 e IFN-gamma foi mensurável após estimulação com PHA.

Dessa forma, sabemos que a homeostase da resposta imune também requer um balanço do contato célula à célula e de fatores supressores e estimuladores do sistema. Entre esses fatores, conhecidos como citocinas ou interleucinas, a interleucina-2 desempenha um papel importante no sistema imune, regulando o crescimento e as funções das células envolvidas na resposta humoral e mediada por células (BALKWILL, 1991).

O declínio da proliferação celular é também considerado uma das principais alterações funcionais de células T associadas com a idade.

É sabido que certos estímulos são capazes de induzir proliferação *in vitro* de esplenócitos e secreção de interleucinas. Essa proliferação pode ser resultante de antígenos específicos, que ativam um pequeno clone de células T tanto quanto de

ativadores policlonais, como por exemplo concanavalina A (Con-A), fitohemaglutinina (PHA), antígeno mitogênico (anti-CD3) e ionomicina+acetato miristato forbol (PMA), os quais ativam não especificamente um grande número de clones de células T, quando utilizados camundongos como modelo experimental.

A concanavalina A (Con-A) é uma lectina extensivamente estudada, sendo que essa desempenha diferentes efeitos biológicos sobre os linfócitos. Esta proteína indutora de proliferação de células T, foi um dos primeiros ativadores policlonais de células T utilizados. Seus efeitos mitogênicos sobre as células T são dependentes da habilidade de estimular receptores relevantes envolvidos na ativação de células T. Esse mitógeno pode se ligar a componentes do TCR, e sua habilidade de ativar células T é dependente da expressão e função do TCR (CHILSON & KELLY-CHILSON, 1989).

A habilidade das células imunes de responderem a várias formas de estimulação mitogênica (GOONEWARDENE & MURASKO, 1995) também sofre decréscimo drástico com a idade, em roedores. A resposta a mitógenos, como a fitohemaglutinina (PHA), mensurada *in vitro*, também é reduzida com o envelhecimento e se correlaciona com o declínio observado na capacidade de animais velhos desenvolverem reação de enxerto versus hospedeiro (GVH) e de resistirem ao desafio com células tumorais, mensurados *in vivo*. (ADLER *et al.*, 1971; BECKER *et al.*, 1979; HALLGREN *et al.*, 1973; KONEN *et al.*, 1973 e WESJER & HÜTTEROTH, 1974).

A resposta reduzida de linfócitos de indivíduos idosos pode estar relacionada a deficiências durante ativação dessas células, bem como na ausência de quantidades suficientes de IL-2, citocina relacionada com a promoção e regulação do crescimento e das funções das células imune (PAHLAVANI & RICHARDSON, 1996).

Outro fator relacionado com a inabilidade de células T de indivíduos de idade mais avançada de proliferar num nível comparável àquele obtido em células T de indivíduos jovens, após estimulação mitogênica, pode estar relacionado a um defeito na transdução de sinal do complexo CD3-receptor de células T em indivíduos idosos. Segundo descrições de KIRMAN e colaboradores (1996), células T esplênicas de camundongos BALB/c de idade mais avançada, ativados *in vitro* com anticorpo para CD3-epsilon, secretaram níveis mais elevados de IL-4, porém níveis mais baixos de IL-2 que células esplênicas de camundongos jovens. Células de camundongos de maior faixa etária, aos quais foi administrado, de forma contínua, IL-2 exógena, quando estimuladas *in vitro*, mostraram um padrão de expressão intracelular e de secreção das interleucinas IL-2 e IL-4 semelhantes àquele encontrado em camundongos jovens. Dessa forma, a exposição de camundongos de idade mais avançada a IL-2 exógena restituiu o desbalanço de expressão de citocinas *in vivo* e de secreção *in vitro*, relacionado com a idade.

Quando analisadas as células T CD3 portadoras dos marcadores celulares CD4 e CD8, os estudos mostraram um decréscimo na razão células TCD4⁺/CD8⁺ com o envelhecimento, mostrando uma relação inversa entre idade e razão de células T CD4/CD8 (CALLAHAN *et al.*, 1993). O número total de linfócitos (células TCD3⁺) tendeu a diminuir visivelmente com a idade nas subpopulações de células TCD4⁺ e TCD8⁺, enquanto os números de células T ativadas (HLA-DR/CD3⁺), células “natural killer” (CD16⁺) e células T expressando receptor para IL-2 (CD25⁺/CD3⁺) aumentaram marcadamente com a idade (BORN *et al.*, 1995).

LI e colaboradores (1995) examinaram o efeito do envelhecimento na habilidade de células T CD4⁺ em promover proliferação de células B e secreção de

anticorpos, em condições que minimizaram os efeitos das mudanças associadas com a idade na proliferação de células T e produção de citocinas. Esses autores observaram que a produção de imunoglobulina e a síntese de DNA foram estimulados mais fortemente pelas células de indivíduos jovens.

1.2.3 - RESPOSTA HUMORAL

Estudos em roedores mostraram que a resposta primária, mas não necessariamente a secundária, sofre um decréscimo com a idade (CALLARD & BASTEN, 1978; GOULLET & KAUFMANN, 1965; KISHIMOTO *et al.*, 1976; MORTON & SIEGEL, 1969; SEGRE & SEGRE, 1976A e SEGRE & SEGRE, 1976B). Foi sugerido, anteriormente, que essas alterações eram decorrentes de variações nas populações de células T, que regulam a resposta de anticorpos, mas não necessariamente nas células B antígeno-específicas. Tem sido detectado um significativo decréscimo na avidéz de anticorpos produzidos por camundongos de idade avançada, mas não universalmente (DORIA *et al.*, 1978; FUJIWARA & KISHIMOTO, 1979 e NAOR *et al.*, 1976). Estudos realizados em camundongos BALB/c mostraram que os animais envelhecidos não apresentaram declínio nos valores da resposta primária *in vivo* quando da utilização do antígeno fosforilcolina (FC), sendo que esses apresentaram melhor resposta que animais jovens singeneicos. Em contraste, a resposta secundária tem um perfil diferenciado, sendo que os animais envelhecidos mostraram um decréscimo marcado em anticorpos específicos para FC. Células B de doadores novos e velhos imunizados com uma dose ou imunizados duas vezes com o antígeno

obtido de *Streptococcus pneumoniae*, quando em cultura na ausência de células T e na presença de antígeno não apresentaram diferenças significativas na resposta de anticorpos para FC. Entretanto, células T CD4⁺ de animais envelhecidos falharam em aumentar a resposta de células B *in vitro* quando em comparação com animais jovens, enquanto as células T CD8⁺ não mostraram nenhum efeito regulatório. Nesses experimentos os autores demonstraram que alterações na rede idiotípica não poderiam ser relacionadas ao declínio na resposta secundária. (BORGHESI & NICOLETTI, 1995).

As funções alteradas das células imunoregulatórias parece contribuir para a pobre e insustentada resposta de indivíduos envelhecidos à imunização primária e secundária. Quando comparados com adultos, indivíduos envelhecidos mostraram baixos títulos de anticorpos pré e pós-imunização, baixa frequência de níveis de anticorpos protetivos um mês após imunização, um rápido declínio nos títulos de anticorpos pós-imunização e altos títulos de anticorpos não protetivos 12 meses após imunização (HAENEY, 1994).

Estudos realizados em camundongos mostram que o número total de células B parece não sofrer alteração ao longo da vida (BECKER *et al.*, 1979; CALLARD *et al.*, 1977 e STUTMAN, 1972).. Pela análise do desenvolvimento de células B em função da idade, foi revelado que ocorre uma larga distribuição de progenitores de células B, células pré-B e células B em tecidos fetais, dando suporte à hipótese de origem multifocal de células B durante o desenvolvimento embriogênico. Um relativo valor constante de precursores de células B da medula óssea, de fenótipo imaturo (CD24^{hi}CD10⁺CD20^{lo}IgD⁻) é mantido da gestação até oito décadas de vida. Durante a infância, uma subpopulação de células B de fenótipo maduro

(CD24^{lo}CD10⁺CD20^{hi}IgD⁺) acumula-se na medula óssea e se torna a subpopulação de células B dominante na medula óssea adulta (NUÑEZ *et al.*, 1996).

Foi demonstrado uma diminuição na habilidade de células B esplênicas em se diferenciarem para células secretoras de anticorpos, em decorrência do envelhecimento. Após a imunização de camundongos com TNP-SRBC, a resposta das células B derivadas da medula de indivíduos envelhecidos, em termos de anticorpos produzidos, foi aproximadamente a metade daquela de células B de indivíduos jovens, sugerindo que os déficits em células B podem ser parcialmente responsáveis pela resposta anti-TNP prejudicada em células esplênicas de animais envelhecidos (KISHIMOTO *et al.*, 1976).

O repertório de anticorpos sofre mudanças significativas com o avanço da idade em camundongos. A senescência imune é também caracterizada por uma diminuição na heterogeneidade da resposta de anticorpos para o antígeno, ocorrendo alterações no isotipo e afinidade de ligação ao antígeno. (BEN-YEHUDA *et al.*, 1994). CINADER (1994) realizou experimentos onde a resposta imune de diferentes linhagens de camundongos foi examinada, após desafio com antígeno solúvel ou antígeno agregado. As linhagens utilizadas mostraram alterações na produção de anticorpos, relacionadas com a idade, ainda que em diferentes graus. Em todas as linhagens examinadas foi possível induzir tolerância imunológica a antígenos solúveis quando o animal injetado era relativamente jovem. Os animais mais velhos de algumas linhagens tornaram-se resistentes à regulação negativa, mas outras não. Essas alterações na indução de tolerância em diferentes linhagens, em função da idade, podem estar relacionadas com mudanças na atividade de células supressoras.

As alterações do sistema imunológico relacionadas com o envelhecimento são de natureza diversa. Dessa forma, não é possível identificar o envelhecimento imunológico como resultante de um único passo nesta sequência, mas sim de uma série de deficiências que contribuem para o declínio da competência imune com o avanço da idade. É uma tarefa difícil, portanto, estudar o envelhecimento imunológico utilizando-se apenas um parâmetro para análise ou apenas certas idades arbitrariamente escolhidas.

Os estudos anteriormente descritos mostram dados obtidos a partir de grupos de animais durante diferentes períodos de vida ou estudo que acompanharam um mesmo grupo por um curto período de tempo.

Tornou-se de grande interesse o desenvolvimento de um estudo sistemático, no qual grupos de animais de diferentes faixas etárias foram acompanhados, a partir de uma determinada idade até a morte natural do animal. Dessa forma, o trabalho por nós realizado buscou acompanhar animais da linhagem BALB/c, desde a idade perinatal até o limite de vida da linhagem, de forma a não se realizar uma classificação arbitrária.

Visando obter uma análise mais completa do envelhecimento, analisamos diferentes parâmetros da resposta imunológica, abrangendo a produção de anticorpos e níveis de citocinas após estimulação primária e secundária, proliferação de células linfóides e porcentagem populacional de células T helper e citotóxicas.

II - OBJETIVOS

- 1 - Investigar de forma sistemática o sistema imunológico de camundongos BALB/c, desde o período pós natal até a idade limite da raça, quanto ao desenvolvimento das subpopulações de linfócitos T $CD3^+CD4^+$ e T $CD3^+CD8^+$, no sangue periférico
- 2 - Analisar a capacidade dos esplenócitos desses animais de responder à lectinas como a Con-A.
- 3 - Verificar o desenvolvimento da resposta imune a antígenos simples como o trinitrofenil (TNP), e a antígenos complexos como a soro albumina bovina (BSA), pela quantificação da produção de anticorpos específicos para esses antígenos.
- 4 - Realizar uma análise dos padrões de secreção das citocinas IL-2, IL-4, IL-10 e IFN- γ por células esplênicas, cultivadas na presença de Con-A, obtidas de animais de diferentes faixas etárias, imunizados ou naïve.

III - MATERIAL E MÉTODOS

1- ANIMAIS

Os camundongos empregados foram obtidos do Centro Multi-institucional de Bioterismo da UNICAMP (CEMIB/ UNICAMP). Camundongos da linhagem isogênica BALB/c, machos e fêmeas, com 15 dias; 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 72 e 96 semanas foram utilizados. Esses animais foram mantidos durante a experimentação no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) do Instituto de Biologia (IB) da UNICAMP, em ambiente com temperatura controlada, com água e ração estéreis em livre demanda. Os grupos utilizados nas experimentações foram constituídos por um número mínimo de três animais, sendo que em alguns experimentos foram utilizados 6 animais para formação dos grupos experimentais. Para análises e discussões futuras, foi realizada uma classificação dos animais em função da idade, sendo essa: animais neonatos (2 semanas), jovens (4 e 8 semanas), adultos jovens (16 e 24 semanas), adultos velhos (32, 40 e 48 semanas) e velhos (72 e 96 semanas).

Camundongos “nudes” das linhagens BALB/c, CBA/J, C57BL/6 e C3H, não importando sexo ou idade, doados pelo CEMIB/ UNICAMP, foram empregados para obtenção de líquido ascítico, contendo anticorpos monoclonais anti-citocinas. Esses animais foram sempre utilizados imediatamente após a sua retirada do CEMIB e mantidos no DMI, em ambiente com temperatura controlada, com água e ração estéreis, em livre demanda, durante o período de experimentação.

2- ANTÍGENOS

O preparo dos antígenos complexos TNP-BSA e TNP-OVA foi realizado segundo indicações de LITTLE E EISEN (1966), com algumas alterações. Quinhentos miligramas (mg) de ovalbumina ou de soroalbumina bovina cristalizadas (OVA, grau VI e BSA Fraction V; SIGMA) foram dissolvidas em 5 mililitros (ml) de tampão borato de sódio 0,02 M, pH 9,0 e a solução foi mantida por 18 horas a 4°C. Em seguida, as soluções foram centrifugadas a g (4,000 rpm) por 20 minutos, a 4°C (centrífuga refrigerada Beckman), descartando-se o material não solubilizado. Aos sobrenadantes obtidos foram adicionados, gota a gota, 2,75 ml de uma solução de TNP a 4,36% (SIGMA), em tampão borato de sódio 0,21 M pH 7,0. A seguir o volume das misturas foi ajustado para 10,0 ml com tampão borato de sódio 0,02 M pH 9,0, mantendo-se os materiais sob agitação lenta, protegidos da luz e a temperatura ambiente, por um período de 30 minutos. Ao final deste período, os conjugados foram dialisados em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25, PHARMACIA). Em uma coluna de 2,0 x 40,0 cm, contendo Sephadex G-25 previamente equilibrada com PBS 0,05M pH7,2, adicionou-se lentamente 10,0 ml do conjugado. A seguir, conectou-se a coluna ao reservatório contendo PBS 0,05M pH7,2, e o material foi eluído em um fluxo de 30 ml por hora. As frações foram coletadas em tubos de ensaio, em alíquotas de 2 ml por tubo. Após a exclusão do volume morto da coluna, as primeiras frações apresentando cor amarelo escuro (conjugado) foram reunidas em “pool” e dialisadas contra PBS pH7,2 0,15M. As frações de baixo peso molecular foram descartadas. Após a diálise foram feitas as dosagens de proteína nos conjugados TNP-OVA e TNP-BSA (15 e 12

mg/ml, respectivamente) que foram a seguir aliquotados e mantidos a -20°C , até o momento do uso.

3- LECTINA

Concanavalina A (Con-A) foi preparada a $5\text{ }\mu\text{g/ml}$ em meio RMPI completo (RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemica) contendo 2mM de HEPES (Sigma), bicarbonato de sódio (Sigma) e 2-Mercaptoetanol (Sigma) e suplementado com Soro Fetal Bovino (Microbiológica ou Sigma) a 10% e gentamicina (Sigma)). O mitógeno foi aliquotado e armazenado a -20°C até o momento de uso.

4- ANTICORPOS

4.1- IMUNOGLOBULINA DE COELHO ANTI-IMUNOGLOBULINA DE CAMUNDONGO MARCADA COM PEROXIDASE

O conjugado preparado a partir de imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de camundongo foi produzido para utilização em ensaios para titulação dos soros imunes de animais imunizados com o antígeno TNP-BSA. Dessa forma, foi obtido um soro de coelho anti-Imunoglobulina de camundongo, pela imunização de animais com imunoglobulina de camundongo purificadas a partir do soro normal. Os animais foram sangrados para a obtenção do soro imune. O soro de coelho anti-Ig de

camundongo foi purificado por cromatografia de afinidade em Sepharose Proteína A. Uma amostra de oito ml do soro de coelho anti-Imunoglobulina de camundongo, obtido anteriormente em nosso laboratório, foi cromatografada em coluna contendo Sepharose-Proteína A, previamente equilibrada com tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,0, segundo indicações de EY *et al.* (1978). Após incubação de 30 minutos, o material foi eluído em um fluxo de 30 ml por hora, colhendo-se amostras de 5 ml por tubo. Em seguida, a coluna foi exaustivamente lavada com o mesmo tampão de equilíbrio. A eluição das proteínas não ligadas à resina foi acompanhada através de leitura espectrofotométrica das amostras, a 280 nm, até D.O. inferior a 0,05. O tampão de eluição das proteínas ligadas à matriz (glicina-HCl 0,1M pH 2,8) foi então conectado à coluna. Amostras de 5 ml foram colhidas em tubos de ensaio, contendo um volume de tampão Tris-HCl 1M pH 8,5 suficiente para neutralizar a amostra coletada, mergulhados em banho de gelo, e no fluxo máximo da coluna. As absorbâncias das amostras coletadas foram acompanhadas em espectrofotômetro, a 280 nm, até D.O. inferior a 0,05. Os eluatos com D.O. igual ou superior a 0,1 foram reunidos em “pool”, concentrados e dialisados em membrana YM-10 (AMICON) contra tampão carbonato de sódio 0,2 M pH 9,5. O conteúdo de proteína no material purificado foi dosado por método colorimétrico.

O método descrito por NAKANE E KAWAIOI (1974) foi utilizado para o preparo do conjugado anticorpo-peroxidase. Oito miligramas de peroxidase (HRPO, SIGMA) foram ressuspensas em 2 ml de água bidestilada e ativadas com periodato de sódio 0,1 M, sob agitação lenta, por 20 minutos, à temperatura ambiente. Em seguida, esse material foi dialisado contra tampão acetato de sódio 0,001 M pH 4,4 por 18 horas, protegido de luz. Para conjugação, adicionou-se 0,5 ml da solução de IgG de

coelho anti-Ig de camundongo (32 mg de proteína/ml de tampão carbonato de sódio 0,2 M pH 9,5.), à solução contendo a HRPO ativada, completando-se o volume para 5,0 ml com tampão carbonato de sódio 0,2 M, pH 9,5. A mistura foi mantida sob agitação lenta por 3 horas, à temperatura ambiente e protegida de luz. A seguir, adicionou-se 200 µl de uma solução de boridreto de sódio 0,106 M, mantendo-se a mistura em repouso por duas horas, a 4^o C. Em seguida, precipitou-se o conjugado pela adição lenta de igual volume de solução de sulfato de amônia saturada, pH 7,2, em banho de gelo. O precipitado foi separado por centrifugação, a 4,000 rpm por 15 minutos, a 4^o C e então ressuspenso em 2,0 ml de PBS pH 7,2. A solução obtida foi exaustivamente dialisada contra PBS pH 7,2, até a completa retirada do sulfato de amônia. Após a diálise, adicionou-se BSA ao conjugado, na concentração final de 1%, e glicerina tamponada (pH 7,2), volume a volume. O material foi aliquotado e armazenado a -20^o C até o uso.

Com a finalidade de determinar o título do conjugado anti-Ig de camundongo/Peroxidase, um ensaio imunoenzimático foi realizado em placa flexível de 96 poços (FALCON). Para a sensibilização, cada poço da placa recebeu 50 µl de uma solução contendo 10 µg/ml de TNP-BSA em tampão carbonato-bicarbonato de sódio, 0,02M, pH 9,2. A placa foi incubada a 37^oC, em câmara úmida por um período de uma hora e, a seguir mantida a 4^oC por 18 horas. O excesso de antígeno não adsorvido foi removido e a placa lavada três vezes com PBS pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma) (PBS-Tw). Adicionou-se, a cada poço, 100 µl de uma solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5%, em PBS pH 7,2 (PBS-MO) e incubou-se a placa por uma hora a 37^oC. Como primeiro anticorpo utilizou-se um soro pré-imune e um pool de soros de camundongos BALB/c imunizados com TNP-BSA (esquema II,

descrito acima), diluídos seriadamente (1:50 até 1:6,400) em PBS-MO a 2%. Seguiu-se uma incubação da placa por 60 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Após novo ciclo de lavagens com PBS-Tw, adicionou-se 50 µl do conjugado, em diluições seriadas de 1:500 até 1:8,000, feitas em PBS pH 7,2 contendo 2% de leite Molico. Após outro ciclo de incubação e lavagens, acrescentou-se 50 µl de substrato-cromogênio (0,03% de H₂O₂ e 0,1 mg de ortofenilenodiamino/ ml de tampão citrato/fosfato de sódio 0,05M, pH 5,0) a cada poço da placa. Ao final de uma incubação de 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, interrompeu-se a catálise do substrato pela adição de 25 µl de ácido sulfúrico 4 N por poço, misturando-se o conteúdo por vibração. A leitura colorimétrica foi realizada a 492 nm, em leitor de ELISA (MULTISKAN II, Flow Laboratories, Inc. USA), utilizando-se a 1ª coluna, contendo apenas o substrato neutralizado, como branco. O título do conjugado foi determinado como sendo o inverso da maior diluição que apresentava uma reação positiva contra a maior diluição do soro imune. O limite da reação foi determinado como a densidade óptica de 0,2 a 492 nm.

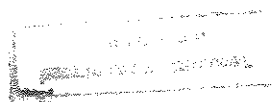
4.2- ANTICORPOS ANTI-CITOCINAS

Para a realização dos ensaios de dosagens de níveis de citocinas em sobrenadantes de cultura de células esplênicas, foi necessária a obtenção de conjugados e purificados obtidos a partir de anticorpos monoclonais anti citocinas IL-4 e IFN-γ. Após o descongelamento adequado, os hibridomas BVD-6 e 11.B.11 (anti-Interleucina-4), R46A2 e XMG1.2 (anti-interferon-γ), foram semeados em garrafas de plástico

descartável (Costar) contendo meio RPMI completo (meio RPMI 1640/Sigma, contendo 12,5 mM de HEPES, 2ul/L de 2-Mercaptoetanol e 10% de soro fetal bovino) e incubadas a 37⁰C, em estufa com atmosfera de 95% de ar e 5% de CO₂. Quando as culturas atingiram a semi-confluência as células foram repicadas para expansão.

Camundongos "nudes" de diferentes raças foram usados como recipientes dos hibridomas anti-citocinas. Previamente (cerca de 7 dias antes da injeção das células), foi administrado a cada camundongo 1,0 ml de Nujol, por via intraperitoneal e então administradas, pela mesma via, 1×10^7 células de um dos hibridomas cultivados. Foram empregados entre 5 e 10 camundongos para cada hibridoma. Em tempos que variaram entre 12 a 20 dias os líquidos ascíticos foram coletados por punção peritoneal.

As imunoglobulinas da classe IgG presentes nos sobrenadantes de cultura de células (BVD-6, 11.B.11, R46A2 e XMG1.2) foram purificadas através de cromatografia de afinidade em Sepharose Proteína-G, segundo protocolo similar ao descrito por *EY et al.*(1978) para cromatografia em Sepharose-proteína A. Cinco ml do ascite, cujo pH foi previamente ajustado para pH 8,5 com o tampão de equilíbrio da coluna (tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,5) foram aplicados em uma coluna contendo cerca de 4 ml de gel de Sepharose-Proteína-G (Sigma). Após incubação de 30 minutos, com agitação ocasional, o material não adsorvido à matriz foi eluído com o tampão fosfato de sódio 0,1M pH 8,5, a um fluxo de 30 ml por hora, colhendo-se amostras de 5 ml por tubo. A eluição das proteínas não ligadas à resina foi acompanhada através da leitura espectrofotométrica das amostras a 280 nm, até D.O. inferior a 0,05. O tampão glicina-HCl 0,1M pH 2,8 foi então conectado à coluna e a eluição do material fixado foi iniciada. Amostras de 5 ml foram colhidas em tubos mergulhados em banho de gelo, no mesmo fluxo inicial. Os tubos de coleta continham



um volume suficiente de tampão Tris-HCl 1M, pH 8,5 para neutralizar 5 ml de tampão glicina-HCl pH 2,8. As D.O. do material eluido foram acompanhadas a 280 nm até leitura inferior a 0,05. As frações com densidades ópticas mais elevadas (geralmente os três primeiros tubos eluidos), foram reunidas em “pool” e dialisadas contra PBS pH 7,2. As concentrações protéicas nas amostras foram determinadas pelo método colorimétrico de Hartree referido abaixo. Após as dosagens de proteína, os materiais purificados foram aliquotados e mantidos a -20°C até o momento do uso.

Os anticorpos anti-citocinas, purificados dos ascites BVD6, e XMGI.2 foram conjugados à Biotina segundo indicações de HEGGNESS & ASH (1977). Dois mililitros de cada anticorpo anti-citocina, 1mg/ml, foram inicialmente dialisados contra tampão borato de sódio 0,2M pH8,5 e a seguir incubados com 200 μl de uma solução a 1 mg/ml de Biotina-succinamida (N-hidroxisuccinimida biotina, Sigma) em DMSO (dimetilsulfoxido, Merck), à temperatura ambiente, por 4 horas, com agitação ocasional. O conjugado obtido foi dialisado exaustivamente contra PBS pH 7,2, em seguida aliquotado e mantido a -20°C , para uso posterior em ensaios imunoenzimáticos.

5- IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM TNP-BSA

Para a imunização de camundongos BALB/c, foi utilizada proteína BSA (BSA Fraction V; SIGMA), conjugada com o hapteno TNP. O conjugado foi dialisado em coluna de exclusão molecular (Sephadex G-25, PHARMACIA).

5.1- IMUNIZAÇÃO SEGUNDO ESQUEMA DE DUAS DOSES (RESPOSTA SECUNDÁRIA)

Inicialmente, camundongos da linhagem BALB/c de 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade foram sangrados pelo plexo orbital para obtenção dos soros pré-imunes (soro normal). Após retração dos coágulos, os soros foram separados por centrifugação a 465 g (1,500 rpm) por 10 minutos, a 4^o C (centrífuga refrigerada Revan, rotor SH4X), e estocados individualmente a -20^o C.

A seguir, os animais foram adequadamente marcados e divididos em dois grupos (imunizado e controle). Os camundongos do grupo imunizado receberam doses do antígeno TNP-BSA (preparado em nosso laboratório ou cedido pelo Prof. Dr. Paulo M. F. Araújo, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP), emulsionado em 50% de Adjuvante Completo de Freund (ACF). Cada animal recebeu uma dose de 100µg de proteína conjugada, no volume final de 500µl, por via intramuscular (im). Cada animal do grupo controle recebeu uma dose de 500µl de ACF a 50%, em solução salina fisiológica, pela mesma via. Os animais de 15 dias de idade, tanto do grupo controle quanto imunizado, receberam essa dose por via intraperitoneal (ip), no volume final de 250 µl.

Trinta dias após a primeira injeção do antígeno, os camundongos receberam novamente a mesma dose da proteína TNP-BSA (100µg), diluída em 500µl de solução salina, sem adjuvantes, por via intraperitoneal (ip). Os animais do grupo controle receberam apenas solução salina, por via intraperitoneal, num volume de 500µl.

Periodicamente, após a primeira dose de antígeno, os animais foram sangrados pelo plexo orbital. Após retração do coágulo, os soros foram separados por centrifugação a 465g (1,500 rpm) por 10 minutos, a 4^o C (centrífuga refrigerada Revan, rotor SH4X). O soro de cada animal foi coletado e armazenado, separadamente, a -20^oC.

Os anticorpos específicos foram quantificados por ELISA, a partir dos soros imunes coletados, conforme protocolo descrito no item 8. Quando atingiu o nível máximo da resposta, ou seja, sessenta dias após a dose inicial, a metade de cada grupo foi sacrificada e os baços foram removidos para os ensaios de proliferação de células T. Quarenta e oito semanas após a imunização inicial, os animais restantes foram sacrificados e seus baços removidos para ensaio de proliferação final frente ao mitógeno Concanavalina A.

5.2- IMUNIZAÇÃO SEGUNDO ESQUEMA DE UMA DOSE (RESPOSTA PRIMÁRIA)

Camundongos BALB/c de 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade foram utilizados nesse esquema de imunização. Os animais utilizados foram sangrados, como acima descrito. A seguir, os camundongos foram adequadamente marcados e divididos em dois grupos (imunizado e controle). Cada camundongo do grupo imunizado recebeu uma dose intramuscular do antígeno TNP-BSA (100 µg), emulsionado em 50% de Adjuvante Completo de Freund (ACF), no volume final de 500 µl. O grupo controle recebeu uma dose de 500 µl ACF a 50% em solução salina 0,15 M, pela mesma via.

Quatorze, vinte e oito dias ou sessenta dias após a injeção, parte dos animais foi sangrada, os soros separados por centrifugação, como descrito acima, e armazenados a -20°C , até o momento do uso nos ensaios imunoenzimáticos. Os animais foram então sacrificados e os baços removidos para a obtenção de células a serem empregadas nos ensaios de proliferação.

Os animais restantes, imunizados segundo esquema de uma única dose, foram utilizados em sangrias periódicas, para a determinação dos níveis de anticorpos e, 48 semanas após a imunização inicial, tiveram seus baços removidos para ensaios de proliferação de linfócitos.

6- CULTURA DE CÉLULAS

6.1- CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS TOTAIS

Os baços de camundongos BALB/c foram removidos em condições de esterilidade, logo após os animais serem sacrificados com éter. Os baços foram colocados em meio RPMI contendo 10% de Soro Fetal Bovino (10,4 g de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich Chemica), 2,0 g de Bicarbonato de sódio (Sigma), 2,97g de HEPES (Sigma), 2 μl de 2-Mercaptoetanol (Sigma), em 1.000ml de água bidestilada), em banho de gelo. Após maceramento dos órgãos, as suspensões de células esplênicas obtidas foram depositadas em tubos cônicos e centrifugadas a 465g (1,500 rpm) por 10 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Revan, rotor SH4X), para descarte do sobrenadante. Cada baço foi ressuspenso em 2ml de tampão de lise de hemáceas, por dois minutos. A lise

foi interrompida pela adição de 10 ml de meio RPMI-1640 a cada suspensão. O material foi novamente centrifugado a 465g (1,500 rpm), por 10 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Revan, rotor SH4X), e o sobrenadante foi descartado. A cada baço foi adicionado 10 ml de meio RPMI, contendo 10% de soro fetal bovino e 50µg/ml de gentamicina. A viabilidade celular foi analisada pelo método de exclusão do corante Azul de Tripán e contagem em câmara de Neubauer. As suspensões celulares com viabilidade igual ou superior a 90% tiveram sua concentração ajustada para $2,5 \times 10^6$ células por mililitro. Em ensaios preliminares de proliferação, utilizando-se células provenientes do baço de animais naïve, determinou-se a melhor dose do estímulo como sendo a de 2,5 µg/ml de Concanavalina A (Con-A) e a melhor densidade de células como a de $2,5 \times 10^5$ células por orifício. Desta forma, para os ensaios de proliferação, as células provenientes de animais controles e imunes foram semeadas em placas de 96 poços, tratadas para cultura (Corning), num volume final de 100 µl por poço. Em seguida, adicionou-se a Con-A diluída em RPMI 1640 enriquecido com soro fetal bovino e gentamicina. Os ensaios foram realizados em sextuplicata. As placas foram incubadas a 37°C, em estufa com 5% de CO₂, por um período de 72 horas.

6.2- ATIVIDADE DO MITÓGENO CON-A SOBRE A PROLIFERAÇÃO DE LINFÓCITOS

Células esplênicas de camundongos imunizados e controles, dos diferentes grupos etários utilizados nesse estudo (2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade) foram

empregadas nos ensaios de proliferação de linfócitos (GOONEWARDENE & MURASKO, 1995; KNIGHT, 1987; MATSIOTA-BERNARD *et al.*, 1995; MOSMANN, 1983). Baços de camundongos imunizados com TNP-BSA ou apenas estimulados com ACF foram coletados 14, 28 e 60 dias após a administração de uma dose do antígeno (resposta primária) ou 30 dias após a segunda dose do antígeno (resposta secundária).

Em ensaios preliminares de proliferação, utilizando-se células provenientes do baço de animais naïve, determinou-se a melhor dose do estímulo como sendo a de 2,5 µg/ml de Concanavalina A (Con-A) e a melhor densidade de células como a de $2,5 \times 10^5$ células por orifício. Desta forma, para os ensaios de proliferação, as células provenientes de animais controles e imunes foram semeadas em placas de 96 poços, tratadas para cultura (Corning), na densidade de $2,5 \times 10^5$ por poço (100 µl/poço). Após um período de incubação de 72 horas das células esplênicas com o mitógeno Con-A, foi adicionado o reagente para a detecção celular.

Foram comparados a timidina tritiada (AMERSHAN; 0,5-1,0 µCi/poço) ou o corante MTT (Azul de tiazol, SIGMA; 50 µg/poço) como reagentes para a detecção do crescimento celular. Como ambos apresentaram resultados similares (dados não apresentados), e tendo em vista a maior praticidade do uso de um corante ao invés de um reagente radioativo, nos demais testes o MTT foi o reagente de escolha (MOSMANN, 1983). Após o período de incubação, adicionou-se a cada poço de cultura 10 µl de uma solução contendo o corante MTT. As placas foram incubadas por um período adicional de 4 horas, nas mesmas condições acima mencionadas. Em seguida, foram adicionados 10 µl por poço de uma Solução a 10% de dodecilsulfato de

sódio (SDS, BioRad). As placas foram incubadas a 37^o C, por um período adicional de 18 horas, para permitir a completa dissolução dos cristais de formazan e então realizou-se a leitura espectrofotométrica das mesmas em leitor de ELISA (Multiskan Bichromatic, Version 3.0), no comprimento de onda de 540 nm. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M.) das densidades ópticas de cada tratamento.

7- PREPARO DE SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS ESTIMULADAS COM CON-A

Para a obtenção dos sobrenadantes de culturas, a serem empregados posteriormente na dosagem de citocinas, as suspensões celulares obtidas segundo protocolo acima foram semeadas em placas de 24 orifícios, apropriadas para cultura (Corning), na densidade de $2,5 \times 10^6$ células/ml em meio RPMI 1640 enriquecido com 10% de soro fetal bovino e gentamicina a 50 μ g/ml. Utilizou-se volume de 1 ml de suspensão celular por poço. As células receberam Concanavalina A (Con-A) como estímulo na concentração final de 2,5 μ g/ml. Para obtenção de IL-2 e IL-4 e IFN- γ , as células esplênicas foram incubadas por 48 horas em estufa a 5% de CO₂. Para a posterior dosagem de IL-10, as células esplênicas foram estimuladas com o mitógeno por 72 horas. Os sobrenadantes de cultura para a dosagem das citocinas IL-2, IL-4 e IFN- γ foram obtidos através de incubação das células esplênicas com o mitógeno Con-A por 48 horas, em estufa de CO₂. Os sobrenadantes coletados foram empregados para a determinação dos níveis dessa citocinas, através de ensaio de ELISA de captura,

conforme descrito abaixo. Após o tempo de incubação necessário para a produção das citocinas, cada sobrenadante de cultura foi retirado e armazenado a -20°C até o momento da dosagem.

8- TITULAÇÃO DOS SOROS IMUNES

8.1 – TITULAÇÃO POR ELISA

Os ensaios imunoenzimáticos para quantificação de anticorpos foram realizados utilizando-se soros imunes e pré-imunes, obtidos de animais de diferentes faixas etárias, de 2 a 72 semanas de idade, imunizados ou não com TNP-BSA. Inicialmente, os animais foram sangrados quinzenalmente. Após 12 semanas da dose inicial, os animais foram sagrados em intervalos maiores, possibilitando a extensão do tempo de vida de cada animal. Após 48 semanas da dose inicial de antígeno, os animais sobreviventes foram sangrados e sacrificados, para desenvolvimento de ensaio de proliferação de linfócitos.

A detecção de anticorpos contra TNP e TNP-BSA nos soros de animais de cada grupo experimental foi realizada através de ensaios imunoenzimáticos segundo JOHNSTONE & THORPE (1987). Placas de microtitulação para ELISA (Falcon, 96 orifícios) foram sensibilizadas com antígeno TNP-BSA ou TNP-OVA. Para tanto, cada orifício da placa recebeu 50 μl de solução contendo 10 $\mu\text{g/ml}$ de TNP-OVA ou TNP-BSA em tampão carbonato-bicarbonato 0,05 M pH 9,2, para testar a presença de anticorpos contra antígenos simples (TNP) e complexos (TNP-BSA), respectivamente,

nos soros imunes e pré-imunes. As placas foram incubadas por 1 hora a 37° C em câmara úmida e, em seguida, durante uma noite a 4° C. O excesso de antígeno não adsorvido foi removido e a placa lavada três vezes com PBS pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw). A secagem da placa foi realizada por inversão sobre papel absorvente. Para bloqueio dos sítios reativos remanescentes nas placas foi empregada uma solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5%, em PBS pH 7,2 (PBS-MO), e incubou-se a placa por 1 hora a 37°C. Após lavagens das placas com PBS-TW, foram adicionados os soros normais e os soros testes (soros de animais imunizados com TNP-BSA), diluídos seriadamente (1:100 até 1:12,800) em PBS Molico (PBS-MO) a 2%. Seguiu-se uma incubação da placa por 60 minutos, a 37°C, em câmara úmida. As imunoglobulinas não ligadas foram removidas por lavagens das placas com PBS-Tw às quais, a seguir, adicionou-se o anticorpo imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de camundongo conjugado com peroxidase, diluído em PBS-MO 2%. O conjugado foi preparado no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP. Para o preparo desse conjugado, soro de coelho imunizado foi cromatografado em coluna contendo Sepharose-Proteína A, segundo indicações de EY *et al.* (1978). O método descrito por NAKANE & KAWAIOI (1974) foi utilizado para o preparo do conjugado anticorpo-peroxidase. A determinação do título do conjugado anti-Ig de camundongo-HRPO, foi realizada através de uma titulação em bloco do conjugado contra diluições de um “pool” de soro imune de camundongos, anti-TNP-BSA, por ELISA. Verificou-se que o conjugado podia ser utilizado em diluições entre 1:4,000 e 1:8,000 para o antígeno TNP-BSA. Para análises posteriores, escolheu-se a diluição

intermediária de 1:6,000 como a de uso. No ensaio utilizando o antígeno TNP-OVA, a diluição adequada correspondeu a 1:12,000.

As placas foram incubadas novamente a 37°C. Após novo ciclo de lavagens, a atividade da peroxidase foi detectada pela adição do substrato (H_2O_2) e do cromogênio ortofenilenodiamina (OPD, Sigma) (0,03% de H_2O_2 e 0,1 mg de OPD/ ml de tampão citrato/fosfato de sódio 0,05M, pH 5,0). Ao final de uma incubação de 30 min à temperatura ambiente, interrompeu-se a catálise do substrato pela adição de 25µl de H_2SO_4 4N por poço, misturando-se o conteúdo por vibração. A leitura colorimétrica foi realizada a 492 nm, em aparelho Multiskan II, Flow Laboratories, Inc. USA. A primeira coluna, contendo apenas o substrato neutralizado, foi utilizada como branco para leitura.

8.2 – REPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

De acordo com CARVALHO *et al.*, (1994) os valores das absorbâncias a 492 nm obtidos nos ensaios imunoenzimáticos através de diluição seriada foram somados e expressos como um escore. Para tanto, as absorbâncias das diluições seriadas (de 1:100 a 1: 12,800) obtidas por dosagem em ensaios ELISA dos soros de cada animal foram somadas. Em seguida, foi realizada uma média de cada grupo estudado (de 3 a 5 camundongos por grupo), utilizando-se a somatória das dosagens das diluições dos soros dos animais. Esta forma de representar os resultados se mostrou tão conveniente

quanto as curvas de titulação ou a eleição de um valor de absorbância em uma diluição particular dos soros como representativa.

9. DOSAGEM DE CITOCINAS

As interleucinas 2 (IL-2), 4(IL-4), 10 (IL-10) e interferon- γ (IFN- γ), obtidas como descrito no item anterior foram quantificadas pelo método de ELISA “sanduíche”.

Para dosagem de IL-2 e LI-10 foram utilizados Kits específicos, adquiridos comercialmente.

Para dosagem de IL-4 e IFN- γ , foram utilizados ensaios imunoenzimáticos padronizados no Laboratório de Imunologia Celular e Inflamação do DMI do IB da UNICAMP. Para o preparo dos materiais, foram produzidos líquidos ascíticos a partir de hibridomas anti-interleucina-4 (BVD-6 e 11B11) e anti-interferon- γ (R46A2 e XMG1.2). Os ascites foram purificados através de cromatografia de afinidade em Sepharose Proteína-G, segundo protocolo similar ao descrito por EY *et al.* (1978) para cromatografia em Sepharose-Proteína-A. Os anticorpos anti-citocinas, purificados dos ascites BVD6 e XMG1.2 foram conjugados à Biotina segundo indicações de HAGGNESS & ASH (1977). Os ensaios imunoenzimáticos para IL-4 e IFN- γ foram padronizados, utilizando-se titulação em bloco dos materiais obtidos, obtendo-se as diluições ótimas para experimentação.

9.1- DOSAGEM DE IL-4

Os ensaios ELISA, para a dosagem de interleucina 4 (IL-4) em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos de diferentes faixas etárias foram realizados em placas de poliestireno (“Enhanced Protein Binding”, CORNING) de 96 poços. Para a sensibilização das mesmas, cada orifício da placa recebeu 50 µl de uma solução contendo anticorpo monoclonal purificado anti-IL-4 (11B11) na concentração de 100 µg/ml em tampão bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,2, por orifício (a concentração ótima do anticorpo para esse ensaio foi determinada após titulação em bloco contra diferentes diluições da citocina recombinante, do conjugado com Biotina e da estreptoavidina-HRPO). A placa foi incubada a 37°C, em câmara úmida, e a seguir mantida a 4°C, por 18 horas. O excesso de antígeno não adsorvido foi removido e a placa lavada três vezes com PBS pH 7,2, contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-Tw). Após a secagem da placa, por inversão sobre papel absorvente, adicionou-se, a cada poço, 300 µl de uma solução de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé) a 5%, em PBS pH 7,2 (PBS-MO) e incubou-se a placa por uma hora a 37°C.

Após novo ciclo de lavagem adicionou-se as amostras e diluições seriadas de mrIL-4 (0,0195 a 20,0 ng/ml, Genzyme) em PBS-MO 2%. Os sobrenadantes a serem dosados, obtidos após 48 horas de cultura com o mitógeno Con-A, foram utilizados sem diluição anterior. As amostras obtidas da cultura de células de animais de mesmo grupo etário e segundo o mesmo esquema de imunização, foram reunidas em um “pool” e adicionadas aos orifícios da placa, num volume de 50µl, sem prévia diluição,

em duplicata. Seguiu-se uma incubação da placa por 60 minutos, a 37°C, em câmara úmida. Após essa incubação, as placas foram mantidas por 18 horas a 4°C. As placas foram novamente lavadas e secas por inversão.

Adicionou-se, em seguida, 50µl por orifício, de uma solução contendo conjugado produzido a partir do anticorpo monoclonal anti-IL4 purificado (BVD-6) e marcado com Biotina, diluído 1:1.000 em PBS-MO 2%. Após nova incubação de uma hora a 37°C, em câmara úmida, as placas foram lavadas e secas por inversão.

O conjugado streptoavidina-peroxidase (Sigma) foi adicionado aos orifícios, após diluição 1:1.000 em PBS MO 2%, num volume de 50µl. Nova incubação de uma hora a 37°C foi seguida por outro ciclo de lavagem e secagem das placas.

A revelação da reação foi possibilitada pela adição de 50 µl de substrato-cromogênio (0,03% de H₂O₂ e 2 mg de ortofenilenodiamino (OPD-Sigma) por ml de tampão citrato/fosfato de sódio 0,05M, pH 5,0), a cada poço da placa. Ao final de uma incubação de 30 minutos, no escuro e à temperatura ambiente, interrompeu-se a catálise do substrato pela adição de 25 µl de ácido sulfúrico 4 N por poço, misturando-se o conteúdo por vibração. A leitura colorimétrica foi realizada a 492nm, em leitor imunoenzimáticos (MULTISKAN II, Flow Laboratories, Inc. USA), utilizando-se o orifício contendo 0 ng/ml da citocina, como branco.

As concentrações da citocina nas amostras testadas foram calculadas através da equação obtida com os dados da curva-padrão.

9.2- DOSAGEM DE IFN- γ

Nos ensaios imunoenzimáticos para a dosagem de Interferon- γ nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos de diferentes faixas etárias, foram realizados os mesmos procedimentos descritos para a dosagem de interleucina-4, com as seguintes alterações:

Para a sensibilização, cada poço da placa recebeu 50 μ l por orifício de uma solução contendo o anticorpo anti-IFN γ purificado (clone R46A2) na concentração de 100 μ g/ml em tampão bicarbonato de sódio 0,05M pH 9,2, (a concentração ótima do anticorpo para esse ensaio foi determinada previamente por titulação em bloco contra diferentes diluições da citocina recombinante, do conjugado com Biotina e da estreptoavidina-HRPO). A placa foi incubada a 37°C, em câmara úmida, e a seguir mantida a 4°C, por 18 horas. Após a lavagem e secagem da placa, esta foi bloqueada com PBS-MO 5% e incubada.

Após novo ciclo de lavagem, adicionou-se as amostras (sobrenadantes de cultura) e o IFN- γ recombinante (Gennentech), empregado para a obtenção da curva padrão (1,562 a 50,0 ng/ml). Os sobrenadantes a serem dosados, obtidos após 48 horas de cultura com o mitógeno Con-A, foram utilizados sem diluição anterior. As amostras obtidas da cultura de células de animais de mesmo grupo etário e segundo o mesmo esquema de imunização foram reunidas em um “pool” e adicionadas aos orifícios da placa, num volume de 50 μ l, sem prévia diluição, em duplicata. Seguiu-se uma

incubação da placa por 60 minutos, a 37⁰C, em câmara úmida. Após essa incubação, as placas foram lavadas e secas por inversão.

Adicionou-se em seguida 50µl por orifício de uma solução contendo o segundo anticorpo anti- IFN γ (clone XMG1.2), conjugado com Biotina e diluído a 1:10,000 em PBS-MO 2%. Após nova incubação de 60 minutos a 37⁰C, em câmara úmida, as placas foram lavadas e secas. As incubações seguintes seguiram protocolo descrito anteriormente para dosagem de IL-4.

9.3- DOSAGEM DE IL-2

Para a dosagem de IL-2 em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos de diferentes faixas etárias, mantidos sob os esquemas de imunização anteriormente descritos, foi utilizado um Kit para quantificação de IL-2 de camundongo (Mouse Interleukin-2 ELISA Kit - INTERTEST-2X - Code 2124-01A GENZYME · Immunologicals, Cambridge, USA). Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se as indicações descritas pelo fabricante. Cem microlitros de cada sobrenadante a ser dosado, obtidos após 48 horas de cultura com o mitógeno Con-A, foram utilizados sem diluição anterior.

As concentrações da citocina nas amostras testadas foram calculadas através da equação obtida com os dados da curva-padrão.

9.4- DOSAGEM DE IL-10

Para a dosagem de IL-10, em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos de diferentes faixas etárias, mantidos sob os esquemas de imunização anteriormente descritos, foi utilizado um Kit para quantificação de IL-10 de camundongo (Mouse Interleukin-10 ELISA Kit - ENDOGEN). Todos os procedimentos foram realizados seguindo-se as indicações descritas pelo fabricante. Os sobrenadantes a serem dosados, coletados após 72 horas de cultura com o mitógeno Con-A (ABRAMS *et al.*, 1992), foram utilizados sem diluição anterior.

As concentrações da citocina nas amostras testadas foram calculadas através da equação obtida com os dados da curva-padrão.

10- CÉLULAS ESPLÊNICAS TOTAIS

Para a caracterização fenotípica das subpopulações linfocitárias, foram obtidas suspensões celulares a partir de baços de animais não estimulados. Inicialmente, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂, seus baços foram removidos em condições assépticas e mantidos em meio RPMI, em banho de gelo. Após maceramento dos órgãos, a suspensão celular obtida foi centrifugada a 465g (1,500 rpm) por 10 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Revan, rotor SH4X). O sobrenadante foi descartado e o sedimento tratado com tampão de lise de hemáceas (solução de ACK, contendo 4,145g de NH₄Cl, 0,5g de KHCO₃, 0,0186g de EDTA em 500ml água bidestilada) por dois minutos (na proporção de 2 ml de tampão de lise para

cada 10^8 células esplênicas). A lise foi interrompida pela adição de 10 ml de meio RPMI-1640 e a suspensão foi novamente centrifugada a 465g (1,500 rpm), por 10 minutos a 4°C (centrífuga refrigerada Revan, rotor SH4X). Após descarte do sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 10 ml de meio RPMI, contendo 5% de soro fetal bovino. A suspensão foi filtrada em gaze e em seguida passada através de agulha hipodérmica para separação de células agregadas. A viabilidade celular foi analisada pelo método de exclusão com o corante Azul de Tripan (0,08g de Trypan blue (Serva) em 50 ml de PBS pH7,2. Essa solução foi aliquotada e esterilizada por filtração em membrana de $0,22\ \mu\text{m}$ (Millipore) e a contagem celular foi realizada em câmara de Neubauer. As suspensões com viabilidade igual ou superior a 90% tiveram suas concentrações ajustadas para $2,0 \times 10^6$ células por ml.

A caracterização das subpopulações de linfócitos T utilizou a técnica de imunofluorescência com anticorpos monoclonais contra marcadores de superfície de células leucocitárias murinas, ligados a fluorocromos, seguindo-se a análise por citometria de fluxo. Para detecção do marcador CD3, foi utilizado anticorpo específico conjugado com Ficoeritrina (Pharmingen, San Diego, CA). Para os marcadores celulares CD4 e CD8 foram utilizados anticorpos específicos conjugados com Fluoresceína (Pharmingen, San Diego, CA). Os controles negativos foram realizados utilizando-se anticorpos dos mesmos isotipos, mas inespecíficos para esses marcadores.

A padronização do ensaio em citometro de fluxo (FACS), utilizando células de animais de 8 semanas de idade mostrou a concentração de $1\ \mu\text{g}$ dos anticorpos marcados por $2 \cdot 10^6$ células de baço como a melhor para utilização nesses ensaios (dados não apresentados). Após a padronização do ensaio, camundongos BALB/c naive, de diferentes faixas etárias (2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 72 e 96 semanas) tiveram

seus baços removidos e as células esplênicas obtidas foram processadas. Um mililitro das suspensões celulares foram adicionados a cada tubo contendo o anticorpo marcado com Fluoresceína ou Ficoeritrina, nas concentrações indicadas pelo fabricante (PHARMINGEN). Após incubação de 40 minutos, as células foram lavadas três vezes com RPMI 1460 e ressuspensas em 1,0 ml de PBS contendo 0,1% de paraformaldeído. A suspensão foi mantida a 4°C, protegida de luz. As análises das subpopulações foram realizadas por citometria de fluxo. Como controles, foram utilizadas as mesmas suspensões, sendo que estas foram marcadas com anticorpos monoclonais irrelevantes dos mesmos isótipos utilizados para o ensaio, marcados com fluoresceína ou ficoeritrina.

A leitura foi realizada em citometro de fluxo (FACScalibur, Becton-Dickinson, Hemocentro, UNICAMP) dentro de 2 horas. Para cada amostra, um mínimo de 10,000 células foram contadas. A amplificação e compensação ótima foram determinadas pelo exame de células não marcadas (EKONG *et al.*, 1993; MANSOUR *et al.*, 1990). As análises foram realizadas através do software Cell Quest (Becton-Dickinson).

11- DOSAGEM DE PROTEÍNAS

As dosagens de proteínas foram realizadas através do método colorimétrico descrito por Lowry e modificado por HATHREE (1972). Utilizou-se o BSA previamente dosado (50 µg/ml), como amostra padrão. Foram realizadas duplicatas de todas as diluições dos materiais dosados. A leitura espectrofotométrica foi realizada a

650 nm, empregando-se como branco a solução salina 0,15M, utilizada como diluente das amostras.

12- ANÁLISE ESTATÍSTICA

A significância das diferenças entre os grupos experimentais e controles foi determinada pelo teste-T bicaudal de Student, utilizando-se o software OXSTAT da Microsoft Co.

IV - RESULTADOS

1. PRODUÇÃO DE ANTICORPOS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DE CAMUNDONGOS

Com a finalidade de estudar a produção de anticorpos dirigidos ao TNP (antígeno simples) e ao BSA (antígeno complexo), camundongos BALB/c de 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade foram imunizados com TNP-BSA, emulsionado em ACF. Os animais foram tratados segundo esquema de uma ou duas doses de antígeno.

Os soros imunes foram coletados periodicamente até 48 semanas após a imunização. Dos animais mais velhos (48 e 72 semanas de idade) só foi possível coletar os soros durante 20 a 24 semanas após a imunização, em virtude da morte natural dos animais desses grupos. Os soros imunes foram testados em ensaios de ELISA para a presença de anticorpos contra o complexo TNP-BSA e contra o hapteno TNP, utilizando-se os antígenos TNP-BSA e TNP-OVA, respectivamente. Os soros foram ensaiados individualmente e os resultados foram expressos como escores dos valores da absorbância, isto é, representam a média da somatória das D.O. obtidas em todas as diluições de cada grupo etário.

1.1- A RESPOSTA IMUNE PRIMÁRIA

A **figura 1** resume os resultados dos ensaios de ELISA, nos quais empregou-se TNP-BSA como antígeno para a detecção de anticorpos nos soros coletados em

intervalos mensais, ou conforme indicado na figura, após a imunização com uma dose do imunógeno. Todos os grupos etários examinados (2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas) responderam ao antígeno, produzindo níveis detectáveis de anticorpos, ao longo do processo. Os títulos máximos foram alcançados ao redor da 4ª semana após a imunização para a maioria dos grupos etários, exceto para os animais com 4 e 48 semanas de idade, cujos títulos máximos foram observados na 8ª semana.

Em relação aos níveis máximos de anticorpos alcançados, é possível observar algumas tendências entre os diferentes grupos etários examinados, isto é, os animais mais velhos (72 semanas) e os mais jovens (2 semanas) por ocasião da imunização apresentaram os escores mais baixos (1,79 e 5,33, respectivamente). Os animais adultos jovens (4 e 16 semanas) apresentaram os escores mais elevados (8,07 e 7,94, respectivamente). Os animais com 32 e 48 semanas de idade apresentaram escores intermediários (6,81 e 6,35, respectivamente).

A produção de anticorpos, medida 24 semanas após a imunização, ainda era mensurável nos animais de todos os grupos etários, que apresentaram escores variando de 3 a 5. Após 48 semanas da imunização só restaram os animais que no início do experimento tinham até 32 semanas de idade. Nessa ocasião, os escores encontrados variaram entre 1,5 e 3,5, aproximadamente.

Na **figura 2** estão representados os resultados da titulação dos anticorpos dirigidos ao TNP, em soros de animais imunizados com uma dose do TNP-BSA/ACF.

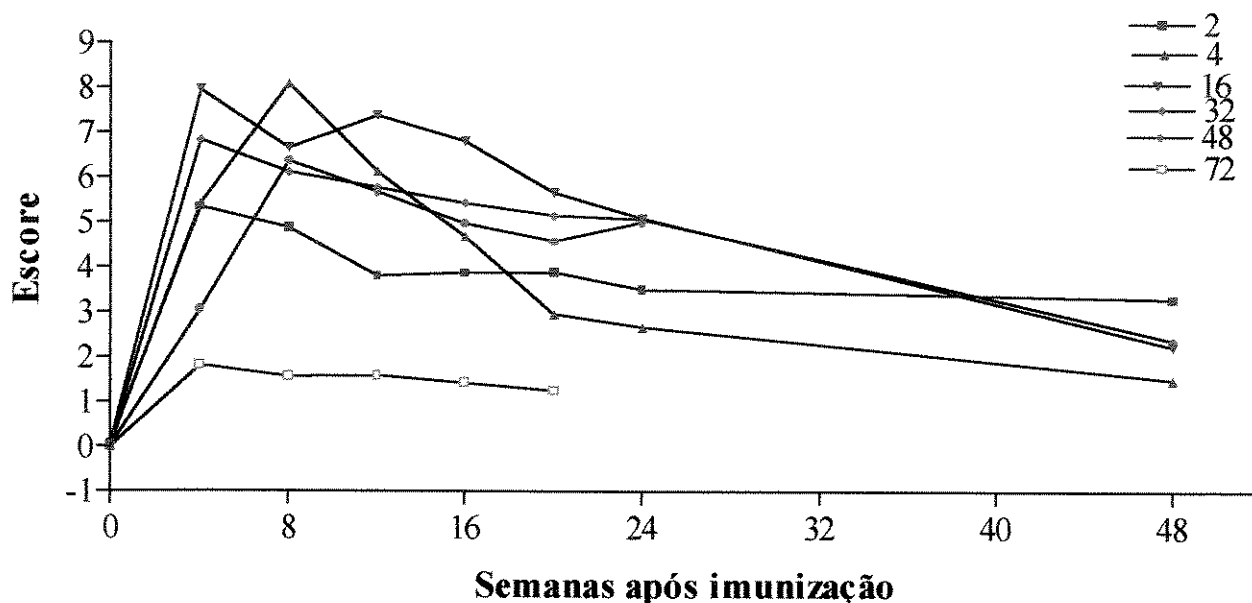


Figura 1- Perfil dos anticorpos anti-TNP-BSA detectados por ELISA em soros de camundongos BALB/c imunizados com dose única de antígeno. Os soros imunes foram colhidos periodicamente após a imunização primária com 100 μ g de TNP-BSA, emulsionado em ACF, de animais dos diferentes grupos etários indicados na figura. Para a titulação dos imunossoros empregou-se o TNP-BSA para sensibilização das placas (10 μ g/ml) e anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase para detecção (1:6.000). A absorbância foi lida a 492 nm e os resultados expressos como escores médios (média da somatória das D.O.) obtidos em cada coleta de cada grupo etário.

Como antígeno para a sensibilização das placas empregou-se o TNP-OVA (10 μ g/ml).

Como é possível observar, os animais de todos os grupos etários estudados responderam à imunização, com a produção de anticorpos anti-TNP. A capacidade de desenvolver esse tipo de resposta foi, no entanto, dependente da idade do animal. Os animais do grupo etário mais velho (72 semanas de idade) foi o menos responsivo ao antígeno, apresentando um escore máximo de 2,26 nos ensaios realizados com os soros

coletados 28 dias após a injeção do imunógeno. Os animais com 4 semanas de idade por ocasião da imunização alcançaram o escore máximo entre os grupos examinados (8,81), na coleta de soro realizada 8 semanas após a administração do imunógeno. Os demais grupos etários (2, 16, 32 e 48 semanas de idade) alcançaram os títulos máximos de anticorpos entre a 4^a e a 8^a semana após a administração do antígeno e apresentaram escores variando entre 5,13 e 6,94.

A manutenção dos níveis de anticorpos anti-TNP circulantes foi mais reduzida em todos os grupos etários estudados, quando comparado aos níveis de anticorpos anti-BSA (**figura 1**), particularmente para o grupo de animais mais velhos (72 semanas) cuja queda aos níveis mais baixos (0,40) observados se deu na coleta realizada 8 semanas após a imunização. Os animais desse grupo sobreviveram apenas até a coleta de soro realizada 16 semanas após a imunização. Nos demais grupos, níveis detectáveis de anticorpos foram mantidos até a última coleta, realizada 48 semanas após a imunização, porém os níveis observados atingiram os valores mínimos já a partir da 20^a semana após a administração do imunógeno (1,86 a 0,45).

Com a finalidade de observar uma possível reatividade dos anticorpos contra o antígeno utilizado como carreador para o antígeno TNP, foi realizado um ensaio imunoenzimático, utilizando OVA como antígeno para sensibilização da placa. Os resultados mostraram que os soros testados dos animais imunizados com o antígeno TNP-BSA não apresentaram reatividade contra ovoalbumina (OVA) (dados não apresentados).

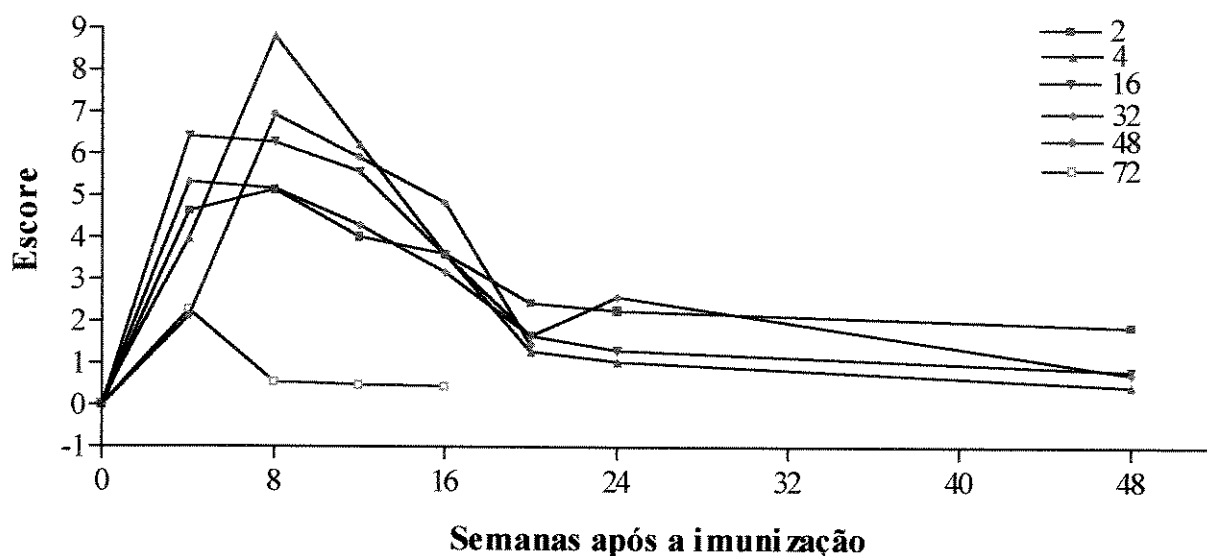


Figura 2 - Perfil dos anticorpos anti-TNP detectados por ELISA em soros de camundongos BALB/c imunizados com dose única de antígeno. Os soros imunes foram colhidos periodicamente após a imunização primária com 100 µg de TNP-BSA, emulsionado em ACF, de animais dos diferentes grupos etários indicados na figura. Para a titulação dos imunossoros empregou-se o TNP-OVA para sensibilização das placas (10 µg/ml) e anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase para detecção (1:12.000). A absorbância foi lida a 492 nm e os resultados expressos como escores médios (média da somatória das D.O.) obtidos em cada coleta de cada grupo etário.

1.2. - A RESPOSTA IMUNE SECUNDÁRIA

Na **figura 3** estão representados os resultados obtidos nos ensaios imunoenzimáticos para detecção dos anticorpos dirigidos ao antígeno complexo TNP-BSA nos soros colhidos após a imunização dos animais de todos os grupos etários com duas doses do imunógeno. Antes da administração da segunda dose do antígeno,

realizada 28 dias após a primeira, os soros imunes colhidos mostraram títulos semelhantes aos observados nos grupos experimentais que receberam uma única injeção do imunógeno. A dose reforço proporcionou a elevação dos títulos, em todos os grupos etários examinados, inclusive nos animais mais velhos que, alcançaram escores máximos (5,79) na 12^a semana após o início do experimento.

É possível também observar um perfil semelhante ao mostrado na **figura 1**, ao longo das várias coletas realizadas após a dose reforço, porém com títulos mais elevados sendo mantidos durante todo o período experimental subsequente. Neste caso, também observa-se que os grupos etários de 4 e 16 semanas de idade apresentaram os escores mais elevados de anticorpos para o TNP-BSA (11,6 e 11,89, respectivamente). Os animais de 48 e 72 semanas de idade, ao contrário, foram os menos responsivos à imunização (escores máximos de 4,89 e 5,79), e por ocasião da terceira sangria, na qual os demais grupos já haviam alcançado o escores máximos, esses grupos ainda apresentavam baixos níveis de anticorpos. Os grupos de animais das faixas etárias de 2 e 32 semanas apresentaram uma resposta intermediária (valores máximos de 8,82 e 8,42, respectivamente).

Vinte semanas após a imunização com a primeira dose de TNP-BSA, a produção de anticorpos ainda era mensurável em todos os grupos etários estudados, com escores variando entre 2 e 7. Os animais de 16 e 72 semanas de idade por ocasião da imunização sobreviveram até a coleta realizada na 32^a e 20^a semana após a primeira dose, respectivamente. Níveis detectáveis de anticorpos dirigidos ao TNP-BSA foram mantidos até a coleta realizada 48 semanas após a imunização inicial, nos demais grupos etários estudados.

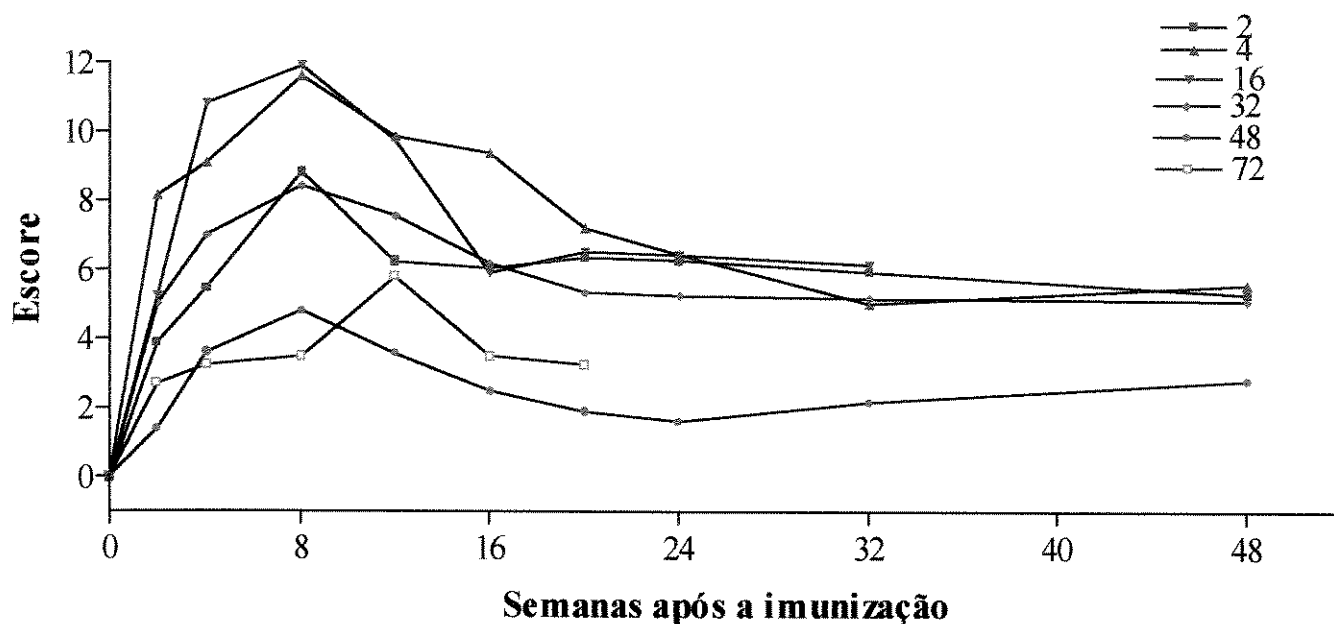


Figura 3 - Perfil dos anticorpos anti-TNP-BSA detectados por ELISA em soros de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de antígeno. Os soros imunes foram colhidos periodicamente após a imunização dos animais com uma dose de 100 µg de TNP-BSA em 50% de ACF, seguida pela administração de uma dose reforço, constituída por TNP-BSA (100 µg em salina), 28 dias após a primeira. Os grupos experimentais foram constituídos por de animais de diferentes grupos etários, conforme indicado na figura. Para a titulação dos imunossoros empregou-se o TNP-BSA para sensibilização das placas (10 µg/ml) e anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase para detecção (1:6.000). A absorbância foi lida a 492 nm e os resultados expressos como escores médios (média da somatória das D.O.) obtidos em cada coleta de cada grupo etário.

A **figura 4** representa os resultados obtidos nos ensaios imunoenzimáticos para a detecção de anticorpos dirigidos ao TNP, a partir dos soros de animais imunizados com duas doses de TNP-BSA, com intervalo de 28 dias. É possível

observar que todos os grupos etários estudados responderam à imunização, com a produção de anticorpos dirigidos ao hapteno em níveis um pouco mais elevados que os animais que receberam apenas uma dose do imunógeno. Os animais de 4 semanas de idade por ocasião da imunização foram os mais responsivos ao antígeno, apresentando escore máximo de 10,48 na 8ª semana após a dose inicial de antígeno. Os grupos etários mais velhos (48 e 72 semanas) apresentaram níveis de anticorpos bem mais baixos (valores máximos ao redor de 3,18 e 3,92, respectivamente) nos ensaios realizados 8 e 4 semanas após primeira dose de antígeno. Os demais grupos etários atingiram níveis intermediários de anticorpos, (escores variando entre 4,47 e 9,29) após a 8ª semana da dose inicial de antígeno na maioria dos grupos estudados, com exceção do grupo de 32 semanas de idade, no qual o escore máximo foi atingido na 12ª semana após a dose inicial do antígeno.

As dosagens realizadas 24 semanas após a imunização inicial mostraram que os níveis de anticorpos ainda eram elevados em todos os grupos estudados, com escores variando de 6 e 1 (16 e 48 semanas de idade, respectivamente).

As titulações realizadas mostraram uma manutenção da resposta em função do tempo decorrido após a imunização, até a última sangria, realizada após 48 semanas da imunização inicial, com escores variando entre 1,32 e 5,6. Os animais de 72 semanas não sobreviveram até a última sangria realizada.

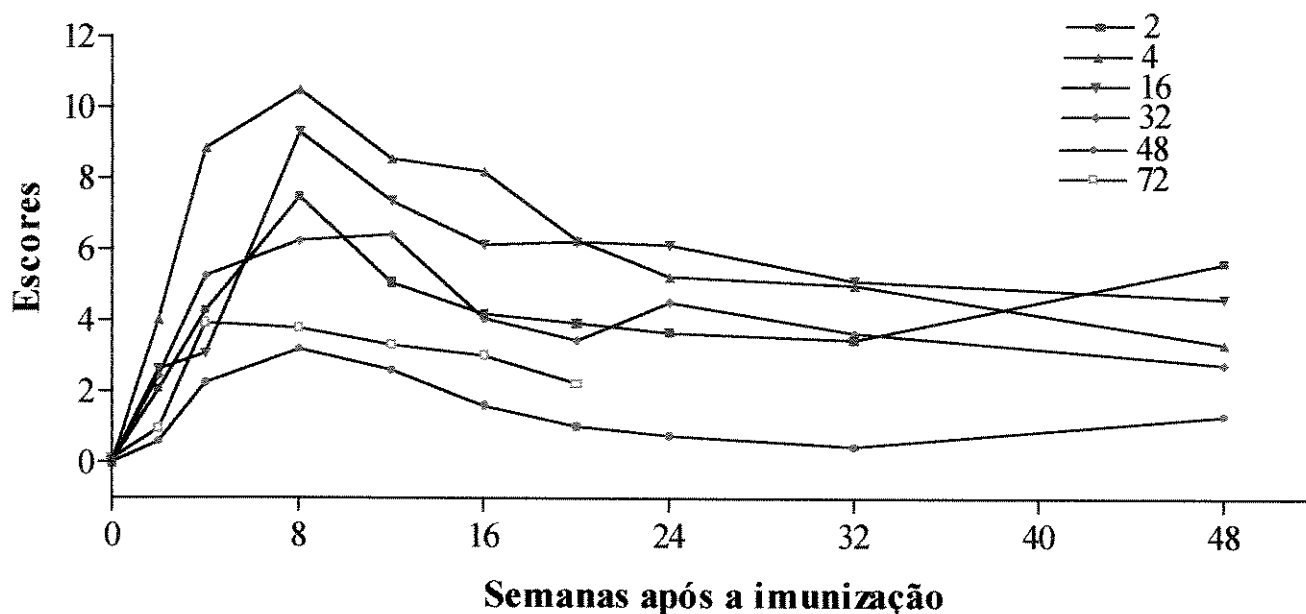


Figura 4 - Perfil dos anticorpos anti-TNP detectados por ELISA em soros de camundongos BALB/c imunizados com duas doses de antígeno. Os soros imunes foram colhidos periodicamente após a imunização dos animais com uma dose de 100 μ g de TNP-BSA em 50% de ACF, seguida pela administração de uma dose reforço, constituída por TNP-BSA (100 μ g em salina), 28 dias após a primeira. Os grupos experimentais foram constituídos por de animais de diferentes grupos etários, conforme indicado na figura. Para a titulação dos imunossoros empregou-se o TNP-OVA para sensibilização das placas (10 μ g/ml) e anticorpo anti-imunoglobulina de camundongo marcado com peroxidase para detecção (1:12.000). A absorbância foi lida a 492 nm e os resultados expressos como escores médios (média da somatória das D.O.) obtidos em cada coleta de cada grupo etário.

2. RESPOSTA PROLIFERATIVA

Com a finalidade de estudar a resposta proliferativa de animais de diferentes faixas etárias, animais naive ou imunizados tiveram seus baços removidos e as células esplênicas foram utilizadas em ensaio de proliferação com estímulo não específico, o

mitógeno Con-A. Para tanto, foram utilizados nos ensaios 3 animais de cada faixa etária e os ensaios foram realizados em sextuplicata. A proliferação celular foi medida pela incorporação do corante MTT pelas células viáveis e determinada pela absorbância a 540nm.

2.1. RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS NAIVE

Os resultados desses ensaios estão apresentados na **figura 5** e mostram a resposta dos camundongos naive de 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48, 72 e 96 semanas de idade estimulados ou não com Con-A. Observa-se que os esplenócitos de animais de todas as idades examinadas responderam de forma significativa à estimulação com Con-A, quando comparadas com as células não estimuladas com o mitógeno ($p < 0,001$). Além disso, nenhuma diferença significativa pode ser observada quando foram examinadas a capacidade proliferativa de células estimuladas com a Con-A dos diferentes grupos etários estudados.

2.2. RESPOSTA PROLIFERATIVA DE LINFÓCITOS DE CAMUNDONGOS IMUNIZADOS

Com o objetivo de observar a resposta proliferativa de linfócitos T após a estimulação antigênica, células esplênicas, obtidas de animais de 2, 4, 16, 32, 48 e 72

semanas de idade por ocasião da imunização com TNP-BSA, foram empregadas nos ensaios de proliferação *in vitro*, na presença ou ausência de Con-A. Células de animais não imunizados, mas tratados com o Adjuvante completo de Freund (ACF), foram empregados como controles nos experimentos. As células esplênicas foram coletadas 14, 28 e 60 dias e 48 semanas após a injeção do antígeno ou do ACF. Foram utilizados três animais de cada idade estudada, em cada coleta.

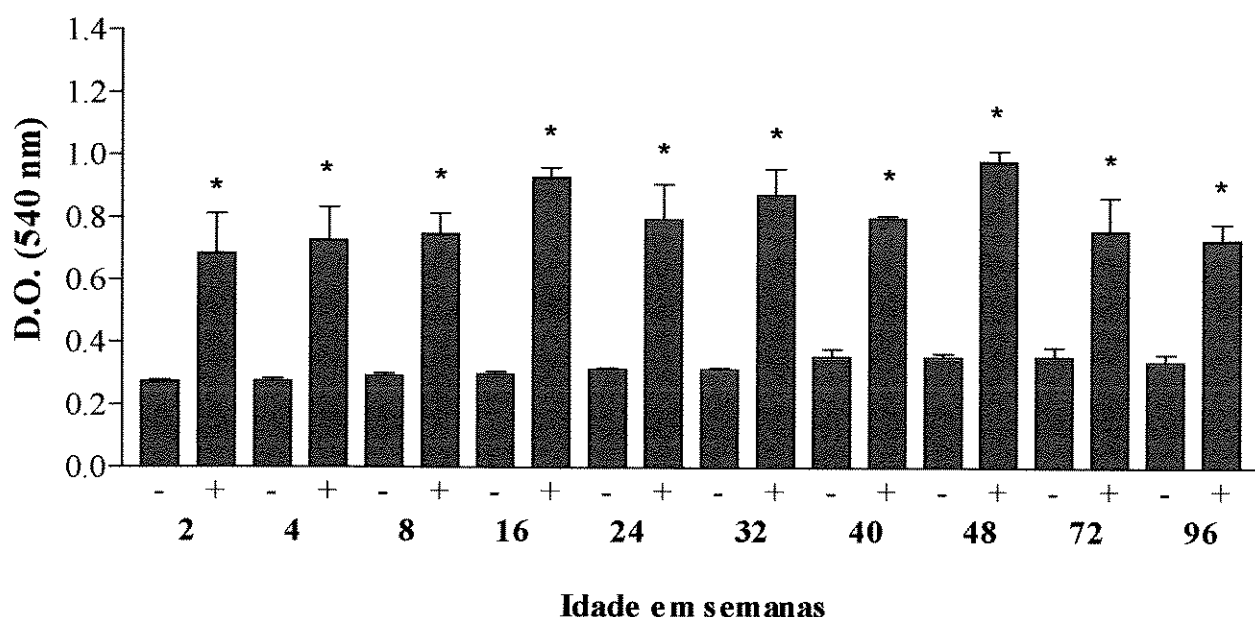


Figura 5- Proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c naive. Esplenócitos de camundongos ($n = 3$) dos diferentes grupos etários indicados na figura foram cultivados, em sextuplicata, na ausência (-) ou na presença (+) de Con-A ($2,5 \mu\text{g/ml}$) por 72 horas. O corante MTT foi empregado para determinar a proliferação celular, que foi expressa como média das absorbâncias a $540\text{nm} \pm$ erro padrão da média. O asterisco (*) representa os valores de $p < 0,001$ no teste t de Student.

A **figura 6** resume os resultados dos ensaios de proliferação de células esplênicas, obtidas dos animais sacrificados 14 após a imunização primária com o antígeno ou que receberam o adjuvante, estimuladas ou não com Con-A. As células esplênicas de todos os grupos estudados, estimuladas em cultura com o mitógeno Con-A, apresentaram uma resposta significativa quando comparadas com as células que não receberam o estímulo mitogênico ($p < 0,001$). Foi possível observar uma curva em forma de sino na resposta proliferativa de células dos animais do grupo controle, que receberam apenas o adjuvante completo de Freund (ACF), com valores máximos alcançados nos grupos etários de 16 e 32 semanas de idade. Os animais com 72 semanas de idade apresentaram resultados significativamente mais baixos, quando comparados aos grupos de 16 e 32 semanas ($p < 0,05$). Células de animais com 48 semanas de idade também mostraram resultados significativamente mais baixos que os obtidos com as células de animais com 32 semanas de idade ($p < 0,05$). Os demais grupos estudados não mostraram diferenças significativas.

As células esplênicas provenientes de animais imunizados com TNP-BSA, foram responsivas em todos os grupos etários estudados, quando comparadas aos respectivos controles (células não estimuladas pela Con-A). Entre as células estimuladas *in vitro* com o mitógeno, só foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos de 2 e 72 semanas de idade, isto é as células obtidas de animais com 2 semanas de idade se mostraram mais responsivas que as de animais com 72 semanas de idade ($p < 0,05$).

O tratamento estatístico aplicado a cada grupo etário, imunizado com TNP-BSA/ACF ou tratado apenas com o adjuvante, não revelou diferenças significativas. Os animais de 2 semanas de idade não puderam ter seus valores analisados estatisticamente devido ao baixo número de animais utilizados nesse grupo experimental.

Em resumo, as células esplênicas coletadas 14 dias após os tratamentos - imunização ou administração do adjuvante - foram igualmente responsivas ao estímulo mitogênico, em cada idade examinada.

Células esplênicas dos animais com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade quando da imunização primária com TNP-BSA ou tratados com ACF, colhidas vinte e oito dias após os tratamentos, foram também ensaiadas em cultura, na presença e ausência de estimulação mitogênica inespecífica, como descrito acima.

Os resultados resumidos na **figura 7** mostraram que as células coletadas de animais com 2, 4, 16, 32 e 48 semanas de idade, imunizados ou tratados com ACF, e estimuladas *in vitro* com Con-A, responderam ao estímulo mitogênico, apresentando diferenças significativas em relação às células não estimuladas. Apenas as células obtidas do grupo de animais com 72 semanas de idade não foram responsivas à Con-A ($p=0,06$, no grupo tratado com ACF e $p=0,075$, no grupo imunizado).

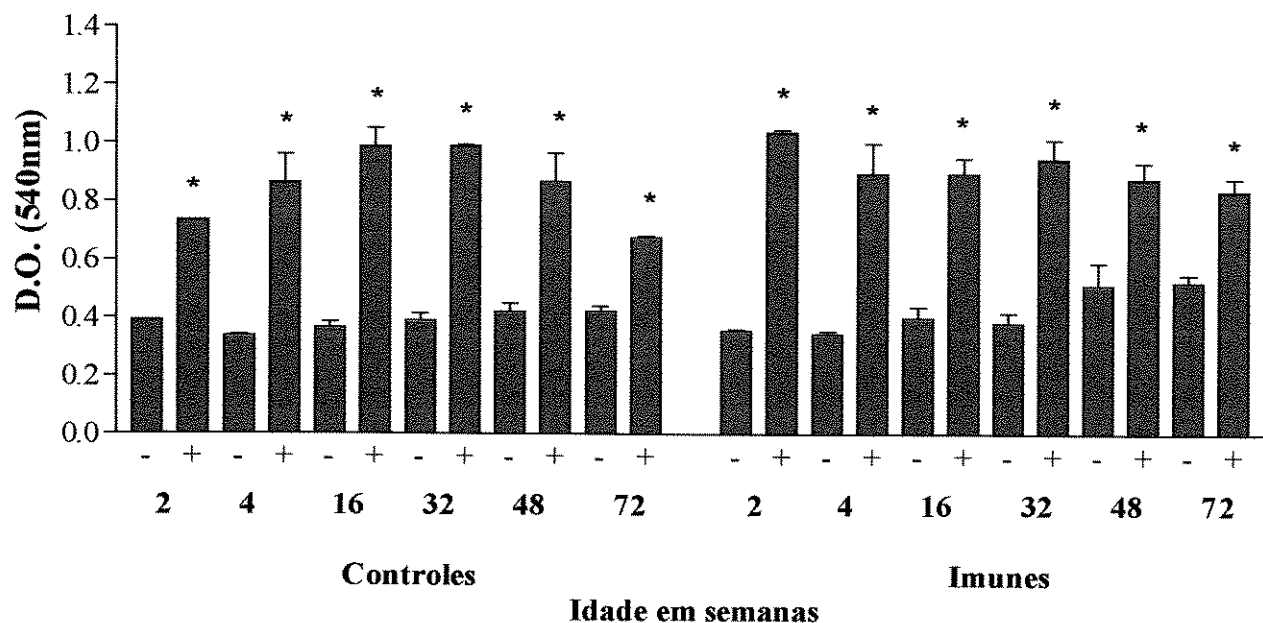


Figura 6 - Proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c, ensaiados 14 dias após imunização. Esplenócitos de camundongos ($n = 3$) dos diferentes grupos etários indicados na figura foram coletados 14 dias após o tratamento com ACF (Controles) ou a imunização com uma dose de TNP-BSA/ACF (Imunes) e cultivados, em sextuplicata, na ausência (-) ou na presença (+) de Con-A ($2,5 \mu\text{g/ml}$) por 72 horas. O corante MTT foi empregado para determinar a proliferação celular, que foi expressa como média das absorbâncias a $540\text{nm} \pm$ erro padrão da média. O asterisco (*) representa os valores de $p < 0,001$ no teste t de Student.

Entre as células obtidas de animais tratados com ACF e que responderam à Con-A foi possível observar diferenças na capacidade proliferativa, em função da idade do animal examinado. Desta forma, as células obtidas dos grupos etários de 4, 16 e 32 semanas de idade foram as mais responsivas ao mitógeno, quando comparadas àquelas dos animais de 2 e 48 semanas de vida ($p < 0,05$).

Entre as células obtidas de animais imunizados com TNP-BSA/ACF que responderam ao estímulo mitogênico *in vitro* (2, 4, 16 e 32 e 48 semanas de idade),

também foi possível observar diferenças significativas na capacidade proliferativa em função da idade do animal doador. Neste caso, as células provenientes dos grupos etários de 48 semanas de idade foram as menos responsivas, quando comparadas com as células obtidas de animais de 4, 16 e 32 semanas de idade ($p < 0,05$).

Também para as células obtidas 28 dias após os tratamentos (adjuvante ou imunização com TNP-BSA/ACF), a análise estatística realizada em cada grupo etário, não mostrou diferenças significativas.

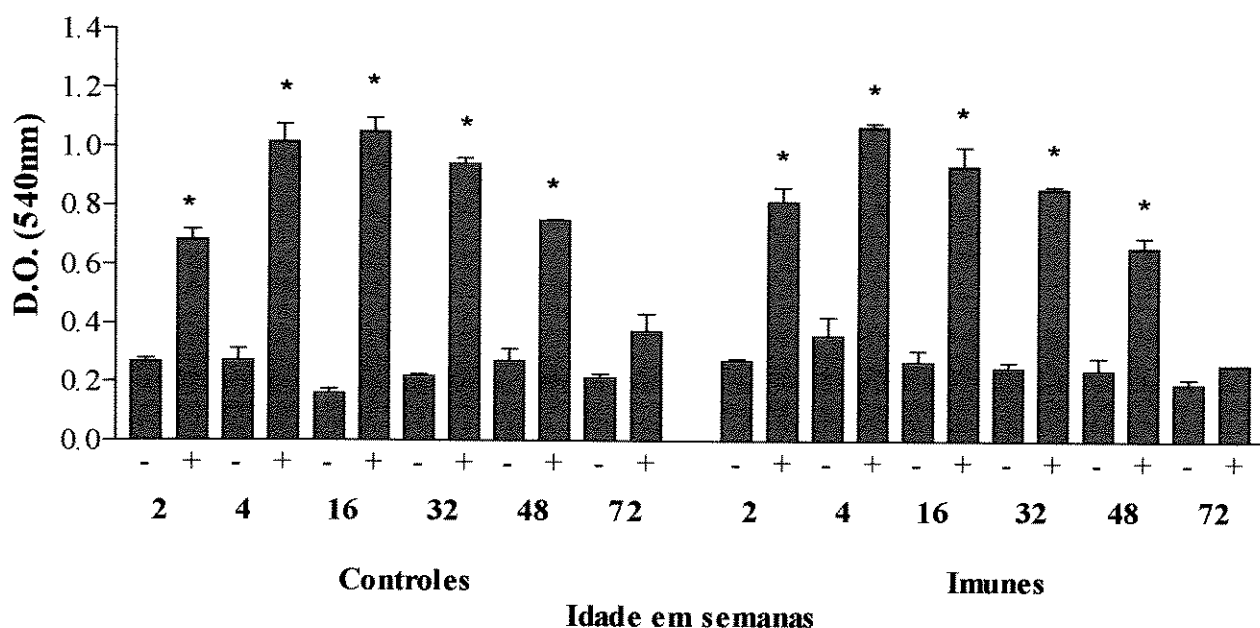


Figura 7 - Proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c, ensaiados 28 dias após imunização. Esplenócitos de camundongos ($n = 3$) dos diferentes grupos etários indicados na figura foram coletados 28 dias após o tratamento com ACF (Controles) ou a imunização com uma dose de TNP-BSA/ACF (Imunes) e cultivados, em sextuplicata, na ausência (-) ou na presença (+) de Con-A ($2,5 \mu\text{g/ml}$) por 72 horas. O corante MTT foi empregado para determinar a proliferação celular, que foi expressa como média das absorbâncias a $540\text{nm} \pm$ erro padrão da média. O asterisco (*) representa os valores de $p < 0,001$ no teste t de Student.

Os resultados encontrados quando se utilizou células provenientes de animais sacrificados 60 dias após os tratamentos estão representados na **figura 8**. As células linfóides estimuladas com Con-A de todos os grupos estudados, imunizados ou tratados, mostraram diferenças significativas na resposta proliferativa quando comparadas a resposta das células cultivadas na ausência do mitógeno ($p < 0,001$ para todos os grupos exceto o grupo de 72 semanas, no qual o valor de p foi $< 0,05$).

As células provenientes dos animais com 2, 4, 16 e 32 semanas de idade, tratados apenas com o adjuvante, não apresentaram diferenças significativas na resposta proliferativa, quando comparados entre si. Os animais das faixas etária de 48 e 72 semanas de idade mostraram diferenças significativas na resposta proliferativa de suas células linfóides frente a Con-A quando comparados às respostas dos demais grupos etários ($p < 0,05$).

Células provenientes de animais imunizados com TNP-BSA também apresentaram alterações na capacidade proliferativa em função da idade. Os grupos com 48 e 72 semanas foram os menos responsivos ao mitógeno. A análise estatística mostrou diferenças significativas entre o grupo de animais com 48 semanas de idade e aqueles com 4, 16 e 32 semanas de idade ($p < 0,05$). Células obtidas de animais com 72 semanas de idade por ocasião da imunização apresentaram respostas proliferativas mais reduzidas se comparadas às dos grupos de 2, 4, 16 e 32 semanas ($p < 0,001$ para os animais de 2, 4 e 16 semanas e $p < 0,05$ para o grupo de 32 semanas).

Com relação às células obtidas 60 dias após os tratamentos (adjuvante ou imunização com TNP-BSA/ACF), a análise estatística realizada em cada grupo etário, também não mostrou diferenças significativas.

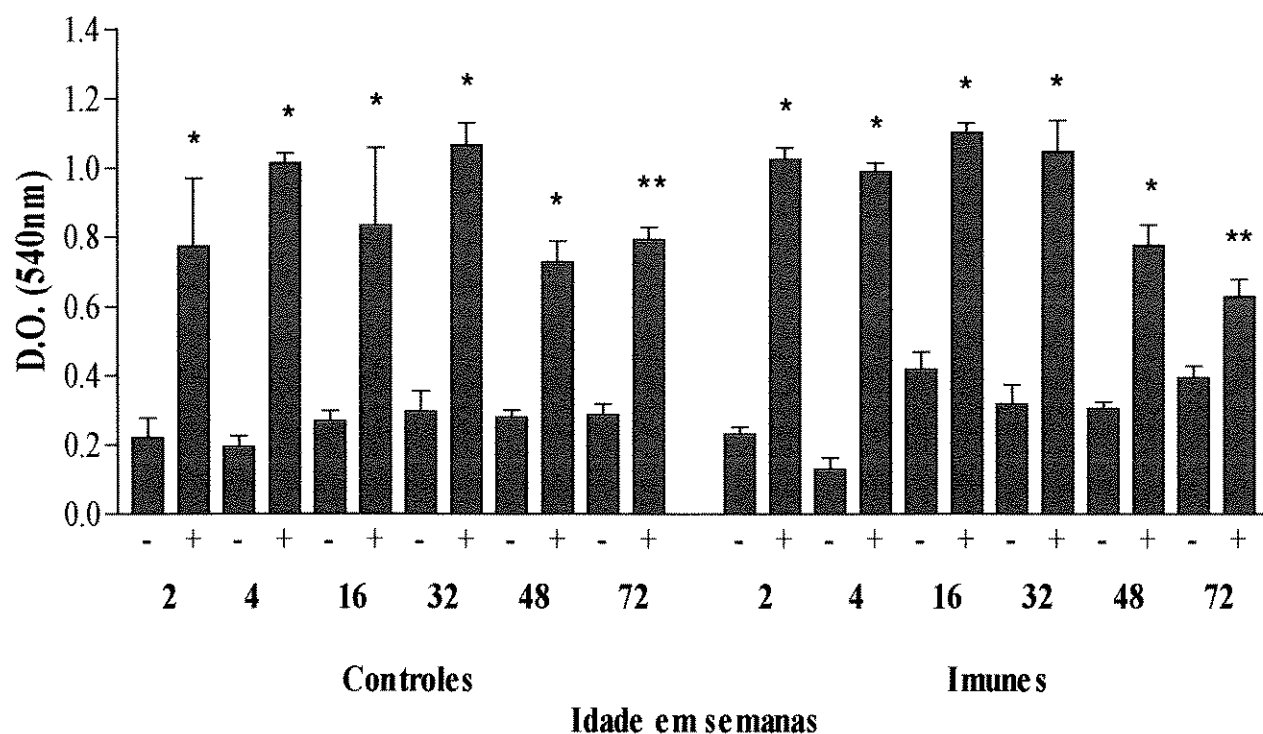


Figura 8 - Proliferação de linfócitos de camundongos BALB/c, ensaiados 60 dias após imunização. Esplenócitos de camundongos ($n = 3$) dos diferentes grupos etários indicados na figura foram coletados 60 dias após o tratamento com ACF (Controles) ou a imunização com uma dose de TNP-BSA/ACF (Imunes) e cultivados, em sextuplicata, na ausência (-) ou na presença (+) de Con-A ($2,5 \mu\text{g/ml}$) por 72 horas. O corante MTT foi empregado para determinar a proliferação celular, que foi expressa como média das absorbâncias a $540\text{nm} \pm$ erro padrão da média. Os asteriscos representam os valores de $p < 0,05$ (**) e $p < 0,001$ (*) no teste t de Student.

3. NÍVEIS DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE CÉLULAS ESPLÊNICAS

O grupo de experimentos descritos a seguir tinha por finalidade analisar o padrão de citocinas liberados por linfócitos T de camundongos naive ou imunizados, ao longo de seu desenvolvimento pós-natal. As células esplênicas obtidas de animais de diferentes faixas etárias, imunizados ou não com TNP-BSA, foram cultivadas na presença de Con-A e os sobrenadantes de cultura foram coletados para análise das citocinas secretadas.

3.1- NÍVEIS DE IL-2 E IFN- γ LIBERADOS POR CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS BALB/c

Com a finalidade de analisar a secreção das citocinas IL-2 e IFN- γ , típicas de células T helper 1, células esplênicas obtidas de camundongos BALB/c naive, de diferentes faixas etárias, foram cultivadas por 72 horas na presença de Con-A.

Na **figura 9** (painel **A**) estão representados os dados referentes a secreção de IL-2 pelas células esplênicas de camundongos BALB/c naive das faixas etárias de 2, 8, 32, 48 e 72 semanas. As células esplênicas dos camundongos mais jovens (2 e 8 semanas) apresentaram os níveis mais elevados de IL-2 ($743,29 \pm 21,02$ e $1.104,04 \pm 18,22$ pg/ml, respectivamente). É possível observar ainda um declínio na capacidade

de produção da citocina, com o envelhecimento, que atinge níveis bastante reduzidos em células provenientes de animais com 72 semanas de idade ($81,30 \pm 0,33$ pg/ml).

Com relação a produção de Interferon- γ , foram analisadas células esplênicas de camundongos com 2, 4, 8, 16, 24, 32, 40, 48 e 72 semanas de idade. Os resultados representados na **figura 9** (painel **B**) mostram que os linfócitos T de camundongos naive só são responsivos ao mitógeno, liberando IFN- γ em níveis detectáveis pelo ensaio (acima de 1.500 pg/ml), a partir de 8 semanas de idade ($1.475,54 \pm 173,71$). Os níveis máximos dessa citocina foram alcançados em células obtidas de animais com 32 semanas de idade ($4.773,51 \pm 57,34$ pg/ml). Observa-se também um declínio na produção do IFN- γ , com o avanço da idade, atingindo os níveis de $2.344,10 \pm 347,42$ pg/ml nos sobrenadantes da cultura de células coletadas de animais velhos (72 semanas). Os níveis de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células provenientes de animais de 2 e 4 semanas de idade, mostrados na **figura 10**, foram obtidos por extrapolação dos valores da curva padrão ($751,75 \pm 492,18$ e $1.157,07 \pm 86,85$ pg/ml, respectivamente).

Na **figura 10** estão representados os dados referentes às dosagens de IL-2 e IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células esplênicas colhidas 14, 28 e 60 dias após a imunização de animais de diferentes faixas etárias, imunizados com uma única dose de TNP-BSA. Os animais controles desses experimentos receberam apenas o ACF, por via intramuscular.

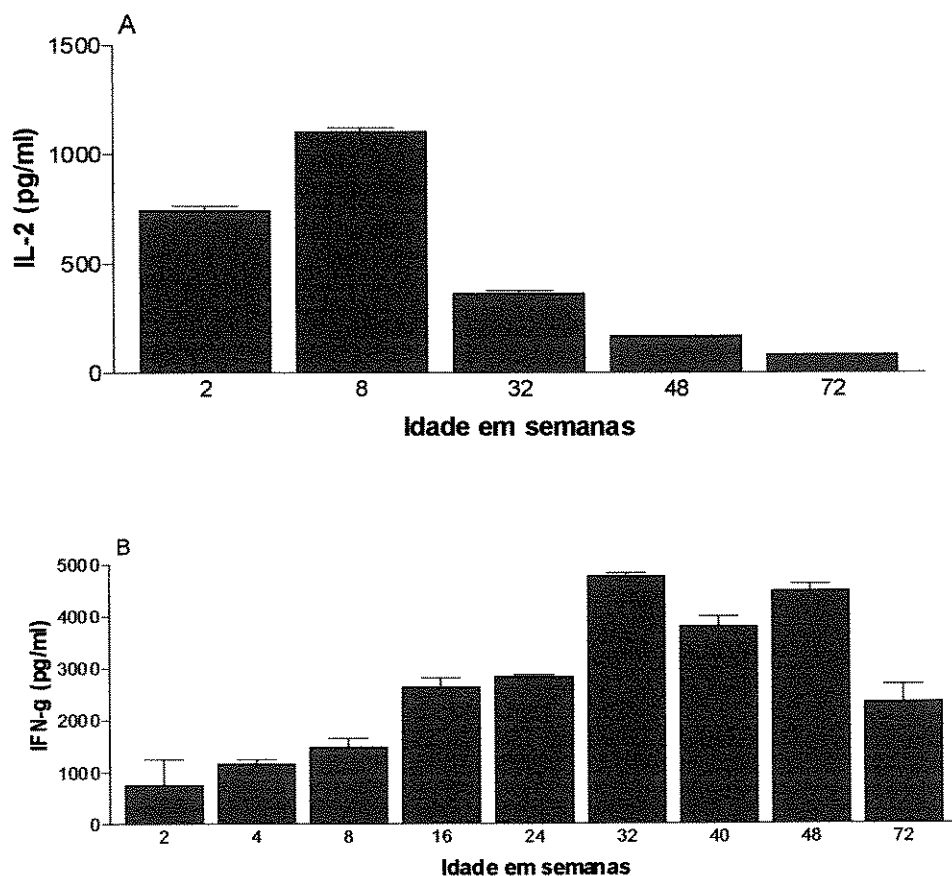


Figura 9- Perfil de citocinas liberadas por linfócitos T helper 1 (IL-2 e IFN- γ) em sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c naive. As dosagens de IL-2 (Painel A) foram realizadas através de ensaios de ELISA, empregando-se um Kit comercial (GENZYME Immunologicals). Nos ensaios de ELISA para dosagem de IFN- γ (Painel B), foram empregados os anticorpos monoclonais R46A2 (captura) e XMG1.2 biotinilado (detecção) e o mr IFN- γ (GENENTECH, Inc.) para o desenvolvimento da curva-padrão. Cada barra representa a média e o erro padrão da média (SEM) de dosagens realizadas em duplicata, a partir de um “pool” dos sobrenadantes de cultura de células de 3 animais do grupo etário indicado na figura.

Os dados apresentados no painel A da **figura 10** são referentes as dosagens de IL-2, realizadas em sobrenadantes obtidos das culturas de células coletadas de animais

de 2, 4, 32, 48 e 72 semanas de idade, por ocasião da imunização ou tratamento com ACF. Como é possível observar, as células provenientes de animais com 2, 4 e 32 semanas foram as mais responsivas ao estímulo *in vitro*, liberando quantidades variáveis da citocina, desde $1.274,14 \pm 37,85$ pg/ml (4 semanas, ACF, 14 dias após o tratamento) a $211,33 \pm 5,61$ pg/ml (4 semanas, ACF, 60 dias após o tratamento), em função do tempo decorrido após os tratamentos e da idade. Observou-se ainda que, enquanto os níveis de IL-2 nos sobrenadantes das células colhidas de animais de 2 e 4 semanas de idade caíram ao longo do processo de imunização, nas culturas de células coletadas de animais com 32 semanas mostraram a tendência inversa. De modo geral, as células obtidas dos animais mais velhos (48 e 72 semanas de idade), imunizados ou não com TNP-BSA, produziram quantidades bastantes reduzidas de IL-2, em todas as coletas realizadas. Sessenta dias após os tratamentos, os níveis de IL-2 produzidos estavam no limite detecção do método (15 pg/ml), nestes grupos experimentais.

A liberação de IFN- γ também foi pesquisada em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos de diferentes faixas etárias, imunizados ou não com TNP-BSA. Todos os grupos estudados apresentaram quantidades detectáveis de INF- γ , sob o estímulo *in vitro* com a Con-A (**figura 10**). O perfil de IFN- γ encontrado nos grupos de animais sacrificados 14 dias após a imunização (**figura 10 B**) parece repetir a tendência encontrada para os animais naïve (**figura 9 B**), isto é um aumento progressivo da liberação de INF- γ com o avanço da idade, até 32 semanas, e uma redução nos grupos etários mais velhos (48 e 72 semanas por ocasião da imunização). A células coletada dos animais com 2 e 4 semanas, no início do tratamento (ACF ou a

imunização), mostraram os níveis mais baixos de secreção de IFN- γ , em relação aos demais grupos etários. Em resumo, células de animais muito jovens ou muito velhos apresentaram um menor desempenho quanto à produção de IFN- γ , quando as células foram coletadas 14 dias após a administração do antígeno ou apenas do adjuvante.

As células esplênicas obtidas de animais sacrificados 28 e 60 dias após o início dos tratamentos mostraram uma tendência geral de aumento da secreção de IFN- γ em todos os grupos etários estudados, particularmente nos grupos de animais mais jovens à época do início dos tratamentos, isto é, 2 e 4 semanas, que ao final da observação tinham 10 e 12 semanas de idade, respectivamente. Os animais mais velhos, isto é, 48 e 72 semanas, apresentaram os níveis mais baixos de IFN- γ nos sobrenadantes de cultura de células coletadas 28 e 60 dias após o início do tratamento.

Na **figura 11** estão representadas as dosagens de IL-2 (painel **A**) e IFN- γ (painel **B**), realizadas em sobrenadantes de cultura de células de baço de camundongos de diferentes faixas etárias, imunizados com duas doses de antígeno TNP-BSA (resposta secundária), administradas com um intervalo de 30 dias e sacrificados 30 dias após a segunda dose do antígeno.

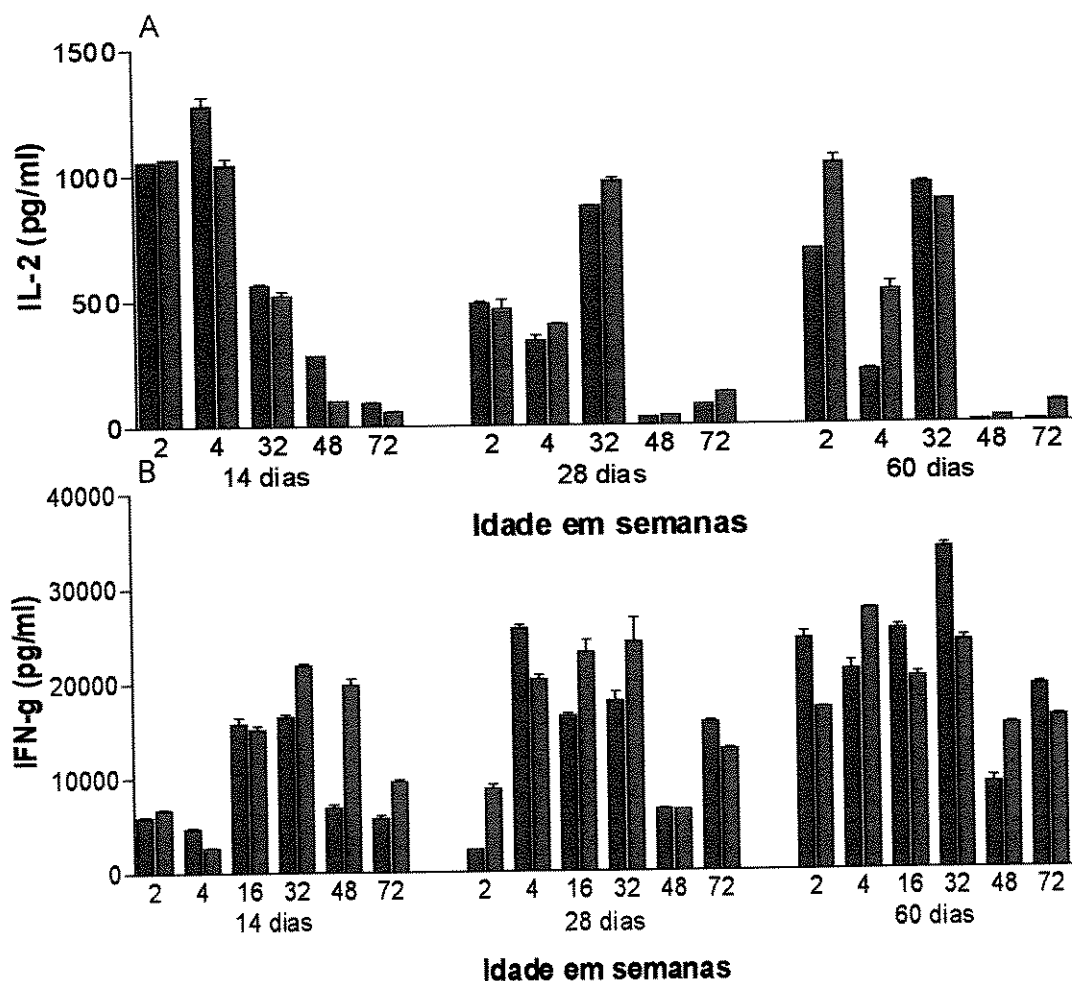


Figura 10- Perfil de citocinas liberadas por linfócitos T helper 1 (IL-2 e IFN- γ) em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados ou não com uma dose de TNP-BSA. O painel A representa os resultados obtidos na dosagem de IL-2 em sobrenadantes de esplenócitos colhidos 14, 28 e 60 dias após os tratamentos de animais imunizados (barras azuis) ou injetados com ACF (barras vermelhas), com 2, 4, 32, 48 e 72 semanas de idade. O painel B representa os resultados obtidos na dosagem de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células esplênicas colhidas 14, 28 e 60 dias após os tratamentos de animais imunizados (barras azuis) ou injetados com ACF (barras vermelhas), de animais com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade. Os ensaios para detecção de IL-2 e IFN- γ e as análises dos resultados obtidos foram feitos como descrito na figura 10.

O painel A da **figura 11** resume os resultados das dosagens de IL-2 em células esplênicas obtidas de animais sacrificados 30 dias após a imunização com a segunda dose do antígeno. É possível observar que o perfil da produção de IL-2 nessas células foi similar àquele apresentado por esplenócitos de animais que receberam apenas uma dose imunizante e coletados 60 dias após o tratamento (**figura 10 A**). Níveis mais baixos dessa citocina também foram observados nos grupos de 48 e 72 semanas de idade quando da imunização, tanto nos grupos controles ($36,08 \pm 0,0$ e $12,81 \pm 0,49$ pg/ml, respectivamente) quanto nos grupos imunizados ($45,32 \pm 0,0$ e $32,95 \pm 0,49$ pg/ml, respectivamente). Animais de 4 e 32 semanas por ocasião da imunização, tanto dos grupos controles ($1.276,94 \pm 40,65$ e $1.257,78 \pm 2,80$ pg/ml, respectivamente) quanto os imunizados ($1.169,93 \pm 45,79$ e $1.308,72 \pm 67,75$ pg/ml, respectivamente), apresentaram os níveis mais elevados dessa citocina.

A **figura 11** (painel B) resume os resultados obtidos nas dosagens de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos das idades acima indicadas, coletadas 30 dias após a administração da segunda dose do antígeno. Não foi possível observar nenhum incremento na produção de IFN- γ após a administração da dose reforço, quando se compara os resultados obtidos com nesse grupo experimental e o que recebeu apenas uma dose de antígeno (**figura 10B**), com valores máximos se situando ao redor de 20.000 pg/ml da citocina. Da mesma forma, os animais com 2 semanas e 72 semanas de idade, controles ($6.473,21 \pm 379,46$ e $5.418,57 \pm 14,33$ pg/ml, respectivamente) e imunes ($6.808,03 \pm 848,21$ e $6.163,99 \pm 14,33$ pg/ml, respectivamente) por ocasião do início dos experimentos foram os menos responsivos ao estímulo in vitro para a produção de IFN- γ .

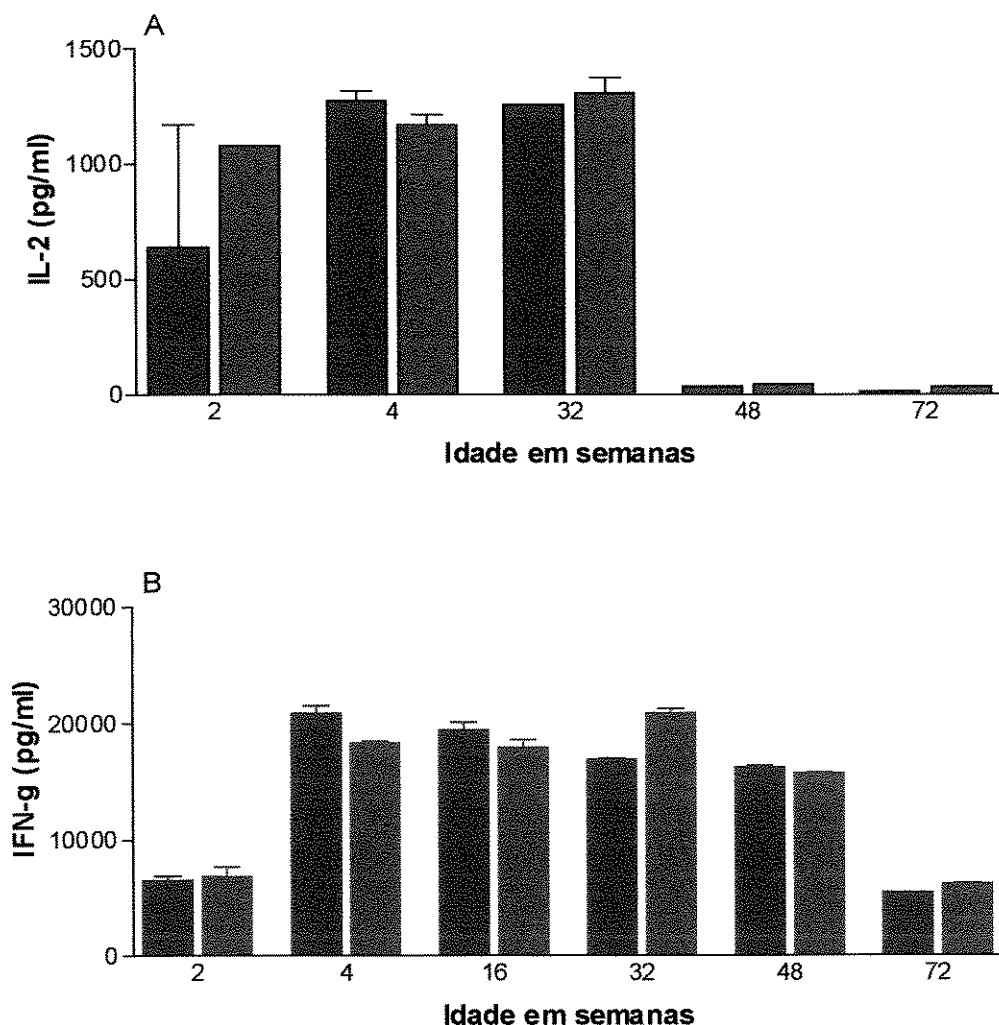


Figura 11: Perfil de citocinas liberadas por linfócitos T helper 1 (IL-2 e IFN- γ) em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados ou não com duas doses de TNP-BSA. O painel A representa os resultados obtidos na dosagem de IL-2 em sobrenadantes de esplenócitos colhidos 30 dias após a segunda dose do antígeno (barras azuis) ou injetados com salina (barras vermelhas), com 2, 4, 32, 48 e 72 semanas de idade. O painel B representa os resultados obtidos na dosagem de IFN- γ em sobrenadantes de cultura de células esplênicas colhidas 30 dias após a segunda dose do antígeno (barras azuis) ou injetados com salina (barras vermelhas), com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade. Os ensaios para detecção de IL-2 e IFN- γ e as análises dos resultados obtidos foram feitos como descrito na figura 10.

3.2- NÍVEIS DE IL-4 E IL-10 LIBERADOS POR CÉLULAS ESPLÊNICAS DE CAMUNDONGOS BALB/C

Com a finalidade de analisar a secreção das citocinas IL-4 e IL-10, típicas de células Thelper 2, células esplênicas obtidas de camundongos BALB/c, de diferentes faixas etárias, foram cultivadas por 72 horas na presença de Con-A.

A **figura 12** resume os resultados obtidos nas dosagens dessas citocinas, nos sobrenadantes de cultura de células esplênicas obtidas de animais naive de diferentes faixas etárias. O perfil de IL-4 (painel A) mostra uma curva em forma de sino, em função da idade, onde a produção máxima pode ser observada nos sobrenadantes de células esplênicas de animais com 24 e 32 semanas de idade ($424,70 \pm 13,06$ e $497,88 \pm 28,74$ pg/ml, respectivamente).

Na **figura 12 B** estão representados os resultados referentes às dosagens de IL-10. Um perfil similar ao observado para a produção de IL-4 foi obtido nessas dosagens, onde as células esplênicas de camundongos com 32 e 40 semanas de idade liberaram os níveis mais elevados da citocina ($998,64 \pm 29,89$ e $1.172,55 \pm 43,47$ pg/ml, respectivamente).

Na **figura 13** estão representados os dados referentes às dosagens de IL-4 e IL-10 em sobrenadantes de cultura de células esplênicas retiradas de animais de diferentes faixas etárias após 14, 28 e 60 dias da administração de TNP-BSA ou de ACF (controles).

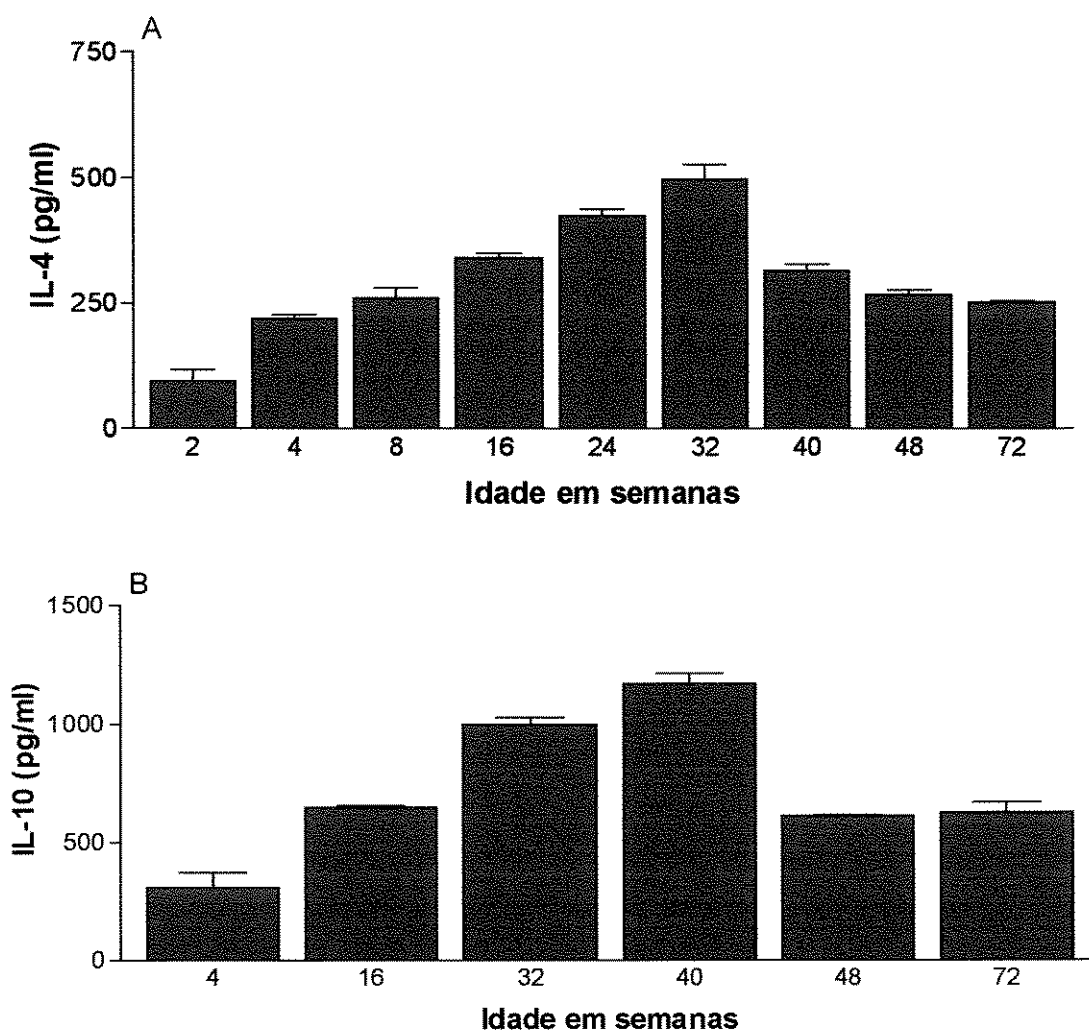


Figura 12: Perfil de citocinas liberadas por linfócitos T helper 2 (IL-4 e IL-10) em sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c naive. As dosagens de IL-4 (Painel A) foram realizadas através de ensaios de ELISA, empregando-se anticorpo monoclonal 11B11 (captura) e BVD6 biotinilado (detecção) e mrIL-4 (GENZYME Immunologicals). Nos ensaios de ELISA para dosagem de IL-10 (Painel B), empregou-se um Kit comercial (ENDOGEN). Cada barra representa a média e o erro padrão da média (SEM) de dosagens realizadas em duplicata, a partir de um “pool” dos sobrenadantes de cultura de células de 3 animais do grupo etário indicado na figura.

Os níveis de IL-4 nos sobrenadantes de cultura de animais imunizados e seus respectivos controles estão mostrados na **figura 13 A**. Os sobrenadantes de cultura de esplenócitos obtidos de animais sacrificados 14 dias após o início da imunização apresentaram níveis altos da citocina, em todos os grupos etários estudados (entre 236 a 660 pg/ml). É possível observar ainda que a secreção de IL-4 não parece sofrer grandes alterações com o avanço da idade. Com o decorrer do tempo após a imunização, observa-se uma tendência de redução nos níveis dessa citocina em todos os grupos experimentais. Desta forma, animais sacrificados 60 dias após a imunização, apresentaram níveis mais baixos de secreção de IL-4, quando comparados aos níveis encontrados em sobrenadantes de cultura de células de animais sacrificados 14 e 28 dias após a imunização. Nas células obtidas de animais sacrificados 60 dias após a imunização, não foi possível observar diferenças expressivas entre as diversas faixas etárias estudadas quanto à secreção de IL-4, uma vez que a grande maioria dos grupos etários, para ambos os tratamentos, mostraram níveis da citocina no limite de detecção do método (75 pg/ml).

Em comparação com os resultados obtidos com células provenientes de camundongos naïve (**figura 12 B**), os níveis de IL-10 aumentaram substancialmente (cerca de duas vezes) nos sobrenadantes de culturas de células de todos os grupos etários testados, quando as células foram coletadas 14 dias após o início da imunização (**figura 13 B**). Com o decorrer do tempo após a imunização, os níveis de IL-10 secretados foram se reduzindo em todos os grupos etários, mas esse decréscimo se deu mais lentamente nos animais mais velhos (72 semanas por ocasião do início da imunização). Animais sacrificados 60 dias após o início do tratamento atingiram níveis

bem reduzidos de secreção de IL-10, porém ainda dentro do limite detecção do método (15 pg/ml).

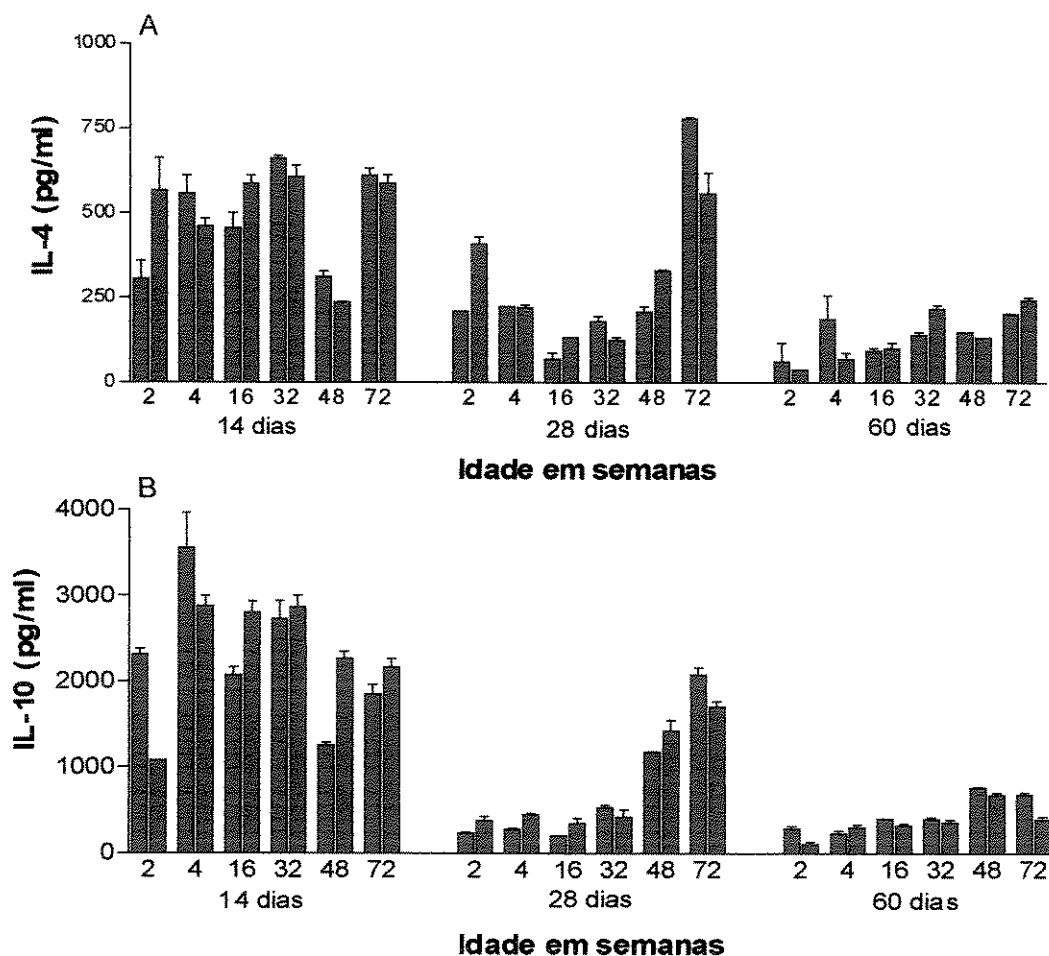


Figura 13: Perfil de citocinas liberadas por linfócitos T helper 2 (IL-4 e IL-10) em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados ou não com uma dose de TNP-BSA. O painel A representa os resultados obtidos na dosagem de IL-4 em sobrenadantes de esplenócitos colhidos 14, 28 e 60 dias após os tratamentos de animais imunizados (barras azuis) ou injetados com ACF (barras vermelhas), com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade. O painel B representa os resultados obtidos na dosagem de IL-10 em sobrenadantes de cultura de células esplênicas colhidas 14, 28 e 60 dias após os tratamentos de animais imunizados (barras azuis) ou injetados com ACF (barras vermelhas), de animais com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade. Os ensaios para detecção de IL-4 e IL-10 e as análises dos resultados obtidos foram feitos como descrito na figura 13.

Na **figura 14** estão representadas as dosagens de citocinas (IL-4 e IL-10), realizadas em sobrenadantes de cultura de células de baço de camundongos de diferentes faixas etárias, imunizados com duas doses de antígeno TNP-BSA (resposta secundária), administradas com um intervalo de 30 dias e sacrificados 30 dias após a segunda dose do antígeno.

A imunização secundária com TNP-BSA, na ausência de ACF, parece manter a produção de IL-4 de células coletadas 30 dias após a segunda dose do antígeno (**figura 14 A**) em níveis comparáveis ao observado em sobrenadantes de células esplênicas de animais coletadas 60 dias após a administração da primeira dose de antígeno, (**figura 12 A**). Isto é, de modo geral os níveis de IL-4 são baixos em todos os grupos, elevando-se ligeiramente apenas nos animais velhos (72 semanas de idade).

Resultado similar aos descritos acima para a IL-4 foram encontrados para a secreção de IL-10 por células de animais que receberam a dose-reforço do antígeno ou apenas salina (**figura 14 B**). Apenas os animais do grupo mais velho (72 semanas de idade) apresentaram níveis mais elevados de IL-10.

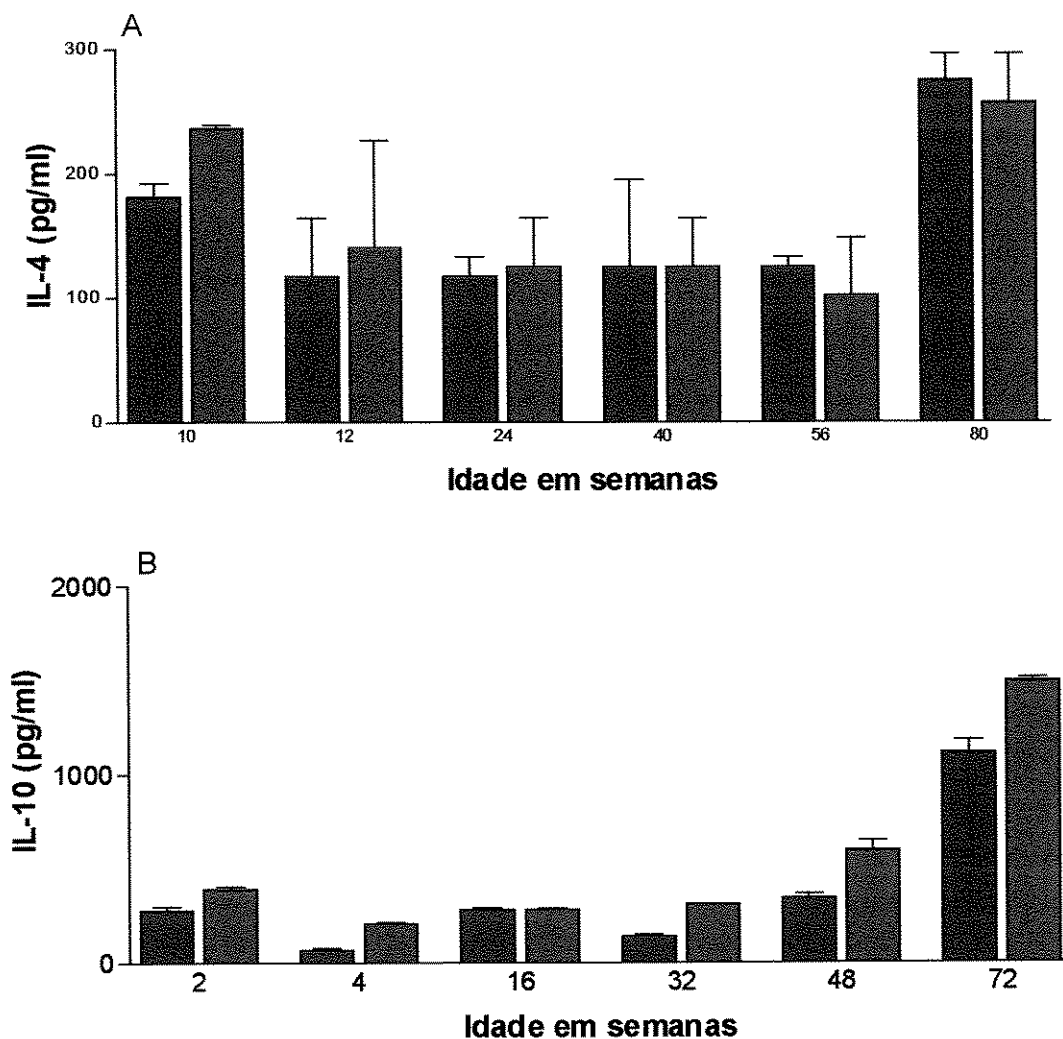


Figura 14: Perfil de citocinas liberadas por linfócitos T helper 2 (IL-4 e IL-10) em sobrenadantes de cultura de células esplênicas de camundongos BALB/c imunizados ou não com duas doses de TNP-BSA. O painel A representa os resultados obtidos na dosagem de IL-4 em sobrenadantes de esplenócitos colhidos 30 dias após a segunda dose do antígeno (barras azuis) ou injetados com salina (barras vermelhas), com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade. O painel B representa os resultados obtidos na dosagem de IL-10 em sobrenadantes de cultura de células esplênicas colhidas 30 dias após a segunda dose do antígeno (barras azuis) ou injetados com salina (barras vermelhas), com 2, 4, 16, 32, 48 e 72 semanas de idade. Os ensaios para detecção de IL-4 e IL-10 e as análises dos resultados obtidos foram feitos como descrito na figura 13.

4- SUBPOPULAÇÕES DE CÉLULAS T

O perfil das subpopulações de células T esplênicas de camundongos BALB/c, no decorrer de seu desenvolvimento pós-natal (2, 4, 8, 32, 48, 72 e 96 semanas de idade), foi analisado através de ensaios de imunofluorescência em citômetro de fluxo. As preparações celulares, livres de hemáceas, foram duplamente marcadas com os anticorpos anti-CD3 e anti-CD4 ou anti-CD8, conjugados com fluorocromos. Cada grupo etário foi formado por 3 animais. Os resultados obtidos em três experimentos distintos foram expressos como percentagem de células que apresentavam a dupla marcação \pm erro padrão da média (\pm SEM).

Como é possível observar (**tabela 1 e figura 15**), foram encontradas alterações no perfil de células TCD3⁺CD4⁺ e TCD3⁺CD8⁺, relacionadas com a idade dos animais estudados. Animais com 2 semanas de idade apresentaram os menores percentuais de células TCD4⁺ ($7,28 \pm 1,30$), quando comparados aos demais grupos etários estudados. Os valores percentuais sofreram um aumento com o avanço da idade do animal, alcançando um patamar médio em torno de 21% de células TCD4⁺, entre a 8ª e a 72ª semanas de idade. Um ligeiro incremento nesses valores ($31,02 \pm 4,96$) pode ser observado nos animais do grupo etário mais velho (96 semanas de idade).

Com relação as porcentagens de células T CD3⁺CD8⁺, os valores encontrados para os animais de 2 semanas também foram os mais baixos ($3,38 \pm 0,5$) entre os grupos etários examinados. Nos demais grupos, os valores percentuais obtidos variaram entre 7,98 a 14,62%, sendo que os valores máximos foram observados em animais de 8 semanas de idade.

Desta forma, quando se analisa a relação $CD4^+/CD8^+$ (tabela 1), nas diferentes faixas etárias testadas, observa-se que esse índice varia muito pouco entre os diferentes grupos (2,16 a 2,57), exceto nos grupos etários de 4 e 8 semanas, nos quais a relação $CD4/CD8$ foi da ordem de 1,55 e 1,73, respectivamente.

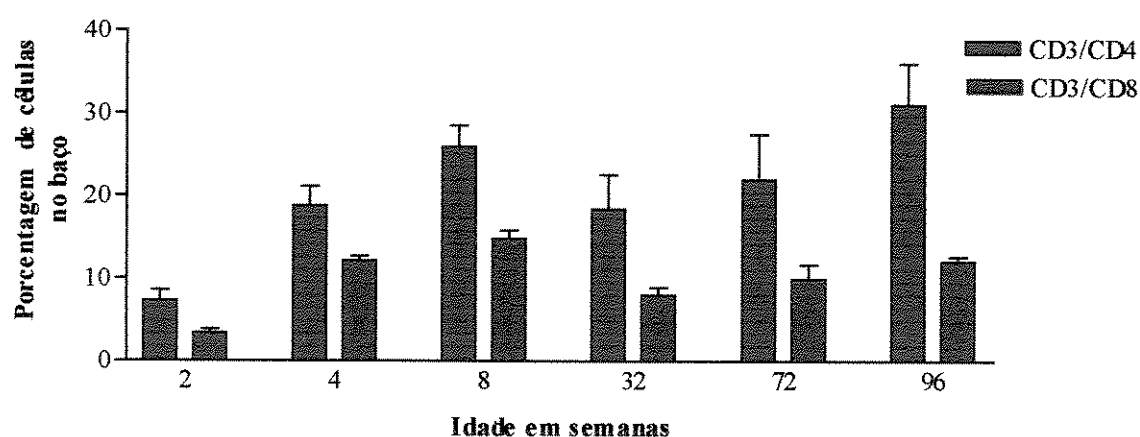


Figura 15: Perfil das subpopulações de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ em baços de camundongos BALB/c ao longo do seu desenvolvimento pós-natal. As determinações foram realizadas em esplenócitos, após a lise osmótica das hemáceas, coletados de 3 animais de cada grupo etário indicado na figura. As preparações celulares foram marcadas com anticorpo anti-CD3 conjugado com ficoeritrina e com anti-CD4 ou anti-CD8 conjugados com fluoresceína (PharMingen) e analisadas por citometria de fluxo. Os resultados foram expressos como porcentagem de células duplo positivas e representam a média e erro padrão da média obtida em três experimentos distintos.

Tabela 1: Porcentagens das populações de células esplênicas T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ no “gate”, analisadas em citômetro de fluxo, obtidas de animais das diferentes faixas etárias indicadas

IDADE (semanas)	Média TCD3⁺CD4⁺	SEM	n	Média TCD3⁺CD8⁺	SEM	n	Razão CD4/CD8
2	7,28	1,30	6	3,38	0,50	6	2,16
4	18,78	2,31	9	12,12	0,62	9	1,55
8	25,88	2,62	6	14,88	0,91	6	1,74
32	18,42	4,10	9	7,98	0,91	9	2,31
72	21,96	5,47	9	9,92	1,76	9	2,21
96	31,02	4,96	9	12,06	0,56	9	2,57

V – DISCUSSÃO

O processo de envelhecimento acarreta alterações no sistema imune que afetam tanto a resposta humoral quanto a resposta mediada por células. As alterações na produção e regulação das células linfóides, tem sido apontadas como responsáveis pela maior incidência de doenças infecciosas e tumorais em indivíduos idosos (PAHLAVANI & RICHARDSON, 1996). O entendimento das modificações sofridas nesse sistema, relacionadas com a idade, pode ser de grande valia no estudo das doenças que apresentam maior incidência na fase tardia da vida dos indivíduos. Entretanto, e a despeito da pesquisa intensiva neste campo, diversos aspectos relacionados ao processo de envelhecimento permanecem pouco conhecidos.

Dessa forma, o presente estudo teve por finalidade investigar as alterações imunológicas decorrentes do envelhecimento em camundongos BALB/c, através de uma abordagem sistemática, visto que poucos trabalhos buscaram um acompanhamento deste processo em animais ao longo do seu desenvolvimento pós-natal e não somente em alguns momentos da existência desses animais, arbitrariamente definidos como jovens e velhos.

Os camundongos utilizados nesse estudo foram obtidos no CEMIB/UNICAMP como animais SPF (*specific pathogen free*) e mantidos no Biotério do DMI/IB/UNICAMP, em ambiente convencional, durante todo período experimental. Os animais que apresentaram alterações, tais como aparecimento de tumores ou debilitações, foram descartados de forma a não comprometer os dados analisados. Os animais foram sempre estudados individualmente, mas os resultados foram apresentados como médias dos grupos para melhor representação.

Assim, a produção de anticorpos em resposta ao antígeno TNP-BSA foi investigada em função da idade dos animais e os animais do tempo decorrido após a

imunização - até um ano. Os resultados obtidos mostram que jovens (4 semanas) e adultos jovens (16 e 32 semanas) foram os mais responsivos à imunização, apresentando os níveis mais elevados de anticorpos no pico da resposta primária, tanto para a porção haptênica quanto para porção proteica do antígeno. Os animais mais velhos (72 semanas de idade) apresentaram níveis mais baixos de anticorpos durante a resposta primária ao imunógeno, enquanto que os animais neonatos (2 semanas de idade) mostraram níveis de anticorpos intermediários entre aqueles observados nos soros de animais jovens e velhos, para ambos os estímulos. Os níveis de anticorpos dirigidos contra o hapteno sofreram um decréscimo mais acentuado, em todos os grupos etários estudados, que aqueles observados para a porção proteica do antígeno, isto é, após a 20ª semana os níveis de anticorpos anti-TNP já estava bem reduzido enquanto que os níveis de anticorpos anti-TNP-BSA eram relativamente altos e se mantiveram estáveis mesmo após a 24ª semana após a imunização.

No presente trabalho, verificamos que a resposta secundária também parece ser afetada pela idade em proporções mais importantes que a resposta primária. Nesse sentido, nossos resultados mostraram uma nítida separação em três grupos principais de respostas secundárias dirigidas tanto para o antígeno simples (TNP) como para o antígeno complexo TNP-BSA, isto é, respostas de baixa intensidade, obtidas nos ensaios realizados com os soros provenientes de animais de idades mais avançadas (48 e 72 semanas de idade); as respostas de média intensidade, verificadas nos soros de camundongos de 2 e de 32 semanas de idade; e aquelas de maior intensidade, obtidas nos ensaios utilizando os soros de animais jovens (4 e 16 semanas de idade). As respostas secundárias medidas através dos anticorpos dirigidos ao hapteno e ao antígeno complexo apresentaram um escore máximo semelhante, não ocorrendo

grandes variações entre os dois antígenos ensaiados em cada grupo etário estudado. A cinética de produção de anticorpos para o hapteno e para a proteína também foi semelhante nos diversos grupos experimentais avaliados. A administração da dose reforço permitiu ainda a manutenção de níveis elevados de anticorpos (superiores ao observado com a administração de apenas uma dose imunizante), para ambos os antígenos testados, em todos os grupos experimentais, exceto nos animais mais velhos (48 e 72 semanas) cujos níveis de anticorpos retornaram ao basal, cerca de 20 semanas após o início das imunizações.

Dados da literatura mostram alguns resultados concordantes e outros conflitantes com os obtidos no presente trabalho. Assim, alguns autores tem mostrado que o envelhecimento provoca alterações na capacidade de camundongos em montar uma resposta imune primária, com os animais velhos sendo menos responsivos aos antígenos empregados para a imunização (CALLARD *et. al.*, 1977; CALLARD & BASTEN, 1978). Por outro lado, CALLARD & BASTEN (1978) verificaram que a resposta secundária ao antígeno não era significativamente afetada pelo envelhecimento. Entretanto, resultados opostos foram encontrados por BORGHESI & NICOLETTI (1995). Esses autores não encontraram diferenças significativas na capacidade de camundongos responderem primariamente a antígenos bacterianos com o avanço da idade, mas a produção de anticorpos durante a resposta secundária foi significativamente alterada em função da idade, com animais velhos sendo menos responsivos aos estímulos empregados.

Os nossos resultados, por outro lado, mostram que as respostas primária e secundária são afetadas pela idade do animal e que animais muito jovens ou muito velhos são, em geral, menos responsivos ao imunógeno. Pelos gráficos obtidos é

possível observar uma resposta de anticorpos diminuída em animais das faixas etárias extremas, tanto nos grupos que receberam uma única dose quanto para os imunizados com duas doses de antígeno.

A capacidade diferenciada de montar uma resposta imune com a produção de anticorpos, dentro de uma mesma linhagem de camundongos, em função do envelhecimento, poderia estar relacionada a alterações de um ou mais parâmetros que influenciam tais respostas. Desta forma, alterações no padrão de citocinas geradas por linfócitos T helper durante a resposta imune, nos vários grupos etários, poderiam ser esperadas. Mudanças na capacidade proliferativa dos linfócitos T helper ou ainda no perfil das subpopulações de linfócitos T também poderiam fornecer as bases explicativas para os resultados descritos acima, referentes a capacidade diminuída de animais velhos em responder a antígenos proteicos e haptênicos. Para testar essas hipóteses, foram feitos experimentos visando medir a capacidade proliferativa de esplenócitos, estudar o perfil de subpopulações de células T, assim como os níveis de citocinas liberados por linfócitos T helper 1 (IFN- γ e IL-2) e células Thelper 2 (IL-4 e IL-10), ao longo de todo o período de vida de camundongos BALB/c, naïve ou imunizados.

Na literatura tem sido descrito uma série de resultados sobre o declínio da resposta proliferativa à mitógenos com o avanço da idade (EYLAR *et al.*, 1988; PAHLAVANI, 1996; GOONEWARDENE AND MURASKO, 1995; KIRMAN *et al.*, 1996). No presente trabalho também foi possível observar que células provenientes de animais jovens e adultos jovens parecem ser mais responsivas à Con-A que as obtidas de animais neonatos (2 semanas) ou daqueles com idade mais avançada (72 semanas). Nesse sentido, as diferenças mais notáveis foram obtidas quando se empregou as

células coletadas 28 e 60 dias após o tratamento com o imunógeno/ACF ou apenas o adjuvante. Além disso, a administração do adjuvante, e não do antígeno, parece ter sido o fator determinante nas diferenças observadas entre os grupos experimentais (*controles*, tratados apenas com adjuvante e *imunizado*, tratados com o imunógeno emulsificado em adjuvante) e o grupo naíve (não tratado), uma vez que a administração de uma dose reforço (imunógeno em solução fisiológica) aos animais do grupo *imunizado* não modificou a capacidade proliferativa das células destes animais em responder *in vitro* ao mitógeno. Dessa forma, os dados referentes aos grupos de animais que receberam dose reforço foram representados em conjunto com os resultados dos grupos imunizados com uma única dose e sacrificados após 60 dias.

Estudos realizados por CAKMAN *et al.* (1996) mostraram que as mudanças no perfil das subpopulações de células T e nos padrões de secreção de citocinas são alguns fatores que podem contribuir para a desregulação da resposta de anticorpos mediada pelas células T. Essa desregulação se traduz pela produção de anticorpos de baixa afinidade e de autoanticorpos. Os resultados obtidos no presente trabalho nos mostram que a baixa produção de anticorpos específicos por animais de idade mais avançada pode estar relacionada as alterações nos padrões das subpopulações de células T helper e nos níveis de interleucinas.

Os linfócitos T foram anteriormente descritos como a principal população envolvida no envelhecimento do sistema imunológico (MAKINODAN, T. & YUNIS, 1977). Mudanças notáveis têm sido observadas nas subpopulações de células T helper em função da idade, principalmente nas secreções de citocinas *in vivo* e *in vitro*, tanto em humanos quanto em animais de laboratórios (CAKMAN *et al.*, 1996).

Apesar da maioria dos estudos reportarem um decréscimo na relacionado com a idade na expressão de IL-2, foi anteriormente encontrado um aumento ou nenhuma alteração na expressão dessa citocina em resposta à estimulação mitogênica, tanto em humanos quanto em roedores (PAHLAVANI & RICHARDSON, 1996). AOKI *et al.*, (1995) mostraram um aumento na produção de IFN- γ , em ensaios utilizando Con-A como estímulo celular, em camundongos que apresentam senescência acelerada. Por outro lado, outros estudos mostraram um decréscimo na secreção de interferon- γ (IFN- γ), após estimulação, em indivíduos de idade mais avançada (ALBRIGHT & ALBRIGHT, 1994 e CINADER, 1994). Dessa forma, alguns trabalhos afirmam ocorrer um decréscimo ou manutenção do número de células T helper 1 com o avanço da idade, mas esses dados são controversos (ALBRIGHT & ALBRIGHT, 1994, CINADER, 1994 e PAHLAVANI & RICHARDSON, 1996).

Em nossos estudos, os níveis de IL-2 parecem sofrer alterações significativas em função da idade do animal estudado. Sobrenadantes de cultura de células de animais de idade mais avançada apresentaram níveis consideravelmente mais baixos nas dosagens dessa interleucina, tanto para os animais que não receberam nenhuma forma de tratamento quanto para aqueles imunizados com antígeno emulsionado em adjuvante ou apenas tratados com o ACF. Os níveis máximos de IL-2 foram observados em animais das faixas etárias mais jovens, ocorrendo um decréscimo acentuado nos níveis dessa interleucina em função da idade, independente do esquema experimental estudado.

No grupo de animais naive (que não receberam estimulação antigênica), os níveis de IL-2 foram relativamente altos nos sobrenadantes de cultura de células obtidas de animais neonatos e jovens (2 e 8 semanas de idade, respectivamente).

Nesses ensaios, a secreção de IL-2 foi máxima nas células obtidas de camundongos com 8 semanas de idade, ocorrendo uma acentuada diminuição nos níveis dessa interleucina em animais de idade mais avançada.

O perfil de liberação da IL-2 pelas células esplênicas estimuladas com Con-A, obtidas de animais imunizados com o antígeno TNP-BSA ou apenas com o adjuvante, apresentou alterações quando comparado ao observado para os animais naive. Nesse caso, encontrou-se um aumento nos níveis da citocina nos sobrenadantes de cultura de células de animais sacrificados 14 dias após a imunização, exceto naqueles obtidos da cultura de células de animais mais velhos (48 e 72 semanas de idade) que permaneceram muito baixos, no limite de detecção do método. Com o decorrer do tempo após os tratamentos (28 e 60 dias), os níveis de IL-2 retornaram aos valores encontrados nos ensaios realizados com células obtidas de animais naive, exceto nos animais com 2 e 32 semanas de idade, os quais ainda se encontravam elevados por essa ocasião.

A administração de uma dose reforço do imunógeno, na ausência de adjuvante, resultou na elevação dos níveis da IL-2, nas culturas de células de todos os grupos responsivos ao mitógeno (2, 4 e 32 semanas de idade), mesmo quando as células foram coletadas 30 dias depois do desafio antigênico.

A secreção de IFN- γ também apresentou alterações dependentes da idade dos animais estudados. Assim, células obtidas de animais naive jovens (2, 4 e 8 semanas de idade) ou muito velhos (72 semanas), apresentaram os menores níveis dessa citocina. As células obtidas de animais adultos jovens apresentaram os níveis mais elevados de secreção de IFN- γ , ocorrendo portanto uma tendência de aumento nos níveis dessa citocina, seguido pela sua redução, com o avanço da idade. Nos grupos tratados com o

antígeno ou com o adjuvante, a produção de IFN- γ foi progressivamente aumentada, com o decorrer do tempo após o tratamento, em todos os grupos estudados, em particular nos grupos etários anteriormente não responsivos (2, 4, 8 e 72 semanas de idade). O aumento nos níveis de IFN- γ chegou a ser da ordem de até 4-5 vezes mais citocina liberada nas células obtidas de animais sacrificados 14 e 28 dias após a imunização. Os níveis de IFN- γ ainda estavam altos nesses sobrenadantes, quando as células foram coletadas 60 dias após os tratamentos.

A administração da dose reforço não alterou significativamente a resposta de produção de IFN- γ das células obtidas dos grupos desafiados. Dessa forma, a reestimulação com o antígeno não parece alterar o padrão de secreção de IFN- γ nos grupos etários estudados.

Em resumo, entre os grupos etários estudados, os animais das faixas etárias extremas (muito jovens ou muito velhos) apresentaram os menores níveis de secreção de IFN- γ , tanto nos grupos naïve quanto nos grupos experimentais sacrificados 14 e 28 dias após os tratamentos. Sobrenadantes de cultura de células obtidas de animais desafiados com o imunógeno, na ausência de adjuvante (resposta secundária), também mostraram níveis mais reduzidos de secreção dessa citocina quando as células eram provenientes dos grupos de animais daquelas faixas etárias.

O conjunto dos resultados obtidos sugere que a liberação das citocinas produzidas por células T helper 1 (IL-2 e IFN- γ) apresenta um perfil peculiar em função do avanço da idade do animal ou seja, a secreção das citocinas desse tipo celular diminuiu com o avanço da idade, e também se apresentou inferior nos animais da faixa etária mais jovem. Entretanto, não é possível afirmar que essas alterações

sejam diretamente relacionadas com a diminuição do número de células dessa população, sendo necessários outros experimentos para comprovar essa possibilidade.

As alterações nos níveis das citocinas secretadas pela subpopulação TH₂ têm sido um assunto controverso na literatura, assim como os relatos sobre um eventual aumento no número de células TH₂ com o avanço da idade (ALBRIGHT & ALBRIGHT, 1994 e CINADER, 1994). Alguns autores mostraram a ocorrência de um aumento dos níveis de IL-4 em função do avanço da idade, em células estimuladas com mitógenos (WITKOWSKI *et al.*, 1994; AOKI *et al.*, 1995), enquanto outros estudos descreveram a ocorrência de redução na síntese de IL-4 com o envelhecimento (DORIA & FRASCA, 1980 e FRASCA *et al.* 1994).

Os dados aqui obtidos, referentes às dosagens de IL-10 e IL-4, mostraram que esplenócitos de animais naïve apresentam um padrão de secreção semelhante para as duas citocinas, isto é, os níveis dessas citocinas foram mais baixos nos animais mais jovens, aumentando com o avanço da idade, até um valor máximo alcançado no grupo etário adulto jovem (16, 24 e 32 semanas) e declinando nos animais mais velhos (48 e 72 semanas de idade). Nos ensaios para IL-4, os sobrenadantes de cultura de células obtidas de animais de 32 semanas de idade apresentaram os valores máximos de secreção dessa citocina. Os ensaios para IL-10, entretanto, apresentaram uma certa variação, com o grupo de animais de 40 semanas apresentando os maiores níveis da interleucina. Em seguida, ocorreu um decréscimo dos níveis dessas citocinas com o aumento da idade dos animais estudados.

Nos sobrenadantes das culturas de esplenócitos obtidos dos animais dos grupos experimentais (tratados com o imunógeno emulsionado em ACF ou apenas com o adjuvante) foi observado um aumento significativo na secreção de IL-4 e de IL-10,

quando as células foram coletadas 14 dias após os tratamentos, se comparadas aos resultados obtidos com as células de animais naïve, principalmente quando as células eram provenientes de animais jovens (2, 4, e 8 semanas de idade). Com o decorrer do tempo após a administração do antígeno, ou seja, nos ensaios realizados 28 e 60 dias após os tratamentos, os níveis dessas citocinas mostraram uma tendência ao decréscimo, que foi mais acentuado no grupo de animais jovens. A produção de IL-10 foi mais marcadamente afetada pelos tratamentos (imunização ou administração de adjuvante) do que a da IL-4, tendo-se detectado aumentos na sua produção da ordem de 2 a 4 vezes se comparado aos resultados obtidos no grupo naïve.

O desafio antigênico realizado 30 dias depois da primeira dose do imunógeno, não alterou significativamente a produção de IL-4 nos diferentes grupos etários estudados. Apenas os animais mais velhos tiveram uma produção ligeiramente aumentada, mas significativa, de IL-10 após o desafio, quando comparados aos animais imunizados e que não receberam o *booster*.

O conjunto de resultados obtidos, particularmente os encontrados nas culturas de células coletadas 14 dias após o início dos procedimentos de imunização, mostram que os tratamentos empregados propiciaram um aumento de produção das citocinas do tipo TH₂ (IL-4 e IL-10) em praticamente todos os grupos etários estudados, mas principalmente nos grupos mais jovens. No decorrer do tempo após os tratamentos, os níveis dessas citocinas se mantiveram mais elevados, ou melhor, foram menos reduzidos, nos animais mais velhos.

Quando se analisa o conjunto dos resultados de produção de citocinas versus a produção de anticorpos nos animais imunizados, verifica-se uma aparente contradição. Enquanto as citocinas do tipo TH₂, consideradas mais relevantes para a indução de uma

resposta mediada por anticorpos, ocorreram em níveis mais elevados nos animais jovens e idosos, após o tratamento com o imunógeno/ACF, esses grupos etários apresentaram um desempenho mais baixo quanto a produção de anticorpos específicos. Por outro lado, a produção de citocinas do tipo TH1 (IFN- γ e IL-2), ditas responsáveis por respostas do tipo inflamatórias, após os tratamentos com o imunógeno, foi mais elevada nos grupos de animais que apresentaram o melhor desempenho quanto a produção de anticorpos, isto é os grupos de animais adultos jovens. É possível, no entanto, que o balanço entre as citocinas liberadas por esses dois conjuntos de células T auxiliares tenha sido de tal ordem a favorecer uma resposta humoral para o antígeno e via de imunização empregados. Infelizmente, o isotipo predominante nas respostas humorais montadas por esses animais não foi determinado mas, é provável pelos resultados obtidos que venha a ser a IgG1, particularmente aumentada nas respostas dirigidas pelas células TH₁.

Trabalhos anteriores mostraram que as alterações nas populações de células T esplênicas podem ser descritas como uma consequência da involução tímica e consistir de um gradual declínio no número de células, com um aumento na relação CD4⁺/CD8⁺, devido ao relativo decréscimo no número de células CD8⁺ (DORIA *et al.*, 1996). Os resultados por nós encontrados corroboram apenas parcialmente com os achados desses autores. Com relação a ambas as populações de linfócitos T, CD4⁺ e CD8⁺, observou-se um gradual aumento nos seus números percentuais com o avanço da idade, tendo os valores máximos sido alcançados ao redor da 8ª semana de vida, com poucas alterações subsequentes. No entanto, essas alterações foram suficientes para mudar a razão CD4/CD8, que se elevou gradativamente ao longo do envelhecimento do animal.

Estudos em humanos (Ruiz et al., 1995) mostraram que as subpopulações de células T CD4⁺ não apresentam variações em porcentagens, quando são comparados indivíduos adultos e idosos. Entretanto, estudos pontuais como esses não mostram claramente o fenômeno. Por outro lado, esses autores mostraram que as células TCD8⁺, intimamente relacionadas com a defesa contra infecções virais, sofre variações no número e na densidade de moléculas CD8 de superfície. Com relação às células TCD8⁺, também observamos um aumento gradativo no número dessas células com o envelhecimento dos animais. Nesse sentido, mais uma vez, encontramos resultados que se contrapõem às conclusões da literatura sobre o envelhecimento e a menor capacidade de indivíduos velhos em montar uma resposta imune adequada e a relação desse fenômeno com os elementos do sistema imunológico.

Assim, o conjunto dos nossos resultados mostram que durante o “envelhecimento”, o sistema imune do animal experimental sofre alterações que resultam numa resposta diferenciada daquela que ele era capaz de montar quando jovem mas, que não significam, necessariamente, que seja insuficiente para a manutenção de sua homeostase.

VI – CONCLUSÃO

Os dados obtidos mostraram que o envelhecimento traz alterações significativas na resposta imunológica, afetando de forma considerável as populações linfocitárias

1. Um decréscimo na produção de anticorpos dirigidos aos antígenos TNP e BSA pode ser observada com o avanço da idade, tanto quando se analisou a resposta de animais de diferentes grupos etários quanto dentro do mesmo grupo, em função do tempo de experimentação.
2. Os esplenócitos obtidos de animais naïve responderam de forma homogênea à Con-A, independentemente do grupo etário estudado. Ao contrário, a capacidade proliferativa de esplenócitos obtidos de animais imunizados ou tratados apenas com o Adjuvante foi mais reduzida em animais velhos. Esses dados indicam que as respostas proliferativas diferenciadas de animais jovens e velhos parecem depender da capacidade dos esplenócitos desses animais em produzir citocinas após a sua exposição ao adjuvante.
3. A liberação de citocinas do tipo Thelper 1 (IL-2 e IFN- γ) decresceu com o avanço da idade em esplenócitos obtidos tanto de animais naïve como de animais tratados. Da mesma forma, a secreção das citocinas liberadas por células TH2 (IL-4 e IL-10) obtidas de animais naïve ou coletadas no início da imunização decresceu com o avanço da idade. Entretanto, quando os esplenócitos foram coletados de animais imunizados ou que receberam apenas o adjuvante numa fase mais tardia dos tratamentos foi possível

observar um aumento da liberação de citocinas do tipo Thelper 2 nas células dos animais dos grupos etários mais velhos .

4. As células T esplênicas que expressam os marcadores CD3+/CD4+ aumentam em termos percentuais com o avanço da idade. Ao contrário, as células T CD3+/CD8+ mostram uma flutuação em termos percentuais ao longo da vida dos animais. Entretanto, a razão TCD4/CD8 aumenta com o avanço da idade.

- O conjunto de resultados obtidos no presente trabalho confirma alguns dados da literatura, principalmente os que reportam a redução gradativa da resposta imune de camundongos, em função do envelhecimento, no que se refere à produção de anticorpos e à capacidade proliferativa de células T. Da mesma forma, nossos dados confirmam alguns relatos sobre as alterações no perfil de citocinas produzidas por linfócitos Thelper, bem como aqueles que relatam o aumento dos percentuais de linfócitos TCD4+ em relação ao de linfócitos TCD8+.

Um dos fenômenos mais críticos no envelhecimento imunológico parece ser as alterações nas subpopulações de linfócitos T. Com o objetivo de realizar um estudo sistemático sobre o envelhecimento do sistema imune, camundongos BALB/c foram empregados em diferentes etapas de seu desenvolvimento pós-natal. A resposta imune de animais de diferentes faixas etária foi medida por: 1) produção de anticorpos dirigidos a antígenos simples (TNP) e complexo (BSA); 2) capacidade proliferativa de linfócitos T frente a Con-A, e 3) níveis de citocinas produzidas por células esplênicas de animais naïve ou imunizados e 4) perfil de subpopulações de células T $CD4^+$ e $TCD8^+$. Para esses estudos, os animais foram imunizados com TNP-BSA emulsionado em ACF 50%, de acordo com esquema de uma ou de duas doses do antígeno. Os níveis de anticorpos contra TNP e contra BSA foram medidos nos soros colhidos periodicamente. Para os estudos da capacidade proliferativa e de produção de citocinas por células T, grupos de camundongos imunizados e controles, foram sacrificados 14, 28 e 60 dias após o início da imunização e os esplenócitos desses animais foram colocados em cultura na presença de Con-A. A proliferação foi acompanhada empregando-se o corante MTT para revelar a multiplicação celular e os sobrenadantes coletados foram utilizados para dosagem de citocinas. As subpopulações de células T foi analisada em citômetro de fluxo a partir de uma preparação de esplenócitos obtidos de camundongos naïve, marcados com anticorpos anti $CD3^+$ ligado à ficoeritrina e $CD4^+$ ou $CD8$ ligado à fluoresceína. A resposta para os antígenos TNP, BSA e OVA apresentou redução relacionada com a idade, tanto quando comparamos animais de diferentes grupos etários quanto na análise do mesmo grupo em função do tempo de experimentação. Isso mostra que a resposta de anticorpos específicos decai com o

avanço da idade. Animais de idade mais avançada apresentaram uma reduzida resposta à Con-A quando esta é utilizada em cultura de esplenócitos obtidos de animais de diferentes faixas etárias, tanto em animais naïve quanto em animais imunizados com antígeno ou apenas adjuvante. Dessa forma, conclui-se que a idade interfere na resposta proliferativa de linfócitos. As citocinas relacionadas com as subpopulações T helper1 parecem obedecer um padrão de secreção que decresce com o avanço da idade e também se apresentaram reduzida nas idades iniciais. Já o padrão de secreção das citocinas relacionadas com células TH₂ parecem sofrer uma ação inversa, sendo que apresentaram um acréscimo com o avanço da idade dos animais. Pode-se concluir que a resposta de células T ligada a célula decresce, enquanto a resposta de células T ligada a anticorpos aumenta. Os estudos das subpopulações de células T CD3⁺CD4⁺ e T CD3⁺CD8⁺ mostraram que a razão TCD4/CD8 decresce com a idade. As proporções isoladas dessas subpopulações celulares também apresentaram certo decréscimo em termos de porcentagem, mostrando um comprometimento das células T com o avanço da idade.

- ABRAMS, J.S.; RONCAROLO, M.-G.; YSSEL, H.; ANDERSSON, U.; GLEICH, G.J. and SILVER, J.E. Strategies of Anti-Cytokine Monoclonal Antibody Development: Immunoassay of IL-10 and IL-5 in Clinical Samples. *Immunological Reviews*, **127**: 5-24. 1992.
- ADLER, W.; TAKIGUCHI, T. and SMITH, T. Effect of age upon primary alloantigen recognition by mouse spleen cells *Journal Immunology*, **107**, 1357-1362. 1971.
- ALBRIGHT, J.W. and ALBRIGHT, J.F. Ageing alters the competence of the immune system to control parasitic infection *Immunology Letters*, **40**: 279-285. 1994.
- AOKI, K.; ASANO, K.; OKAMOTO, K.; YOSHIDA, T. and KUROIWA, Y. Age-related changes in Con-A-induced cytokine production by splenocytes from senescence accelerated mice SAMP8 *Immunology Letters*, **46**: 169-175. 1995.
- BALKWILL, F.R. Cytokines: A practical approach, Oxford University Press, NY, 1991.
- BARNETT, Y.A. and KING, C.M. An investigation of antioxidant status, DNA repair capacity and mutation as a function of the age in humans. *Mutation Research*, **338**: 115-128. 1995.
- BECKER, M.J.; FARKAS, R.; SCHNEIDER, M.; DRUCKER, I. and KLAJMAN, A. Cell-mediated cytotoxicity in humans: age-related decline as measured by xenogeneic assay *Clinical Immunology and Immunopathology*, **14**: 204-210. 1979.

- BEN-YEHUDA, A. SZABO, P. and WEKSLER, M.E. Age-associated in the B-cell repertoire: effect of age on RAG-1 gene expression in murine bone marrow
Immunology Letters, **40**: 287-289. 1994.
- BORGHESI, C. and NICOLETTI, C. In vivo and in vitro study of the primary and secondary antibody response to a bacterial antigen in aged mice. *International Journal of Experimental Pathology*, **76(6)**: 419-424. 1995.
- BORN, J.; UTHGENANT, D.; DODT, C.; NÜNNINGHOFF, D.; RINGVOLT, E.; WAGNER, T. and FEHM, H-L. Cytokine production and lymphocyte subpopulation in aged humans. An assessment during nocturnal sleep. *Mechanisms of Ageing and Development*, **84**: 113-126. 1995.
- CAKMAN, I.; ROHWER, J.; SCHUETZ, R. M.; KIRCHNER, H. and RINK, L. Dysregulation between TH₁ and TH₂ T cell subpopulations in the elderly. *Mechanisms of Ageing and Development*, **87(3)**: 197-209. 1996.
- CALLAHAN, J.E.; KAPPLER, J.W. and MARRACK, P. Unexpected expansions of CD8-bearing cells in old mice. *The Journal of Immunology*, **151**: 6657-6669. 1993.
- CALLARD, R.E. and BASTEN, A. Immune function in aged mice. IV. Loss of T cell function in thymus-dependent antibody responses. *European Journal of Immunology*, **8**: 552-558. 1978.
- CALLARD, R.E.; BASTEN, A. and WALTERS, L.K. Immune function in aged mice. II. B-cell function. *Cellular Immunology*, **31**: 26-36. 1977.

- CARVALHO, C.R.; VERDOLIN, B.A; SOUZA, A.V. and VAZ, N.M. Indirect effects of oral tolerance in mice. *Scandinavian Journal of Immunology* , **39**:553-558. 1994.
- CHILSON, O.P. and KELLY-CHILSON, R.D. Mitogenic lectins bind to the antigen receptor on human lymphocytes. *European Journal of Immunology*, **19**: 389-396. 1989.
- CINADER, B. Polymorphism, Compartmentalization and Environmental Impact. *Immunology Letters*, **40**: 213-217. 1994.
- COSSARIZZA, A.; ORTOLANI, C.; PAGANELLI, R.; BARBIERI, D.; MONTI, D.; SANSONI, P.; FAGIOLO, U.; CASTELLANI, G.; BERSANI, F.; LONDEI, M. and FRANCESCHI, C. CD45 isoforms expression on CD4⁺ and CD8⁺ T cells throughout life, from newborns to centenarians: implications for T cell memory. *Mechanisms of Ageing and Development*, **86**: 173-195. 1996.
- DEAN, K. Greeting knowledge relevant for public health applications in immunology and aging. *Mechanisms of Aging and Development* **94**: 251-262. 1997.
- DORIA, G and FRASCA, D. Ageing and genetic control of immune responsiveness. *Immunology Letters*, **40**: 231-233. 1994.
- DORIA, G.; D'AGOSTARO, G. and PORETTI, A. Age-dependent variations of antibody avidity. *Immunology*, **35**: 601-611. 1978.
- EKONG, T.; KUPEK, E.; HILL, A.; CLARK, C.; DAVIES, A. and PINCHING, A. Technical influences on immunophenotyping by flow cytometry. The effect of time and temperature of storage on the viability of lymphocyte subsets. *Journal of Immunological Methods*, **164**:263-273. 1993.

- EY, P.L.; PROWSE, S.J. and JENKIN, C.R. Isolation of pure IgG, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein-A Sepharose *Immunochemistry*, **15**: 429-436. 1978.
- EYLAR-E-H; MOLINA-F; QUINONES-C; ZAPATA-M. and KESSLER-M. Aging: Deficient mitogenic response of old rhesus monkey T cells. *Aging Immunology and Infectious Disease* **1**(4): 219-226. 1988.
- FRASCA, D.; GUIDI, L.; BARTOLINI, C.; TRICERRI, A.; VANGELI, M.; ANTICO, L.; CARBONIN, P.U.; ERRANI, A. and DORIA, G. Age-related modulation of cytokine production, Il-2R expression and function in a population of healthy subjects (22 to 97 years). *Aging Immunology and Infectious Disease*, **5**(1) : 3-12. 1994.
- FUJIWARA, M. and KISHIMOTO, S. IgE antibody formation and aging. I. Age-related changes in IgE antibody formation and avidity for the DNP-determinant in mice. *The Journal of Immunology*, **123**: 263-268. 1979.
- FÜLOP JR., T. Signal transduction changes in granulocytes and lymphocytes with ageing. *Immunology Letters*, **34**: 259-268. 1994.
- GLOBERSON, A. Thymocyte Progenitors in Ageing *Immunology Letters*, **40**: 219-224. 1994.
- GOONEWARDENE, M and MURASKO, D.M. Age-associated changes in mitogen-induced lymphoproliferation and lymphokine production in the long-lived brown-Norway rat: effect of caloric restriction. *Mechanisms of Ageing and Development*, **83**: 103-116. 1995.

- GOULLET, P. and KAUFMANN, H. Ageing and antibody production in the rat. *Experientia*, **21**: 46-47. 1965.
- HAENEY, M. Infection determinants at extreme of age. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **34**: 1-9. 1994.
- HAGGENESS, M.H. and ASH, J.F. Use of the Avidin-Biotin complex for the localization of actin and myosin with fluorescence microscopy. *Journal of Cellular Biology*, **73**: 783-788. 1977.
- HALLGREN, H.M.; BUCKLEY III, C.E.; GILBERTSEN, V.A. and YUNIS, E.J. Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and autoantibodies aging humans *The Journal of Immunology*, **111**: 1101-1107. 1973.
- HARTREE, E. F. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, **48**: 422-427. 1972.
- HIROKAWA, K.; UTSUYAMA, M.; KASAI, M.; KURASHIMA, C.; ISHIJIMA, S. and ZENG, Y-X. Understanding the mechanism of the age-change of thymic function to promote T cell differentiation. *Immunology Letters*, **40**: 269-277. 1994.
- JOHNSTONE, A. and THORPE, R. *Immunochemistry in practice*, second edition. Blackwell Scientific Publishers, Oxford, UK. 1987.
- KIRMAN, I; ZHAO, K; TSCHEPEN, I.; SZABO, P.; RICHTER, G.; NGUYEN, H. and WEKSLER, M.E. Treatment of old mice with IL-2 corrects dysregulated IL-2, and IL-4 production. *International Immunology*, **8** (7); 1009-1015. 1996.

- KISHIMOTO, S.; TAKAHAMA, T. and MIZUMACHI, H. *In vitro* immune response to the 2,4,6-trinitrophenyl determinant in aged C57Bl/6J mice: changes in the humoral immune response to, avidity for the TNP determinant and responsiveness to LPS affect with aging. *The Journal of Immunology*, **116**(2): 294-300. 1976.
- KNIGHT, S.C. Lymphocyte proliferation assays. In: Lymphocytes, a practical approach. IRL Press. Washington DC, USA. 1987.
- KONEN, T.G.; SMITH, G.S. and WALFORD, R.L. Decline in mixed lymphocyte reactivity of spleen cells from aged mice of a long-lived strain. *The Journal of Immunology*, **110**: 1216-1221. 1973.
- LI, S.P.; VERMA, S. and MILLER, R.A. Age-related defects in the T cell expression of CD40 ligand and induction of in vitro B cell activation. *Aging Immunology and Infectious Disease*, **6**(2):79-93. 1995
- LITTLE, J. R. and EISEN, H. N. Preparation and characterization of antibodies specific for the 2,4,6-trinitrophenyl group. *Biochemistry*, **5**(11):3385-3395. 1966.
- MAKINODAN, T. and KAY, M.M.B. Age influence on the immune system. *Advances in Immunology*, **29**: 287-330. 1980.
- MAKINODAN, T. and YUNIS, E. Immunology and Aging In: GOOD, R. A. and DAY, S.B. *Comprehensive Immunology*. Plenum Publishing Corporation. NY. p.1-70. 1977
- MANSOUR, I.; BOURIN, P. ROUGER, P. and DONIEL, C. A rapid technique for lymphocyte preparation prior to two-color immunofluorescence analysis of

- lymphocyte subsets using flow cytometry. Comparison with density gradient separation. *Journal of Immunological Methods*, **127**: 61-70. 1990.
- MATSIOTA-BERNARD, P.; GUETARD, D.; RAME, V.; MONTAGNIER, L. and AVRASMEAS, S. Inhibition of *in vitro* HIV infection by trinitrophenyl-protein conjugates. *Research Immunology* **146**:109-117. 1995.
- MORTON, J.I. and SIEGEL, B.V. Secondary antibody response of overtly autoimmune NZB mice. *Immunology*, **16**:481-484. 1969.
- MOSMANN, T. R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, **65**:55-63. 1983.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A. and COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted protein. *The Journal of Immunology*, **136**:2348-2357, 1986.
- MOSMANN, T.R. and COFFMAN, R.L. Two types of mouse helper T-cell clone. *Immunology Today*, **8**:223-227, 1987.
- NAKANE, P and KAWAIOI, A. Peroxidase-labeled antibody. A new method of conjugation. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*. **22**: 1084-1091. 1974.
- NAOR, D.; BONAVIDA, B. and WALFORD, R.L. Autoimmunity and aging: the age-related response of mice of a long-lived strain to trinitrophenylated syngeneic mouse red blood cells. *The Journal of Immunology*, **117**: 2204-2208. 1976.

- NUÑEZ, C.; NISHIMOTO, N.; GARTLAND, L.; BILLIPS, L.G.; BURROS, P.D.; KUBAGAWA, H. and COOPER, M.D. B cells are generated throughout life in humans. *The Journal of Immunology*, **156**: 866-872. 1996.
- PAHLAVANI, M. A. and RICHARDSON, A. The effect of age on the expression of Interleukin-2. *Mechanisms of Ageing and Development*, **89**: 125-154. 1996.
- PAWELEC, G.; ADIBZADEH, M.; POHLA, H. and SCHAUDT, K. Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunology Today*, **16**(9): 420-422. 1995.
- PRICE, G.B. and MAKINODAN, T. Immunologic deficiencies in senescence. I. Characterization of intrinsic deficiencies. *The Journal of Immunology*, **108**: 403-412. 1976-A.
- PRICE, G.B. and MAKINODAN, T. Immunologic deficiencies in senescence. II. Characterization of extrinsic deficiencies. *The Journal of Immunology*, **108**: 413-417. 1976-B
- ROSE, N.R. Thymus function, ageing and autoimmunity. *Immunology Letters*, **40**: 225-230. 1994.
- ROWLEY, M.R., BUCHAMAN, H. and MACKAY, I.R. Reciprocal change with age in antibody to extrinsic and intrinsic antigens. *The Lancet*, **2**: 24-26. 1968.
- SEGRE, D. and SEGRE, M. Humoral immunity in aged mice. II. Increased suppressor T cell activity in immunologically deficient old mice *The Journal of Immunology*, **116**: 735-738. 1976-B.

- SEGRE, M. and SEGRE, D. Humoral immunity in aged mice. I. Age-related decline in the secondary response to DNP of spleen cells propagated in diffusion chambers. *The Journal of Immunology*, **116**:731-734. 84. 1976-A
- SHARP, A., BRILL, S., KUKULANSKY, T. and GLOBERSON, A. Physiological senescence and its postponement. Theoretical approaches and rational interventions. The Second Stromboli Conference on Aging and Cancer. *Annals New York Academy of Science*, **621**: 251-269. 1991.
- SHARP, A.; KUKULANSKY, T. and GLOBESON, A. *In vitro* analysis of age-related changes in the developmental potential of bone marrow thymocyte progenitors. *European Journal of Immunology*, **20**: 2541-2546. 1990.
- STUTMAN, O. Lymphocyte subpopulations in NZB mice: deficit of thymus-dependent lymphocytes. *The Journal of Immunology*, **109**: 602-611. 1972.
- THOMAN, M.L. The pattern of T lymphocyte differentiation is altered during thymic involution. *Mechanisms of Ageing and Development*, **82**: 155-170. 1995.
- TOICHI, E., HANADA, K., HOSOKAWA, T., HIGUCHI, K. HOSOKAWA, M. IMAMURA, S. and HOSONO, M. Age-related decline in humoral immunity caused by the selective loss of T_H cells and decline in cellular immunity caused by the impaired migration of inflammatory cells without a loss of T_{DTH} cells in SAMP1 mice. *Mechanisms of Ageing and Development*, **99**: 199-217. 1997.
- TU, K-Y, MATTHEWS, R. and MATTHEWS, K.S. Human lymphocytes incubed in vitro share multiple characteristics with geriatric-derived lymphocytes: a potential in vitro model for aging? *Mechanisms of Ageing and Development*, **82**:105-128. 1995.

WESJER, M.E. and HÜTTEROTH, T.H. Impaired lymphocyte function in aged humans. *The Journal of Clinical Investigation*, **53**: 99-104. 1974.

WITKOWSKI, J.M.; LI, S.P.; GORGAS, G. and MILLER, R.A. Extrusion of the P glycoprotein substrate rhodamine-123 distinguishes CD4 memory T cell subsets that differ in IL-2 driven IL-4 production. *The Journal of Immunology*, **153**(2):658-665. 1994.