PEDRO HENRIQUE PAPOTTO ROSA

**Avaliação da eficiência do antagonista seletivo de CD28, mPEG PV1-Fab', no tratamento da
uveíte autoimune experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

Pedro Henrique Papotto Rosa

**Avaliação da eficiência do antagonista seletivo de CD28, mPEG PV1-Fab', no tratamento da
uveíte autoimune experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção de Título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Dr. Luiz Vicente Rizzo

Versão original

São Paulo
2014

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Rosa, Pedro Henrique Papotto.

Avaliação da eficiência do antagonista seletivo de CD28, mPEG
PV1-Fab', no tratamento da uveíte autoimune experimental / Pedro
Henrique Papotto Rosa. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Imunologia. Área de
concentração: Imunologia. Linha de pesquisa: Autoimunidade.

Versão do título para o inglês: Efficacy of murine selective CD28
antagonist for the treatment of experimental autoimmune uveitis.

1. Uveíte 2. EAU 3. CD28 4. Bloqueio co-estimulatório 5. IFN-
gamma 6. Th 1 I. Rizzo, Prof. Dr. Luiz Vicente II. Universidade de
São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-
Graduação em Imunologia III. Título.

ICB/SBIB0187/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Pedro Henrique Papotto Rosa.

Título da Dissertação: Avaliação da eficiência do antagonista seletivo de CD28, mPEG PV1-Fab', no tratamento da uveíte autoimune experimental.

Orientador(a): Prof. Dr. Luiz Vicente Rizzo.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

(☐) **Aprovado(a)**

(☐) **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 55 nas fls. 19 do livro 03 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Luiz Vicente Rizzo**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Avaliação da Eficácia do antagonista seletivo de CD28 mPEG PV1-Fab' no tratamento da Uveíte Experimental Autoimune*" do qual participam o(s) aluno(s) **Pedro Henrique Papotto Rosa, Luiz Roberto Sardinha, Eliana Blini Marengo**, e a Colaboradora **Anna Carla Goldberg**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em **25.06.2014**, com validade de 4 anos.

São Paulo, 26 de junho de 2014.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA
Coordenador-CEUA- ICB/USP

Prof. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Àqueles que acreditam e enxergam além.

AGRADECIMENTOS

(ou do nascimento do pensamento científico)

“One of the distinguishing marks of modern science is the disappearance of sectarian loyalties. Isolationism is over; we all depend upon and sustain each other.”

Peter B. Medawar

Acredito que as bases do pensamento científico sejam genéticas. Algumas crianças nascem com uma curiosidade intrínseca, que, ao longo de seu desenvolvimento, as faz querer saber e entender mais sobre o mundo que as cerca. Ao longo dos anos, essa curiosidade toma a forma de questionamentos infundáveis. Porém, por muitas vezes, uma sequência implacável de “porque sim.” e “porque não.” acaba aplacando aquela urgência infantil de querer compreender os mais variados mistérios que podem atormentar a vida de uma pequena pessoa de cinco anos. Para essas crianças, quando crescerem, os mistérios da vida continuarão sendo as coisas invisíveis, e as visíveis nada mais serão do que aquilo que aparentam. Por outro lado, algumas crianças mais afortunadas – na minha humilde opinião – são encorajadas a seguir perguntando. Com sorte, durante as etapas básicas de sua educação, entrarão em contato com professores (e, apesar de não caber, abro um parêntese e deixo aqui meus agradecimentos àqueles que não tiveram nenhuma participação na elaboração dessa dissertação de Mestrado, mas sem os quais, tenho certeza que ela não existiria.) que começarão a direcionar sua curiosidade e apresentar palavras como: “problema”, “pergunta” e “hipótese”. Palavras estas, que se tornarão parte do dia-a-dia desses perguntadores, caso acabem optando por transformar aquela curiosidade em pós-graduação (e quem sabe, profissão). E após tantos anos de gestação e amadurecimento, podemos ver o nascimento do pensamento científico.

Sou filho de um casamento de ideias nada convencionais. Graças aos meus pais científicos, (Luiz Vicente) Rizzo e Eli(ana Blini Marengo), acredito que tenha aprendido a identificar problemas, elaborar perguntas e formular hipóteses. Tudo isso, seguindo uma criação pouco usual. Fui encorajado a tentar, a experimentar e a errar. Fui ensinado a ser livre nas minhas ideias. Mas, que liberdade não se confunda com abandono. Não “cresci naturalmente, como crescem as magnólias e os gatos”. Sempre tive a presença de ambos muito forte em minha formação. Ela, sendo uma mãe no sentido mais completo da palavra: me ensinando tarefas simples do dia-a-dia; me encorajando em meus questionamentos;

ouvindo meus medos e frustrações; me mostrando onde estavam o formaldeído, as placas de fundo chato ou as seringas de vidro (que raramente estavam a mais de um palmo abaixo de meu nariz); e tendo um orgulho genuíno das minhas façanhas mais triviais. Sem ela, não sei o que teria sido de mim. Ele, como um bom pai, foi (ainda é, e acredito que sempre vai ser) um modelo. Em inúmeras discussões, fui ensinado não só sobre ciência, mas também sobre política, futebol, *blues* e sobre a vida. E apesar de em determinado momento ter ouvido que sou “inorientável” (em tom de brincadeira, já adianto), aprendi mais com ele do que com qualquer outra pessoa. E só lamento não ter aprendido mais.

Logicamente, o desenvolvimento da minha forma de pensar em ciência não se deve apenas às duas figuras citadas anteriormente. Seguindo a lógica da família científica, eu tive irmãos. Uma porção deles. Alguns mais novos, alguns mais velhos. Uns de mesmo pai, uns de pai diferente. Mas o fato é que todos deixaram suas impressões no meu modo de pensar. E deixo aqui registrado meus agradecimentos especiais àqueles que acompanharam a realização dessa dissertação e da minha formação por mais tempo: ao meu irmão mais velho Ivo (Marguti), que, seguindo os maiores clichês de uma família modelo, passou um bom tempo brigando e discutindo comigo, para hoje ser um grande amigo e confidente. Graças a sua sinceridade crua e inexorável, recebi os melhores conselhos que alguém poderia me dar, além de ter tido ferrenhas discussões científicas sobre a importância da IL-12, do controle isotópico e sobre o que é a ciência; ao meu outro irmão mais velho, Luizão (Roberto Sardinha), que compartilhou comigo um gama variada de habilidades: das bases físicas da citometria de fluxo e de como se realizar uma boa punção cardíaca, à como se portar em um congresso da Sociedade Brasileira de Imunologia e de como se acender um churrasqueira em apenas 1s. Nesses quase cinco anos de convívio dividimos inúmeros copos, risadas e angústias; às minhas irmãs mais novas Carina (Jank) e Andressa (Borges), com quem eu dividi todas as dúvidas, problemas e frustrações que permeiam a formação do pensamento científico. Além de ter dividido bons momentos, fosse discutindo sobre o sistema imune, fosse rindo de nossos erros; à minha irmã gêmea desgarrada Lílian (Cristina Buzzetto) que por muito tempo me desafiou com trívias imunológicas e elucubrou comigo as mais importantes quebras de paradigma da imunologia de bar. Agradeço também às minhas novas irmãs mais novas, com quem, infelizmente, não tive muito tempo de convívio, mas que já me enchem de orgulho: Ana Eduarda (Zulim), Sheyla (Castillo-Mendez), Gi(ovana Alonso) e Deise (Fialho).

Completando essa grande família, não posso esquecer da Karina (de Carvalho Salmazi). E qual o papel dela nisso tudo? Acredito que ela há de concordar que “madrasta” é a melhor opção. Não por ser má, igual às histórias infantis – talvez um pouco, quem sabe. Mas sim por ter me encontrado meio criado, meio rebelde e mesmo assim ter conseguido fazer uma enorme diferença na minha formação. Me tirou da minha zona de conforto, me desafiou, e extraiu o melhor de mim! Tudo isso, com pouca paciência e muito café. Tenho bastante certeza que por muitos anos ainda a terei apontando meus erros, exigindo perfeição e ouvindo minhas reclamações. Além de seu papel direto, agradeço a Karina por ter me trazido um meio irmão – ou meio-hermano, para ser mais correto – para dividir a bancada comigo. Apesar do pouco tempo de convivência, as conversas que tive com o Santi(ago Andrés Vilela) me fizeram enxergar problemas do meu cotidiano imunológico de perspectivas diferentes e pouco usuais.

Devo o amadurecimento de meu pensamento científico, também, àqueles com quem não convivi no dia-a-dia do laboratório, mas com quem pude conviver graças a um interesse mútuo pela ciência e imunologia. Dentre essas muitas pessoas, cito professores, a quem hoje considero amigos: (Prof.) Anderson (de Sá Nunes), (Prof.) Jean (Pierre Perón), (Prof.) Niels (Saraiva Câmara), (Prof.) Ana (Lepique), e a Prof. (Maria) Regina (D’Império Lima); e os amigos do programa de Pós-Graduação em Imunologia que ao longo do mestrado foram também meus professores. Agradeço em especial à Bianca (Balbino), que apesar de não ter feito nenhum experimento com o modelo de uveíte autoimune experimental, conhece meus gráficos melhor do que qualquer um. Que – talvez só pra não me deixar triste – via meus dados com o mesmo entusiasmo que eu. Com ela compartilhei alegrias, hipóteses, taças de vinho e decepções. E, por muitas vezes, o seu silêncio trouxe a calma a uma alma atormentada por linfócitos T, anticorpos e inflamação. Sem ela tenho certeza que, invariavelmente, teria terminado essa dissertação e construído meu pensamento com as inúmeras influências citadas anteriormente. Com ela achei o equilíbrio para concluir todo esse processo e querer continuar. Ela trouxe ordem ao caos.

Durante o período do mestrado, tive a possibilidade de me dedicar à minha formação da maneira mais intensa possível por ter tido pessoas que me ampararam nas mais diversas questões. Agradeço à (Dra.) Anna Carla (Goldberg), que ao longo dos anos me ajudou a construir as melhores oportunidades e a poder abraçá-las sem maiores preocupações. Durante esse tempo de “sociedade” – como ela mesmo diz – ela me garantiu boas

discussões e orientações, e por isso sou grato. Agradeço também, a toda equipe do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa, em especial à So(ely Moura), a Ju(ssara Santana) e a Martinha (Diniz), e a toda equipe do Centro de Experimentação e Treinamento em Cirurgia. Ao longo dos meus anos de Centro de Pesquisa Experimental dividi as bancadas dessa *core-facility* com um número imenso de pessoas – tão diferentes umas das outras quanto se possa ser – e sei que muitas delas de alguma forma me influenciaram na minha maneira de pensar. Cito e agradeço, porém, duas que tiveram uma importância tremenda nesse tempo: a Flávia (Maziero Andreghetto) que sempre foi uma confidente e fonte de risadas; e o Thiago (Aloia), que se tornou um irmão de escolha.

Ainda, mas não menos importante, agradeço a minha família de sangue. Como dito nas primeiras linhas desses agradecimentos – que aparentemente se tornou uma crônica – eles cultivaram a curiosidade de uma criança em quem eles sempre acreditaram, e, por isso, tenho hoje a possibilidade de concluir essa dissertação. Por anos fui cercado, por eles, de muito carinho, livros, compreensão e oportunidades. E, além disso, me ofereceram feijão de vó, colo de mãe e almoços de domingo, coisas tão simples, mas que foram fundamentais para o meu equilíbrio durante esses últimos tempos.

Por fim, agradeço à Deus. Com todos os seus nomes, caras e cores. Real ou irreal. Não importa. Faz parte de mim e, portanto, parte da realidade do meu pensamento.

E assim termino meus agradecimentos, com a esperança de que eu nunca pare de aprender.

"We know now that societies are immensely complex systems involving a potentially enormous number of bifurcations [...]. We know that such systems are highly sensitive to fluctuations. This leads both to hope and a threat: hope, since even small fluctuations may grow and change the overall structure. As a result, individual activity is not doomed to insignificance. On the other hand, this is also a threat, since in our universe the security of stable, permanent rules seems gone forever."

Order out of Chaos: man's new dialogue with nature.

Ilya Prigogine e Isabelle Stengers

Este trabalho foi realizado no Centro de Pesquisa Experimental, do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa, do Hospital Israelita Albert Einstein, com auxílio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, processo número 2013/15448-7 (auxílio Modalidade Mestrado), e *Seventh Framework Programme* (FP7 – EC – *grant number: 281493 - TRIAD*).

RESUMO

Papotto PH. Avaliação da eficiência do antagonista seletivo de CD28, mPEG PV1-Fab', no tratamento da uveíte autoimune experimental. [dissertação (Mestrado em Imunologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A uveíte autoimune é uma doença inflamatória crônica, caracterizada pela exposição de antígenos oculares e desencadeamento da resposta imune. É mediada principalmente por linfócitos T CD4⁺ com perfil T_H1, e responsável por uma parcela significativa de casos de deficiências visuais e cegueira. Embora efetivos, os tratamentos disponíveis estão associados a efeitos adversos importantes devido à supressão generalizada do sistema imunológico. Assim, a investigação de moléculas que atuem na restauração de tolerância, geração de células T reguladoras ou que interfira nos mecanismos efetores da doença pode vir a ter papel terapêutico na uveíte. A molécula de CD28 é um dos possíveis candidatos para o tratamento de doenças autoimunes, pois é responsável pela transdução do sinal gerado após engajamento de linfócito T com as células apresentadoras de antígenos e age em sinergismo com o receptor de células T levando à ativação completa de células T *naïve*. Nesse trabalho foi avaliada a eficiência do antagonista seletivo de CD28, mPEG PV1-Fab' (PV1) no tratamento da uveíte experimental autoimune (EAU). Para tanto, foi avaliado o grau da doença em camundongos B10.RIII imunizados para EAU, tratados ou não com PV1, além das características das populações infiltrantes nos olhos e presentes na periferia desses camundongos, com enfoque no estado de ativação dessas células e no perfil de secreção de citocinas. O tratamento com PV1 diminuiu significativamente o grau médio e incidência de EAU, quando comparado com camundongos não-tratados. Este achado foi acompanhado de uma diminuição no perfil de ativação dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ infiltrando os olhos de camundongos tratados com PV1. Nos órgãos linfoides periféricos, o bloqueio de CD28 também levou a uma diminuição do estado de ativação de linfócitos T, com diminuição da expressão de diversas moléculas de superfície características de células T ativadas, como CD69, CD25 e PD-1. Além da diminuição da ativação dos linfócitos T, o tratamento com PV1 levou a uma diminuição na frequência e no número absoluto de células T reguladoras (T_{reg}), quando comparados com camundongos não-tratados. Mais ainda, mPEG PV1-Fab' também diminui a frequência de linfócitos T_{reg}, quando utilizado *in vitro*. A ação supressora do mPEG PV1-Fab' se mostrou direcionada a células do tipo T_H1, já que no grupo tratado com o antagonista de CD28, foram encontrados menores números e frequências de linfócitos T CD4⁺IFN-γ⁺, e T CD4⁺Tim-3⁺. Esse efeito também foi observado *in vitro*, já que após re-estímulo específico de células dos linfonodos drenantes de camundongos imunizados para EAU, PV1 levou a uma diminuição na frequência de linfócitos T CD4⁺IFN-γ⁺. Dessa forma, podemos concluir que o bloqueio de CD28 utilizado mPEG PV1-Fab' é eficaz no controle da EAU, e sua ação é baseada na supressão da resposta de linfócitos T_H1.

Palavras-chave: Uveíte. EAU. CD28. Bloqueio co-estimulatório. IFN-gamma. Th1.

ABSTRACT

Papotto PH. Efficacy of murine selective CD28 antagonist for the treatment of experimental autoimmune uveitis. [Masters thesis (Immunology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Autoimmune Uveitis is an important chronic inflammatory disease, which affects a significant percentile of human population. This organ-specific disorder is characterized by an immune response to ocular antigens, such as interphotoreceptor retinoid binding protein (IRBP), arrestin and recoverin, and subsequent damage of cellular layers of the eye. This autoimmune response is mainly mediated by polarized T CD4⁺ lymphocytes toward a T_H1 phenotype. Although many treatment strategies are available, most of them focus on general immunosuppression, resulting in undesirable side effects. Thus, the development of more specific therapies is the major aim in the field of immunotherapy. Costimulatory molecules play an important role on T cell activation and homeostasis; therefore it represents an interesting target in autoimmune disorders. In this work, we evaluated the efficacy of mPEG PV1-Fab' (PV1), a novel selective CD28 antagonist monovalent Fab fragment, in the treatment of Experimental Autoimmune Uveitis (EAU). Here, we showed that PV1 treatment decreases both average disease score and incidence of EAU. There was also a decrease in the activation profile of both T CD4⁺ and T CD8⁺ eye-infiltrating lymphocytes. In the periphery, T CD4⁺ cells from PV1-treated mice showed a reduction of their activation status, with decreased expression of CD69, CD25 and PD-1 molecules. Furthermore, PV1 treatment led to a decrease of both T_{reg} frequencies and total numbers in peripheral lymphoid organs, when compared to untreated group. This finding was also observed *in vitro* after stimulation of splenocytes of naïve mice with anti-CD3 and PV1. Regarding the effector functions of T lymphocytes, the frequency and absolute numbers of CD4⁺IFN-γ⁺ and CD4⁺Tim-3⁺ T cells was significant lower in PV1-treated group, when compared to its untreated counterpart. Moreover, PV1 also decreased the frequencies of CD4⁺IFN-γ⁺, *in vitro*, after restimulation of cells from draining lymph nodes of immunized mice. Altogether, our results raise this specific CD28 blockade strategy as a potential tool for the treatment of autoimmune disorders in the eye, and indicate that mPEG PV1-Fab' acts mainly on IFN-γ production and T_H1 polarization.

Keywords: Uveitis. EAU. CD28. Costimulatory blockade. IFN-gamma. Th1.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AAALAC – *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care*

AICD – morte celular induzida por ativação

APC – alofococianina

APC – célula apresentadora de antígeno

BD – Becton Dickison

BTLA – *B and T lymphocyte attenuator*

CBA – cytometric bead array

CD – *cluster of differentiation* - agrupamento de diferenciação

CETEC – Centro de Experimentação e Treinamento e em Cirurgia

CEUA-HIAE – Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Hospital Israelita Albert Einstein

CEUA-ICB-USP – Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

CFA – adjuvante Completo de Freund

CFSE – 5,6 ester succinimidil diacetato carboxifluoresceína

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CTLA-4 – antígeno 4 de linfócito T citotóxico

CTRL – controle

DC – célula dendrítica

dLN – linfonodos drenantes

EAE – encefalomielite autoimune experimental

EAU – uveíte autoimune experimental

ELISA – ensaio imunossorvente ligado à enzima

FACS – citometria de fluxo

FITC – isotiocianato de fluoresceína

FMO – *Fluorescence Minus One*

FoxP3 – *forkhead box factor P3*

GVHD – Doença do Enxerto *versus* Hospedeiro

H&E – hematoxilina-eosina

HLA – antígeno leucocitário humano

IFN- γ – interferon gama

IIEPAE – Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein

IL – interleucina

IRBP – proteína ligante de retinóide entre fotoreceptores

ITK – *IL-2-inducible Tec kinase*

MFI – intensidade de fluorescência média

mg/Kg – miligramas por quilograma

µg/mL – microgramas por mililitro

mRNA – ácido ribonucleico mensageiro

n – número

NE – não estimulado

ng/mL – nanogramas por mililitro

NHS – mPEG NHS-Fab'

NK – célula *natural killer*

NKT – célula T *natural killer*

OCP – Penfigóide Cicatricial Ocular

OVA – ovoalbumina

PBS – tampão fosfato-salina

PD-1 – *programmed cell death protein 1*

PE – ficoeritrina

PEG – polietilenoglicol

PE-Cy7 - ficoeritrina conjugado com cianina 7

PerCP-Cy 5.5 - peridina de clorofila combinada com cianina

pg/mL – picogramas por mililitro

PMA – acetato de forbol miristato

PTx – toxina de *Bordetella pertussis*

PV1 – mPEG PV1-Fab'

S-Ag – antígeno S

SFB – soro fetal bovino

SPF – condições livres de patógenos específicos

TCR – receptor de células T

TGF-β – fator transformador de crescimento β

T_H – linfócito T auxiliar

TNF- α – fator de necrose tumoral α

T_{CM} – linfócito T CD4⁺ de memória central

T_{eff} – linfócito T efetor

T_{EM} – linfócito T CD4⁺ de memória efetor

T_M – linfócito T CD8⁺ de memória

T_{reg} – célula T reguladora

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estratégia de análise de subpopulações leucocitárias e seus estados de ativação..	35
Figura 2. Estratégia de análise de expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórias em linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	36
Figura 3. Estratégia de análise da população de linfócitos T reguladores (T _{reg}).....	36
Figura 4. Análise multiparamétrica da produção de citocinas por linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	37
Figura 5. Análise multiparamétrica da expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórias por linfócitos T CD4 ⁺ e T CD8 ⁺	38
Figura 6. O tratamento com mPEG PV1-Fab' diminui o grau médio de EAU.....	41
Figura 7. O tratamento com mPEG PV1-Fab' diminui os sinais inflamatórios da EAU.....	42
Figura 8. Camundongos tratados com PV1 não apresentaram diferenças no infiltrado de linfócitos nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados.....	43
Figura 9. Camundongos tratados com PV1 não apresentaram diferenças nas subpopulações de leucócitos nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados.....	44
Figura 10. Camundongos tratados com PV1 apresentaram menores frequências de linfócitos T ativados nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados.....	45
Figura 11. Camundongos tratados com PV1 apresentaram menores frequências de linfócitos T ativados nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados.....	46
Figura 12. Expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórias por linfócitos T CD4 ⁺ nos olhos de camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'	47
Figura 13. Imunofenotipagem de leucócitos em linfonodos drenantes de camundongos tratados com PV1 ou não.....	48
Figura 14. Camundongos tratados com PV1 apresentaram menores frequências de linfócitos T ativados e maiores frequências de linfócitos T <i>naïve</i> em órgãos linfóides periféricos quando comparados com camundongos não tratados.....	49
Figura 15. Linfócitos T CD4 ⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos tratados com PV1 apresentaram menor expressão de moléculas de ativação e co-estimulação quando comparados com camundongos não tratados.....	50

Figura 16. Linfócitos T CD4 ⁺ no baço de camundongos tratados com PV1 apresentaram menor expressão de moléculas de ativação e co-estimulação quando comparados com camundongos não tratados.....	51
Figura 17. Expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórios por linfócitos T CD4 ⁺ nos dLN de camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'	52
Figura 18. Expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórios por linfócitos T CD4 ⁺ no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'	52
Figura 19. Linfócitos T CD8 ⁺ nos órgãos linfoides periféricos de camundongos tratados com PV1 apresentaram menor expressão de moléculas de ativação e co-estimulação quando comparados com camundongos não tratados.....	53
Figura 20. O tratamento com mPEG PV1-Fab' diminui a população de linfócitos T reguladores nos órgãos linfoides periféricos.....	55
Figura 21. O tratamento de esplenócitos de B10.RIII <i>naïve</i> com mPEG PV1-Fab', <i>in vitro</i> , leva a uma diminuição da população de linfócitos T _{reg}	56
Figura 22. mPEG PV1-Fab' diminui a produção de IFN-γ por linfócitos T CD4 ⁺ e a população de linfócitos T do tipo T _H 1.....	58
Figura 23. mPEG PV1-Fab' não afeta a produção de IFN-γ, IL-17 e IL-2 por linfócitos T CD8 ⁺	59
Figura 24. mPEG PV1-Fab' diminui a frequência de linfócitos T CD4 ⁺ IFN-γ ⁺ após re-estímulo, <i>in vitro</i> , de células dos dLN com peptídeo 161-180 da IRBP.....	60

SUMÁRIO

<u>1 INTRODUÇÃO</u>	21
1.1 UVEÍTE AUTOIMUNE	21
1.2 UVEÍTE AUTOIMUNE EXPERIMENTAL – EAU	24
1.3 CD28 E CO-ESTIMULAÇÃO	26
1.4 BLOQUEIO DE CD28 COMO ESTRATÉGIA IMUNOTERAPÊUTICA	27
<u>2 MATERIAIS E MÉTODOS</u>	30
2.1 CAMUNDONGOS	30
2.2 ANTÍGENOS E REAGENTES	30
2.3 INDUÇÃO DE EAU EM CAMUNDONGOS B10.RIII E TRATAMENTO COM ANTI-CD28	31
2.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS OLHOS	31
2.5 OBTENÇÃO DE CÉLULAS INFILTRANTES NOS OLHOS	32
2.6 OBTENÇÃO DE CÉLULAS DO BAÇO E LINFONODOS DRENANTES	33
2.7 IMUNOFENOTIPAGEM	33
2.8 ENSAIO PARA DETECÇÃO DE CITOCINAS INTRACELULARES POR CITOMETRIA DE FLUXO	34
2.9 ENSAIO DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS APÓS RE-ESTÍMULO COM PEPTÍDEO 161-180 DA IRBP	34
2.10 ANÁLISE DOS DADOS OBTIDOS POR CITOMETRIA DE FLUXO	35
2.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
<u>3 OBJETIVOS</u>	40
<u>4 RESULTADOS</u>	41
4.1 O TRATAMENTO COM MPEG-PV1-FAB' DIMINUI A SEVERIDADE DA EAU	41
4.2 A DIMINUIÇÃO DA SEVERIDADE DA EAU É ACOMPANHADA DA DIMINUIÇÃO DO PERFIL DE ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T	42
4.3 O BLOQUEIO DE CD28 COM MPEG-PV1-FAB' DIMINUI A ATIVAÇÃO DE LINFÓCITOS T NOS ÓRGÃOS LINFÓIDES PERIFÉRICOS	47
4.4 MPEG-PV1-FAB' POSSUI EFEITO DELETÉRIO NA POPULAÇÃO DE LINFÓCITOS T REGULADORES	54
4.5 O TRATAMENTO COM MPEG-PV1-FAB' AFETA A POLARIZAÇÃO DE LINFÓCITOS PARA UM PERFIL T_H1 , MAS NÃO POSSUI EFEITO NA POLARIZAÇÃO PARA O PERFIL T_H17	56
<u>5 DISCUSSÃO</u>	61

<u>6 CONCLUSÃO</u>	69
<u>REFERÊNCIAS</u>	70
<u>APÊNDICE</u> - REVISÃO PUBLICADA NA REVISTA AUTOIMMUNITY REVIEWS, MAIO DE 2014...	79
<u>ANEXO</u> - CRITÉRIOS PARA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DE OLHOS DE CAMUNDONGOS COM EAU	88

1 INTRODUÇÃO

As doenças autoimunes compreendem um espectro variado de doenças inflamatórias crônicas que acometem uma parcela importante da população mundial e com incidências que vêm aumentando nos últimos anos (Onkamo, 1999; Uramoto, 1999). Essas doenças comprometem a qualidade de vida de seus portadores, sendo uma das principais causas de morte de mulheres até 65 anos nos Estados Unidos (Walsh, 2000). Mais ainda, os gastos com a saúde de pacientes acometidos por doenças autoimunes são significativamente maiores do que os da população em geral, representando custos substanciais aos sistemas de saúde ao redor do mundo (Furst, 2012, 2013; Yu, 2009).

1.1 Uveíte Autoimune

Uveíte é uma doença órgão-específica, caracterizada por lesões irreversíveis em diferentes porções anatômicas dos olhos, sendo responsável por uma parcela significativa dos casos de deficiências visuais e cegueira, com incidência de 52,4 a cada 100.000 habitantes e prevalência de 115,3 a cada 100.000 habitantes nos Estados Unidos (Gritz, Wong, 2004). Afeta principalmente indivíduos na fase mais produtiva da vida e por isso é considerada um importante problema socioeconômico. Só a uveíte autoimune é responsável por aproximadamente 30 mil novos casos de cegueira anualmente apenas nos Estados Unidos (Nussenblatt, 1990), e representa 10% dos casos de cegueira no Ocidente (Suttorp-Schulten, Rothova, 1996). Pacientes diagnosticados com uveíte apresentam uma redução nos índices gerais de saúde e dificuldade em executar tarefas do dia-a-dia, além de apresentarem comportamentos depressivos por conta de seu déficit visual (Maca, 2013), logo, essa doença representa um problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas mundialmente e gera custos significativos aos sistemas de saúde.

Na uveíte observa-se na inflamação da úvea, a camada do olho compreendida entre a esclera e a retina, incluindo a íris, o corpo ciliar e a coróide, e pode se estender à tecidos adjacentes, como o nervo óptico e o humor vítreo (Whitcup, Nussenblatt, 1997). A doença é comumente classificada em uveíte infecciosa e uveíte não-infecciosa – sendo a Uveíte Autoimune incluída nesse último grupo – e as lesões podem afetar as porções anteriores, intermediárias e posteriores do olho.

Na uveíte autoimune antígenos oculares como a arrestina, também conhecida como antígeno-S (S-Ag) (Wacker, 1977), a proteína ligante de retinóide entre fotoreceptores (IRBP) e a recoverina são expostos e uma resposta imune contra essas moléculas é iniciada (Roitt, 1993). Contudo, em condições normais, características microanatômicas exclusivas contribuem para a condição de imunoprivilégio ocular (Medawar, 1961) e garantem proteção contra respostas autoimunes dirigidas a antígenos oculares e a manutenção da integridade do tecido. Dentre essas características encontram-se a barreira hemato-retiniana; a ausência, no olho, de células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) e de drenagem linfática (Hamrah, Dana, 2007); a secreção por células oculares de fatores imunossupressores solúveis como TGF- β , FasL, PD-L1 (Usui, 2008), CTLA-4 (Sugita, 2006), CTLA-2 (Sugita, 2008); a expressão de moléculas imunossupressoras como CD200, CD55 e CD46 na superfície de células oculares (Zhou, Caspi, 2010); a geração de linfócitos T reguladores (Sugita, 2010; Zamiri, 2007). Assim, dentre os eventos envolvidos na resposta autoimune, a quebra da barreira hemato-retiniana e o reconhecimento de antígenos oculares por linfócitos T autorreativos e sua posterior expansão representam etapas críticas na patogênese da doença. Como grande parte das doenças autoimunes, o componente genético também é importante na uveíte autoimune, sendo os alelos HLA-DR4, HLA-DR3 e alguns alelos HLA-DQ associados ao desenvolvimento da doença (Pennesi, 2003).

Os tratamentos mais modernos dão foco à terapias imunomoduladoras para controlar a inflamação aguda e assegurar que episódios de remissão não ocorram. Corticosteróides são geralmente a primeira escolha terapêutica por sua eficiência em controlar a inflamação a curto e longo prazo. Contudo, são observados uma série de efeitos adversos comuns a esse tipo de terapia, como ganho de peso, ulceração gástrica, osteoporose, retenção de fluidos, hipertensão e diabetes, além de sequelas oculares, como glaucoma e catarata. Terapias mais específicas tem sido associadas a um melhor resultado terapêutico. Fazem parte desse espectro: antimetabólitos; Inibidores de células T e calcineurina; agentes citotóxicos; imunoglobulina intravenosa; agentes biológicos (Wakefield, 2012). Sendo este último grupo de grande interesse por compreender anticorpos monoclonais de diferentes especificidades, como Infliximab (anticorpo quimérico camundongo-humano, direcionado contra TNF- α), Adalimumab (anticorpo humano, direcionado contra TNF- α), Etanercept (também direcionado contra TNF- α), Daclizumab

(anticorpo humanizado, direcionado contra a cadeia α do receptor de IL-2), e terapias à base de Interferon- α (Foster, 2003; Nussenblat, 1999; Smith, 2005; Yeh, 2008).

Apesar de grandes avanços, o tratamento da uveíte autoimune, embora efetivo em grande parte dos casos, está associado com efeitos adversos importantes devido à supressão generalizada do sistema imunológico. Os corticóides vem sendo utilizados por muitos anos, mas seus efeitos adversos são um problema constante, especialmente em terapias de longa duração, e podem acarretar diminuição da qualidade de vida muitos desses pacientes (Siddique, 2011). Apesar de serem, em geral, uma boa alternativa para os corticóides, agentes antimetabólitos e inibidores de células T são acompanhados de efeitos adversos importantes, em especial para mulheres grávidas, e em homens e mulheres em idade reprodutiva, podendo levar, em alguns casos, à infertilidade irreversível (Wakefield, 2012). Por fim, os agentes biológicos, que vem ganhando espaço na terapêutica com resultados promissores no tratamento de uveíte autoimune e de outras doenças imunomediadas (Cordero-Coma, 2013), podem apresentar efeitos adversos diversos e imprevisíveis, como ativação de tuberculose latente e maior propensão à infecções fúngicas, entre outros (Cordero-Coma, 2013; Servat, 2012).

Tendo isso em vista, muitas das pesquisas nessa área se concentram na busca de novos fármacos, moléculas e anticorpos monoclonais, ou no refinamento de alternativas terapêuticas existentes que garantam modulação específica do sistema imune e a indução de respostas regulatórias mais eficientes, seja pela restauração de tolerância, geração de células T reguladoras (T_{reg}) ou interferência nos mecanismos efetores da doença. Assim, o desenvolvimento de novas moléculas ou de melhoria de moléculas conhecidas que atuem nesses diferentes aspectos da resposta imune representam alvos promissores de pesquisa, com enfoque na melhoria da qualidade de vida geral desses pacientes. Ainda, devido a heterogeneidade das causas e do estágio de comprometimento individual de uveíte autoimune, há clara necessidade de diagnóstico preciso; nesse sentido, a busca de tratamentos alternativos ou combinados com foco em grupos de pacientes com doença semelhantes pode ser também promissor.

1.2 Uveíte Autoimune Experimental – EAU

Devido à habilidade de reproduzir características específicas de doenças humanas em diversos níveis – indo de semelhanças moleculares à semelhanças clínicas – modelos animais tem sido muito utilizados para o entendimento da patogênese de diversas doenças, e o mecanismo de ação de potenciais artifícios terapêuticos nas últimas décadas. Existem diversos modelos que representam a uveíte autoimune (Caspi, 2010; Gasparin, 2012; Papotto, 2014); contudo, o mais robusto e mais utilizado é a Uveíte Autoimune Experimental (EAU).

A EAU é um modelo de inflamação intra-ocular mediada por linfócitos T induzido a partir da imunização de roedores com antígenos retinianos (sendo utilizados, predominantemente, o S-Ag e a IRBP e seus peptídeos derivados), emulsificados em Adjuvante Completo de Freund (CFA) e toxina de *Bordetella pertussis* (PTx). Em camundongos, a doença resultante se concentra principalmente na parte posterior dos olhos, com lesões focais que afetam retina e coróide. A presença de granulomas e de vasculite nas camadas posteriores do olho também é frequente, e geralmente são acompanhadas de descolamento de retina e desorganização da camada de fotorreceptores. Comparada à doença gerada em outros roedores, a EAU em camundongos apresenta maior duração e é menos aguda, facilitando a manipulação terapêutica da doença (Caspi, 1988).

A predisposição genética se torna clara nesse modelo, onde encontramos diferentes níveis de susceptibilidade para a indução da doença em diferentes linhagens de camundongo. Essa susceptibilidade está ligada à alguns haplótipos H-2 do MHC, como por exemplo, H-2^b (encontrado em camundongos C57BL/6 e C57BL/10), H-2^k (encontrado em camundongos B10.BR) e H-2^r (encontrado em camundongos B10.RIII), sendo H-2^r o mais susceptível, seguido por H-2^k e H-2^b (Caspi, 2010). A susceptibilidade à EAU é dependente, também, do padrão de resposta imune do indivíduo, sendo que aqueles predispostos à uma resposta T_H1 exacerbadas são mais susceptíveis do que um indivíduo que possui um padrão T_H1^{low}, por exemplo (Sun, 1997).

O estabelecimento da uveíte em camundongos, como referido acima, ocorre após imunização com antígenos de retina. Os linfócitos antígeno-específicos reconhecem estes antígenos apresentados por células apresentadoras de antígenos (APCs), são ativados e proliferam nos linfonodos drenantes (Takeuchi, 2001). Após a ativação e proliferação destas

células, inicia-se o processo de migração para o olho. Esse processo culmina na adesão focal desses linfócitos antígeno-específicos nas vênulas pós-capilares da retina, seguido por aumento da expressão de moléculas de adesão, e quebra da barreira hemato-retineana, iniciando o recrutamento de células para o interior do olho, passo fundamental para o desenvolvimento da doença (Caspi, 1990; Chan, 1990; La-Heij, 1998). Em camundongos da linhagem B10.RIII, essas mudanças começam a ocorrer entre o 6 e o dia 9 após a imunização, dando início ao processo inflamatório no olho (Xu, 2003); no dia 9 pós-imunização, já é possível observar um pequeno infiltrado de células na retina e coróide. Dentre essas células estão macrófagos, linfócitos T $CD4^+$ e células dendríticas que aumentam em número, atingindo seu pico entre os dias 12 e 15 pós-imunização, caracterizando uma intensa migração de células e o início dos danos estruturais na retina. Com 3 semanas (entre os dias 21 e 26) observa-se diminuição no infiltrado de células inflamatórias devido a um menor número de células que migram para o olho neste momento e o aumento do processo de morte celular. Porém a intensa resposta inflamatória intraocular faz com que ocorra um aumento no processo de degeneração da retina. No dia 39 após a imunização, a inflamação diminui e a necrose ocorrida no tecido é substituída por fibrose, seguida de perda de células das camadas da retina (Jiang, 1999).

No que diz respeito ao envolvimento da inflamação mediada por linfócitos T, as características celulares da EAU se assemelham àquelas encontradas na doença humana. Os linfócitos T $CD4^+$ representam a maioria das células que infiltram os olhos, e sustentam, *in vivo*, o fenótipo T_H1 (Rizzo, 1996). Contudo, essas células aparentemente não apresentam importância crucial para o desencadeamento da EAU, já que camundongos $IFN-\gamma$ *knockout* imunizados com IRBP desencadeiam resposta imune contra tecidos oculares (Jones, 1997). E, embora esperado, linfócitos T_H2 não conferem resistência à uveíte; porém, o desvio da resposta imune para esse padrão é capaz de diminuir as respostas T_H1 patogênicas (Sun, 1997). Recentemente, diversos grupos tem mostrado a importância de células T_H17 na patogênese da uveíte autoimune (Amadi-Obi, 2007; Luger, 2008; Tang, 2007), contudo, é difícil determinar o seu papel real na doença, já que aparentemente tanto linfócitos T_H1 quanto linfócitos T_H17 são capazes de promover doença e dano sozinhos (Tang, 2007). Ainda, dentre as células que participam da patogênese da EAU, encontram-se linfócitos $TCD8^+$ que podem ser encontrados na retina de camundongos B10.A imunizados com IRBP no dia 10 pós-imunização (Zierhut, 1999); além das células $TCD8^+$, também foi demonstrado

o envolvimento das células *Natural Killer* (NK), uma vez que a depleção das mesmas diminui a intensidade da doença (Kitaichi, 2002).

A importância das citocinas tanto na EAU quanto na uveíte humana é incontestável, mas o entendimento de seus reais efeitos é um assunto extremamente complexo. O IFN- γ , a principal citocina do padrão de resposta T_H1 não é necessário para a iniciação e manutenção da EAU (Jones, 1997). Da mesma forma, a falta de IL-17, o principal produto de linfócitos T_H17, não anula a susceptibilidade à EAU (Luger, 2008). Por consequência, a resposta imune não se baseia simplesmente na presença ou ausência de uma determinada citocina, mas sim no balanço de citocinas presentes no microambiente do olho, entre elas IL-1, IL-12, IL-23, IL-4, IL-10, TGF- β (Vallochi, 2007).

1.3 CD28 e co-estimulação

Um dos possíveis candidatos a novo alvo terapêutico no tratamento de doenças autoimunes e atopias é a molécula conhecida como CD28. Uma proteína de membrana responsável pela transdução do sinal gerado após engajamento de um linfócito T com uma APC e que age em sinergismo com o Receptor de Células T (TCR) levando à ativação de células T *naïve*. Devido à natureza do sinal gerado através do CD28, sua via de sinalização é conhecida como segundo sinal, e essa molécula faz parte da conhecida família de moléculas co-estimuladoras da resposta imune.

Em humanos, o CD28 é expresso de forma constitutiva na maioria dos linfócitos T CD4⁺ e em dos linfócitos T CD8⁺, e é expresso na vasta maioria de linfócitos T *naïve* (Greenfield, 1997). Esse receptor co-estimulatório é um homodímero estabilizado por ligações dissulfeto e se liga às moléculas B7-1 (CD80) e B7-2 (CD86), que são expressas por APCs ativadas. Em condições inflamatórias e durante a apresentação de antígeno B7-1 e B7-2, tem sua expressão aumentada para facilitar a interação com o CD28 ou CTLA-4 (Antígeno Citotóxico Associado a Linfócitos T 4) (Greenwald, 2002). B7-1 é expresso de maneira bem regulada em células B ativadas, monócitos estimulados, células dendríticas (DCs) expandidas em cultura, enquanto B7-2 pode ser expresso em baixos níveis por DCs (Hollsberg, 1997). As diferenças funcionais entre B7-1 e B7-2 ainda não foram completamente definidas.

O CD28 amplifica respostas distintas de linfócitos T à antígenos, incluindo sinal de sobrevida, produção de citocinas, como IL-2, diferenciação de células T *naïve* em células

efetoras e de memória, tornando o bloqueio da via CD28/B7 uma estratégia interessante para o tratamento de doenças autoimunes, transplante e Doença do Enxerto *versus* Hospedeiro (GVHD) (Greenfield, 1998). Relatos recentes na literatura mostram também a importância dessa molécula na gênese e manutenção da população de linfócitos T reguladores (Gogishvili, 2013; Poirier, 2012; Zhang, 2013). A via de sinalização do CD28 controla a geração tímica e homeostase periférica de linfócitos T_{reg} (Tang, 2003), e camundongos *Knockout* para esse receptor desenvolvem autoimunidade sistêmica espontânea, e suas células T reguladoras são comprometidas funcionalmente (Zhang, 2013).

O Antígeno Citotóxico Associado a Linfócitos T (CTLA-4) ou CD152 é uma proteína estruturalmente similar ao CD28, mas que difere quanto a afinidade de ligação, estrutura e expressão temporal (Greenfield, 1998). É expresso apenas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativados, e é responsável pelo bloqueio da ativação das células T, inibindo sinais liberados pelo CD28 (Guinan, 1994). Dessa forma, o CTLA-4 está envolvido na conclusão da resposta de células T, evitando proliferação e respostas efetoras exacerbadas, através de ligação com moléculas da família B7 (Greenfield, 1997).

1.4 Bloqueio de CD28 como estratégia imunoterapêutica

Poucos são os relatos em literatura sobre a participação das moléculas CD28, B7-1 e B7-2 em doenças autoimunes oculares, contudo, seus resultados são encorajadores e colocam o CD28 como um alvo promissor na imunomodulação desse tipo de doença. Tesavibul e colaboradores (1998) mostraram um aumento na porcentagem de células positivas para as moléculas co-estimuladoras CD28, B7-1 e B7-2 em biópsias de pacientes com Penfigóide Cicatricial Ocular (OCP), uma doença autoimune de mucosas que pode incluir manifestações oculares (que representam cerca de 70% dos casos) e na pele (Hardy, 1971). Tal achado levou os autores a especularem que essas moléculas podem contribuir para o estado de ativação imunológica contínua observado na conjuntiva de pacientes com OCP.

Anticorpos anti-B7 foram testados com sucesso em camundongos B10.A imunizados para EAU, levando a remissão da doença (Fukai, 1999). Mais ainda, a eficácia da combinação de anticorpos anti-B7-1 e anti-B7-2 e utilização de um anticorpo anti-CD28 foram testados e se mostraram capazes de proteger animais B10.A do desenvolvimento de EAU, mas, apesar

do claro controle da resposta imune efetora, não foi possível reverter a doença após um segundo desafio com IRBP (Silver, 2000). Além disso, trabalhos utilizando anticorpos monoclonais anti-CD28 com função antagonista demonstraram que essa é uma estratégia eficaz na modulação da resposta imune em modelos de transplante (Jang, 2008) e encefalomielite autoimune experimental (EAE) (Perrin, 1999). Conquanto os estudos envolvendo vias de co-estimulação em desordens imunológicas oculares sejam poucos, anticorpos monoclonais que tem como alvo moléculas participantes nessas vias vem se firmando como ferramentas no tratamento de doenças autoimunes, tumores e outras; dentre eles podemos citar o Ipilimumab, anticorpo monoclonal que tem como alvo a molécula CTLA-4, e o Abatacept e Belatacept, anticorpos que bloqueiam CD80 e CD86.

Como a modulação de B7 pode interferir tanto com a sinalização via CD28, quanto com a sinalização via CTLA-4, sendo este último um modulador negativo da atividade de linfócitos T, estratégias que tenham como alvo apenas a molécula CD28 parecem mais promissoras, por esta compor uma importante via efetora e de ativação do sistema imune, sendo assim possível alcançar imunossupressão em processos inflamatórios crônicos. Contudo, durante ensaio clínico de fase I, o anticorpo monoclonal com propriedades de super-agonista direcionado à molécula de CD28, TGN1412, trouxe resultados desastrosos, culminando em sequelas permanentes para os voluntários saudáveis envolvidos nesse estudo (St Clair, 2008; Stebbings, 2007). Isto posto, nota-se a necessidade do desenvolvimento de anticorpos com especificidade seletiva, e de um maior entendimento dos mecanismos que permeiam a estratégia de bloqueio de vias de co-estimulação.

Dessa forma, anticorpos direcionados ao CD28, que não possuem reatividade cruzada com CTLA-4 e não geram transdução de sinal se tornam uma ferramenta mais interessante de imunomodulação. Abe e colaboradores (1995) desenvolveram, assim, o anticorpo anti-CD28 mAb PV1 que possui as características acima descritas. Desde então, o uso desse clone vem trazendo resultados promissores na área da imunoterapia. Perrin e colaboradores (1999) utilizando demonstraram a eficácia de mAb PV1 em modelo de EAE. Os efeitos imunossupressores dessa molécula foram direcionados a clones encefalomielitogênicos e se deram através da diminuição da produção de IL-2. Em modelo de transplante cardíaco em ratos, o uso de PV1 IgG3 levou ao aumento do tempo de rejeição, graças à diminuição da produção de IL-2 e da expressão de RNA mensageiro (mRNA) para IFN- γ (Jang, 2008).

Tendo isso em vista, Poirier e colaboradores (2012b) desenvolveram o FR104, um anticorpo humanizado que corresponde às cadeias humanizadas VH e VL do anticorpo monoclonal CD28.3 mAb, fundidas aos domínios de imunoglobulina CH1 e Cκ humanos, e conjugados à polietilenoglicol (PEG). De maneira similar à mAb PV1, esse anticorpo não possui atividade agonista de CD28, falhando na ativação de linfócitos T, e não sendo capaz de estimular a produção de citocinas em linfócitos T, *in vitro*. Mais ainda, sua eficácia foi comprovada *in vivo* em modelo murino humanizado de GVHD, impedindo que animais tratados desenvolvessem a doença (Poirier, 2012). Ademais, relatos recentes na literatura sobre a importância do CD28 na geração e atividade de células T reguladoras (Gogishvili, 2013; Shi, 2012; Zhang, 2013) sugerem que a utilização de anticorpos anti-CD28, que não interfiram com a molécula CTLA-4, podem resultar na geração de linfócitos T_{reg}, e garantir um estado de tolerância e imunossupressão mais específica.

Em paralelo, foi produzida uma versão murina análoga do FR104, o mPEG PV1-Fab, a fim de explorar os possíveis efeitos dessa molécula no tratamento e/ou reversão de doenças autoimunes em modelos animais e, posteriormente, os mecanismos envolvidos nesse fenômeno. O mPEG - PV1-Fab' é um fragmento Fab' do anticorpo monoclonal mAb PV1 conjugado com 2 moléculas de polietilenoglicol de 20kDa, e vem sendo produzido pela empresa de biotecnologia Effimune SAS – Nantes – França.

Nesse estudo foi avaliada a eficácia do anticorpo mPEG PV1-Fab', molécula antagonista de CD28, no controle e ou tratamento da EAU, e os possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos. Para tanto, foram realizados análises histopatológicas dos olhos para determinação do grau de doença, avaliação qualitativa e quantitativa de populações celulares patogênicas e a produção de citocinas. Em paralelo, foi avaliada a frequência das células T_{reg} em animais inoculados com mPEG PV1-Fab' e em cultura celular tratada com com mPEG PV1-Fab'; todos os dados foram comparados aos obtidos com animais imunizados com peptídeo 161-180.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Os estudos foram desenvolvidos nos Laboratórios do Centro de Pesquisa Experimental do Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein – IIEPAE, Hospital Israelita Albert Einstein e utilizaram os métodos e equipamentos de rotina destes laboratórios. Ainda, contaram com a colaboração do Dr. Bernard Vanhove – Effimune – Nantes - França. Este projeto tem financiamento parcial pelo programa Seventh Framework Programme (FP7).

2.1 Camundongos

Camundongos B10.RIII foram obtidos dos Laboratórios Jackson (EUA) e foram mantidos em condições livres de patógenos específicos (SPF) no biotério do Centro de Experimentação e Treinamento e em Cirurgia (CETEC) do Hospital Israelita Albert Einstein, que segue os princípios éticos internacionais e os elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). O CETEC é certificado pela AAALAC – *Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care* que garante o cumprimento dos pré-requisitos de boas práticas no tratamento e uso de animais.. Todos os procedimentos utilizados nesse estudo foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB-USP; sob protocolo registrado nº55, folha 19, livro 03) e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal do Hospital Israelita Albert Einstein (CEUA-HIAE; número de processo: 1512/12); todos os procedimentos foram realizados de acordo com as regras internacionais de manuseio de animais para pesquisa (Giles, 1987).

2.2 Antígenos e Reagentes

O peptídeo SGIPYIISYLHPGNTILHVD representando os resíduos 161-180 da IRBP foram comprados da empresa China Peptide Co., Ltd (Shanghai, China). A toxina de *Bordetella pertussis* (PTx) e o Adjuvante completo de Freund (CFA) foram comprados da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Alíquotas estéreis do fragmento Fab' do anticorpo

monoclonal PV1 conjugado com 2 moléculas de polietilenoglicol de 20kDa (mPEG - PV1-Fab') em PBS (tampão fosfato-salina) foram cedidas pelo Dr. Bernard Vanhove (INSERM U1064, Nantes, França; Effimune SAS, Nantes, França). mPEG-PV1-Fab' é um antagonista seletivo de CD28, ou seja, não gera sinalização via CD28 e não se liga a outras moléculas da família de CD28, como por exemplo o CTLA-4. Da mesma forma, fragmentos Fab' de anticorpos policlonais inespecíficos conjugados com 2 moléculas de polietilenoglicol de 20kDa (mPEG-NHS-Fab') diluídos em PBS foram utilizados como controle.

2.3 Indução de EAU em camundongos B10.RIII e tratamento com anti-CD28

Camundongos B10.RIII (n = 5-10/grupo) foram imunizados com 50µg/animal do peptídeo 161-180 da IRBP diluído em PBS e emulsificado em CFA, complementado com *Mycobacterium tuberculosis* até uma concentração de 2,5 mg/mL (v/v), em um volume final de 200 µl, no flanco por via subcutânea (Rizzo, 1996). Adicionalmente foi utilizado um reforço de 500 ng/animal de toxina de *B. pertussis* diluída em 100 µl de PBS, inoculado intraperitonealmente (Silver, 1995). Para a avaliação da eficácia do anticorpo mPEG PV1-Fab' no tratamento da EAU grupos de camundongos B10.RIII receberam 10 mg/Kg de mPEG PV1-Fab' ou mPEG NHS-Fab' por via intraperitoneal. Inicialmente, os animais foram tratados nos dias 9, 13 e 17 após a imunização (períodos correspondentes ao início e fim da fase aferente, e início da fase eferente da EAU, respectivamente). Seguindo-se esse esquema de tratamento é esperado que a saturação de CD28 em células circulantes se mantenha em mais de 95%, garantindo a eficácia do tratamento (Vanhove, 2012, observações não publicadas). Os animais foram sacrificados nos dias 14 e 21 após imunização e olhos, linfonodos drenantes (dLN) e baço foram retirados. Nos olhos, foram avaliadas grau de doença por histopatologia e imunofenotipagem. Nos linfonodos e baço, foram realizados ensaios de imunofenotipagem e produção de citocinas.

2.4 Análise histopatológica dos olhos

No dia 21 após a imunização os olhos de ao menos 2 animais por grupo em cada experimento foram retirados e depositados em 10 mL de solução de formaldeído glutaraldeído 4% em PBS por 1 h, em seguida, após descarte da solução de gutaraladeído,

foram adicionados 10 mL de solução de formaldeído 10% em PBS por 24 horas e, por fim, os olhos foram transferidos para 10 mL de solução de álcool 70%. Os tecidos foram processados, cortados e corados com Hematoxilina-Eosina (H&E), para a observação de possíveis alterações estruturais e sinais inflamatórios para a atribuição do grau de doença. O material será processado pela empresa Histotech Lâminas Didáticas Ltda – empresa especializada no preparo de lâminas de rotina para diagnóstico histopatológico de biópsias - e analisadas por microscopia de luz. A severidade da doença afetando os animais dos diferentes grupos experimentais foi avaliada após exame duplo-cego de quatro secções de cada olho. A graduação da doença seguiu uma escala variando de 0 (olho saudável) a 4 (grau máximo de doença), em incrementos de 0,5 pontos de acordo com o um sistema semi-quantitativo descrito previamente (Caspi, 1988). O grau mínimo de EAU é caracterizado por infiltrado de células inflamatórias no corpo ciliar, coróide ou retina (grau = 0,5). O grau de doença aumenta progressivamente de acordo com o número e severidade das lesões inflamatórias encontradas, como vasculite, granuloma, dobramento de retina e desorganização da camada de fotorreceptores. Maiores detalhes dos critérios utilizados podem ser encontrados na seção “Anexo”. A média do grau de doença de ambos os olhos de um animal foi calculada e considerada como um evento estatístico único.

2.5 Obtenção de células infiltrantes nos olhos

Os dois olhos de pelo menos três camundongos por grupo foram coletados nos dias 14 ou 21 após imunização. Esses olhos foram então lavados com PBS – 2% Soro Fetal Bovino (SFB) e foram macerados cuidadosamente entre dois fragmentos de tecido de nylon estéreis em uma placa de Petri contendo 2 mL de PBS – 2% SFB (Commodaro et al., 2010). Após centrifugação do macerado por 5 minutos, à 450 g e 4 °C, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 1 mL de *Lysing Buffer* (BD Biosciences, San Diego, USA) por 3 minutos, à 37 °C para lise de hemácias. Em seguida, foram adicionados 10 mL de PBS – 2% SFB e as células foram centrifugadas por 5 minutos, à 450 g e 4 °C. Por fim, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspensionado em 1 mL de PBS – 2% SFB para contagem dos leucócitos no contador de células automatizado *Countess* (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, EUA). Posteriormente as células foram utilizadas para imunofenotipagem, como descrito adiante.

2.6 Obtenção de células do baço e linfonodos drenantes

Baços e linfonodos drenantes (linfonodos inguinais e peri-aórticos) foram coletados nos dias 14 e 21 após imunização. O procedimento de obtenção das células nesses órgãos seguiu protocolo semelhante ao protocolo de separação das células infiltrantes dos olhos. Contudo para a lise de hemácias, foram utilizados 3 mL de *Lysing Buffer* (BD Biosciences, San Diego, USA), e as células foram ressuspensas em 10 mL de PBS – 2% SFB para a contagem de leucócitos. As células obtidas do baço e dLN foram utilizadas para imunofenotipagem, marcação de citocinas intracelulares e ensaio de produção de citocinas.

2.7 Imunofenotipagem

As células obtidas nos olhos, dLN e baço dos animais de diferentes grupos experimentais foram marcadas *ex vivo* para moléculas presentes na superfície celular com os seguintes anticorpos monoclonais conjugados a diferentes fluorocromos: anti-CD4, anti-CD45, anti-CD62L, anti-CD44, anti-Tim3, anti-CD69, anti-NKG2D, anti-CD8, anti-CD3, anti-PD-1, anti-BTLA e anti-CTLA-4 (BioLegend Inc., San Diego, USA); anti-CD25 e anti-Foxp3 (BD Biosciences, San Diego, USA). Após contagem as células foram ressuspensas em placa de 96 poços, fundo “U” (Corning, EUA) com 200 µL de na PBS contendo 1% de SFB e 0,05% de azida sódica (*Staining Buffer*) na concentração de 1×10^6 células/poço e centrifugadas por 5 minutos, à 450 g e 4 °C. O sobrenadante foi, então, descartado e foram adicionados 25 µL de solução contendo os anticorpos monoclonais de interesse por 30 minutos à 4 °C, em concentração determinada após titulação dos mesmos. Após incubação, as amostras foram lavadas com *Staining Buffer*, e após centrifugação por 5 minutos, à 450 g e 4 °C, foram ressuspensas em 300 µL de *Staining Buffer* para a aquisição em citômetro de fluxo. A aquisição e a leitura de intensidade de fluorescência será feita em citômetro de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Diego, USA). Quando conveniente, as células obtidas foram marcadas para o fator de transcrição Foxp3, com o intuito de identificar populações de células T reguladores. A marcação foi feita utilizando o kit BD mouse FoxP3, de acordo com as instruções do fabricante (BD Biosciences).

2.8 Ensaio para detecção de citocinas intracelulares por Citometria de Fluxo

As células obtidas dos dLN dos camundongos dos diferentes grupos experimentais foram estimuladas *overnight* com 100 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA) e 500 ng/mL de ionomicina (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), na presença de Golgi Plug - Brefeldina A - (BD Biosciences, San Diego, USA) em placa de 96 poços, fundo "U" (Corning, EUA), na concentração de 1×10^6 células/poço. Células não-estimuladas foram utilizadas como controles. Finalizada a cultura, as células foram marcadas para os antígenos de superfície utilizando-se os anticorpos anti-CD3, anti-CD4 e anti-CD8 (BioLegend Inc., San Diego, USA) conjugados a diferentes fluorocromos, como descrito previamente. Após marcação com os anticorpos de superfície as células foram então fixadas e permeabilizadas utilizando os reagentes *PermWash*, *Cytofix* e *Cytoperm* que compõe o kit Cytofix/Cytoperm Plus (BD Biosciences, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Após permeabilização, as células foram marcadas para a detecção intracelular de citocinas incubando-as os anticorpos anti-IFN- γ , anti-IL-17 e anti-IL-2 (BD Biosciences, San Diego, USA), por 40 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas com *PermWash* e centrifugadas por 5 minutos, à 450 g e 4 °C. O sobrenadante foi, então, descartado, as células foram ressuspendidas em 300 μ L de *Staining Buffer* e adquiridas em citômetro de fluxo BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Diego, USA).

2.9 Ensaio de produção de citocinas após re-estímulo com peptídeo 161-180 da IRBP

As células dos linfonodos de camundongos B10.RIII *naïve* imunizados para EAU (nesse caso não foi utilizado o reforço de PTx para minimizar a migração dessas células ao sítio inflamatório) foram coletadas, conforme descrito previamente, no dia 7 pós-imunização e então incubadas por 2 h com PV1 ou não, à 37 °C em estufa úmida com 5% de CO₂. Após essa incubação, foram estimuladas com o peptídeo 161-180 da IRBP por 48 h, à 37 °C em estufa úmida com 5% de CO₂. Ao fim desse tempo as células foram coletadas e marcadas para moléculas de superfície e as citocinas de interesse, como descrito anteriormente, e então adquiridas em citômetro de fluxo modelo BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Diego, USA).

Figure 2 displays flow cytometry plots for the isolation of CD8⁺ and CD4⁺ T cell subsets. The top row shows the isolation of CD8⁺ T cells from splenocytes (left) and NK/NKT cells from splenocytes (right). The bottom row shows the isolation of CD8⁺ T cells from splenocytes (left) and CD4⁺ T cells from splenocytes (right). The plots show the relationship between various markers and cell populations, with gate percentages indicated.

Figura 1. Estratégia de análise de subpopulações leucocitárias e seus estados de ativação. Inicialmente, foram selecionadas células na região dos linfócitos, separadas por tamanho e granulosidade. Em seguida foram selecionadas as células CD45⁺. De acordo com a expressão de NKG2D e CD3 foram selecionadas as células NK (CD3⁻NKG2D⁺) e os linfócitos T (CD3⁺NKG2D⁻) e linfócitos NKT (CD3⁺NKG2D⁺). Dentro da população de linfócitos T separaram-se as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Para ambas as populações o estado de ativação foi definido pela expressão de CD44 e CD62L, sendo os linfócitos T *naïve* CD44^{lo}CD62L^{hi} e os linfócitos T efetores (T_{eff}) CD44^{hi}CD62L^{lo}, ainda, para os linfócitos T CD8⁺ a população de memória (T_M) foi considerada como sendo CD44^{hi}CD62L^{hi}. Para a população de linfócitos T efetores, de acordo com a expressão de CD69 foram consideradas as populações de linfócitos T de memória central (TCM; CD69⁻) e linfócitos T de memória efetora (TEM; CD69⁺). Por fim, dentro da população de linfócitos T_{eff} as células que expressavam o marcador Tim-3 foram consideradas como sendo linfócitos T do tipo T_H1.

Figura 2. Estratégia de análise de expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórias em linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Inicialmente, foram selecionadas células na região dos linfócitos, separadas por tamanho e granulosidade. Os linfócitos T foram selecionados dentro da população $CD3^+$. Dentro da população de linfócitos T separaram-se as populações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Por fim, a expressão de CD69, PD-1 e CD25 dentro de cada uma das subpopulações de linfócitos foi definida de acordo com os gráficos acima.

Figura 3. Estratégia de análise da população de linfócitos T reguladores (T_{reg}). Inicialmente, foram selecionadas células na região dos linfócitos, separadas por tamanho e granulosidade. Os linfócitos T foram selecionados pela expressão de CD3. Em seguida, foram selecionadas as células T $CD4^+$ expressando CD25

(CD4⁺CD25⁺). Por fim, foi avaliada a expressão de Foxp3 nessa última população, de acordo com controle de FMO.

A estratégia de análise utilizada para a determinação da expressão individual de marcadores de ativação por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ se encontra na figura 2. Ainda, a estratégia de análise da população de linfócitos T_{regs} se encontra na figura 3, sendo a expressão de FoxP3 determinada através da estratégia de *Fluorescence Minus One* (FMO).

Figura 4. Análise multiparamétrica da produção de citocinas por linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Inicialmente, foram selecionadas células na região dos linfócitos, separadas por tamanho e granulosidade. Os linfócitos T foram selecionados dentro da população CD3⁺. Dentro da população de linfócitos T separaram-se as populações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺. Para cada um das subpopulações de linfócitos T foram definidas as populações de células produtoras de IFN- γ , IL-2 e IL-17 de acordo com os gráficos acima. Posteriormente aplicou-se análise booleana nas populações produtoras de citocinas para a determinação das populações mono- e polifuncionais.

Para a análise multiparamétrica da expressão de marcadores de ativação e moléculas coestimulatórias e da marcação intracelular de citocinas foram utilizados, além do *software* FlowJo (TreeStar Inc., Ashland, USA), os *softwares* Pestle (v. 1.7) e SPICE (v. 5.3; M. Roederer, Vaccine Research Center, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National

Institutes of Health), específicos para a análise de dados obtidos em citometria multiparamétrica (Roederer, 2011). A estratégia de *gating* para a determinação das populações produtoras das citocinas analisadas se encontra na figura 4, enquanto a estratégia utilizada para determinar a expressão dos diferentes marcadores de ativação e moléculas co-estimulatórias é encontrada na figura 5.

Figura 5. Análise multiparamétrica da expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórias por linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Inicialmente, foram selecionadas células na região dos linfócitos, separadas por tamanho e granulocidade. Os linfócitos T foram selecionados dentro da população $CD3^+$. Dentro da população de linfócitos T separaram-se as populações de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$. Para cada um das subpopulações de linfócitos T foram definidas as populações de células expressando os marcadores BTLA, CD69, CD25, CTLA-4 e PD-1 de acordo com os gráficos acima. Posteriormente aplicou-se análise booleana nas populações expressando as diferentes moléculas de superfície para a determinação das populações em diferentes estágios de ativação.

2.11 Análise estatística

A significância das diferenças entre as médias dos graus de EAU foi estabelecida através do teste ANOVA não paramétrico (Kruskal-Wallis), e com pós-teste de Dunn, para correlação entre diferentes grupos, considerando-se a probabilidade mínima de $p \leq 0,05$. Para as análises estatísticas cada camundongo (média dos dois olhos) foi considerado como

um evento estatístico. Para a determinação da significância das outras médias foi utilizado o teste de Mann-Whitney. As análises serão realizadas com o auxílio do *software* computacional *Graphpad Prism* (*Graphpad Software Incorporation*[®]) versão 4.0.

3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

1. Avaliar a eficácia do anticorpo mPEG PV1-Fab' - anticorpo murino monovalente dirigido contra CD28 - no controle da EAU através da:

- Determinação do grau de doença a partir da análise histopatológica dos olhos de camundongos imunizados para EAU nos grupos controles e tratados com mPEG PV1-Fab';

2. Explorar os mecanismos por trás da ação do anticorpo mPEG PV1-Fab' na Uveíte Autoimune Experimental através da:

- Avaliação da presença e quantificação das células infiltradas nos olhos, linfonodos drenantes e baço de camundongos imunizados para EAU nos grupos controles e tratados com mPEG PV1-Fab'. Foram consideradas as populações de Linfócitos T CD4 (CD3⁺CD4⁺), T CD8 (CD3⁺CD8⁺), T_{reg} (CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺), células NK (CD3⁻NKG2D⁺) e linfócitos B (CD19⁺);
- Determinação da frequência de células T_{H1} (CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺) e T_{H17} (CD3⁺CD4⁺IL-17⁺) em linfonodos drenantes em animais imunizados para EAU, nos grupos controles e tratados com mPEG PV1-Fab';
- Avaliação da indução de anergia por parte do mPEG PV1-Fab' através da análise da capacidade de proliferação de linfócitos T e frequência de células T anérgicas (CD3⁺CD4⁺BTLA⁺) (Hurchla et al., 2005) em linfonodos e olhos de camundongos induzidos ao desenvolvimento de EAU, nos grupos controles e tratados mPEG PV1-Fab'.

4 RESULTADOS

4.1 O tratamento com mPEG-PV1-Fab' diminui a severidade da EAU

Para avaliar o efeito do antagonista específico de CD28 mPEG-PV1-Fab' na progressão da EAU, camundongos B10.RIII foram imunizados com o peptídeo 161-180 da IRBP e no dia 9 pós-imunização foram tratados com PV1 ou mPEG-NHS-Fab', um controle de fragmentos Fab' policlonais. Neste dia, a doença se encontra no final da fase aferente, e linfócitos T com perfil inflamatório já podem ser encontrados nos olhos desses camundongos. Baseado em estudos farmacocinéticos (Vanhove, B; dados não publicados), os camundongos foram tratados a cada quatro dias e no dia 21 pós-imunização foram sacrificados para determinação do grau de doença por análise histopatológica. O grupo de camundongos tratados com PV1 apresentou diminuição significativa tanto do grau médio de doença quanto da incidência da mesma, quando comparado com o grupo não tratado (Fig. 6).

Figura 6. O tratamento com mPEG PV1-Fab' diminui o grau médio de EAU. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab' ou com o controle policlonal de fragmentos Fab, mPEG NHS-Fab'. No dia 21 pós-imunização os camundongos foram, então, sacrificados e os olhos foram coletados para a análise histológica. A graduação de doença foi atribuída em uma escala de 0 (ausência de EAU) a 4 (grau máximo de EAU) em incrementos de 0,5 pontos, de maneira duplo-cega. A média do grau de ambos os olhos de um animal foi calculada e considerada como um evento estatístico único. Os dados apresentados são a combinação de, pelo menos, quatro experimentos independentes. *, $p < 0.05$, pelo teste de Mann-Whitney.

Consequentemente, os animais tratados com PV1 apresentaram uma resposta inflamatória nos olhos diminuída quando comparados com os animais não tratados. Nas preparações histológicas dos camundongos tratados com mPEG-PV1-Fab' foram observadas

uma menor incidência de vasculite, formação de granulomas, e dobramentos de retina (Fig. 7). O grupo tratado com o controle policlonal apresentou um grau médio e incidência de EAU maiores do que aqueles observados no grupo tratado com mPEG-PV1-Fab' (Fig. 6), além de sinais inflamatórios mais pronunciados (Fig. 7).

Figura 7. O tratamento com mPEG PV1-Fab' diminui os sinais inflamatórios da EAU. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab' ou com o controle policlonal de fragmentos Fab, mPEG NHS-Fab'. No dia 21 pós-imunização os camundongos foram, então, sacrificados e os olhos foram coletados para a análise histológica. Fotomicroscopias (Magnificação = 200x) representativas de cortes histológicos corados com H&E de camundongos saudáveis, camundongos não tratados, tratados com PV1 e tratados com NHS. Achados histopatológicos como infiltrado celular, vasculite e granuloma são indicados por setas pretas. Os dados apresentados são a combinação de, pelo menos, quatro experimentos independentes.

4.2 A diminuição da severidade da EAU é acompanhada da diminuição do perfil de ativação de linfócitos T

Os achados acima nos levaram a investigar os efeitos do tratamento com PV1 nos

linfócitos infiltrando os olhos de camundongos B10.RIII imunizados para EAU. No dia 14 pós-imunização a doença já se encontra estabelecida, e o infiltrado inflamatório está em seu pico, portanto, nessa dia os olhos foram coletados para a análise das células infiltrantes. Tanto os animais tratados com mPEG-PV1-Fab' quanto os animais não tratados apresentaram números similares de células infiltrantes (Fig. 8A). Em relação aos linfócitos T infiltrantes, observou-se uma menor frequência de linfócitos T $CD4^+$ no grupo tratado com PV1 em comparação ao grupo não tratado (Fig. 8B). Contudo, não foram observadas diferenças no número absoluto dessa subpopulação de linfócitos T entre os grupos não tratado e tratado com PV1 (Fig. 8C). Os linfócitos T $CD8^+$ foram encontrados em frequências (Fig. 8B) e números (Fig. 8D) similares entre os grupos experimentais utilizados.

Figura 8. Camundongos tratados com PV1 não apresentaram diferenças no infiltrado de linfócitos nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os olhos foram coletados para a imunofenotipagem dos leucócitos infiltrantes. (A) Número total de leucócitos infiltrantes. (B) Frequência de de linfócitos T $CD4^+$ e $CD8^+$ infiltrando os olhos de camundongos B10.RIII mice. (C) Número total de linfócitos T $CD4^+$ e (D) de linfócitos T $CD8^+$. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. *, $p < 0.05$, pelo teste de Mann-Whitney.

Além dos linfócitos T, outras populações celulares apresentam um papel importante na patogênese da EAU. Células *natural killer* (NK), e células T *natural killer* (NKT),

particularmente, já foram associadas ao agravamento e melhora clínica da doença (Grajewski, 2008; Kitaichi, 2002; Li, 2005), portanto, as frequências dessas células foram avaliadas nos diferentes grupos experimentais utilizados. Porém, foram observadas frequências similares de células NK ($CD45^+CD3^-NKG2D^+$) e células NKT ($CD45^+CD3^+NKG2D^+$), além de linfócitos B ($CD3^-CD19^+$) nos grupos de animais não tratados ou tratados com PV1 (Fig. 9).

Figura 9. Camundongos tratados com PV1 não apresentaram diferenças nas subpopulações de leucócitos nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os olhos foram coletados para a imunofenotipagem dos leucócitos infiltrantes. Frequências de subpopulações leucocitárias infiltrando os olhos de camundongos B10.RIII. Os dados apresentados são representativo de, pelo menos, dois experimentos independentes. *, $p < 0.05$, pelo teste de Mann-Whitney.

Como o tratamento com mPEG PV1-Fab', aparentemente, não interferiu na migração dos linfócitos T para os olhos dos animais imunizados para EAU ou na sobrevivência dessa população celular, por conta dos números e frequências similares dessas células observados nos olhos dos camundongos dos diferentes grupos experimentais, uma alteração no estado de ativação dos linfócitos T infiltrantes poderia explicar a diminuição da severidade observada nos animais tratados com PV1. Para tanto, o perfil de ativação, determinado pela expressão das moléculas CD44 e CD62L na superfície dos linfócitos T (Fig. 10A) (Carrera Silva, 2013), foi analisado nos linfócitos T infiltrantes.

Figura 10. Camundongos tratados com PV1 apresentaram menores frequências de linfócitos T ativados nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os olhos foram coletados para a imunofenotipagem dos leucócitos infiltrantes. (A) Gráficos representativos da expressão de CD44 e CD62L por células T CD4⁺ e CD8⁺. (B) Razão entre células T_{efetora} e T_{naïve} (definidas pela expressão de CD44 e CD62L; sendo consideradas as células T CD44^{hi}CD62L^{lo} como células T_{efetora} e as células T CD44^{lo}CD62L^{hi} como células T_{naïve}) para linfócitos T CD4⁺ e (C) T CD8⁺. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. *, p<0.05, pelo teste de Mann-Whitney.

O grupo de animais tratados com PV1 apresentou razão entre linfócitos T efetores (CD44^{hi}CD62L^{lo}) e linfócitos T *naïve* (CD44^{lo}CD62L^{hi}) significativamente menor tanto para linfócitos T CD4⁺ (Fig. 10B) quanto para linfócitos T CD8⁺ (Fig. 10C) quando comparado com o grupo de animais não tratados. Apesar de não significativo, resultados semelhantes foram observados em olhos de camundongos coletados no dia 21 pós-imunização, com menores razões entre linfócitos T efetores (CD44^{hi}CD62L^{lo}) e linfócitos T *naïve* (CD44^{lo}CD62L^{hi}) tanto para linfócitos T CD4⁺ (Fig. 11A) quanto para linfócitos T CD8⁺ (Fig. 11B).

Figura 11. Camundongos tratados com PV1 apresentaram menores frequências de linfócitos T ativados nos olhos, quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 21 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os olhos foram coletados para a imunofenotipagem dos leucócitos infiltrantes. Razão entre células T_{efetora} e T_{naïve} (definidas pela expressão de CD44 e CD62L; sendo consideradas as células T CD44^{hi}CD62L^{lo} como células T_{efetora} e as células T CD44^{lo}CD62L^{hi} como células T_{naïve}) para (A) linfócitos T CD4⁺ e (B) T CD8⁺. Os dados apresentados são a combinação de dois experimentos independentes. *, p<0.05, pelo teste de Mann-Whitney.

Além do perfil de ativação determinado pela expressão de CD44 e CD62L, outras moléculas de superfície indicam o estado de ativação de linfócitos T. Muitas dessas moléculas seguem um padrão temporal de expressão, determinando não somente se o linfócito T está ativado, mas também o estágio de ativação dessas células. A expressão da molécula de CD69 é característica de linfócitos T recém-ativados, sendo geralmente seguida pela expressão de moléculas como CTLA-4 e CD25 (cadeia α do receptor da IL-2). O PD-1 é uma molécula expressa em estágios tardios da ativação de linfócitos T, e está associada com o fenômeno de exaustão celular. Outra molécula expressa em estágios mais tardios de ativação e em condições anormais de ativação é o BTLA (*B and T lymphocyte attenuator*), associado ao fenômeno de anergia.

Dessa forma, a expressão dessas moléculas em linfócitos T infiltrando os olhos de camundongos B10.RIII imunizados para EAU foi analisada por citometria de fluxo (Fig. 12A). Observou-se um aumento na frequência de células T CD4⁺BTLA⁺ e CD4⁺BTLA⁺PD-1⁺ nos olhos de camundongos tratados com PV1 em relação aos camundongos não tratados (Fig. 12C). As frequências de células T CD4⁺ em diferentes estágios de ativação (CD69⁺CD25⁺CTLA-4⁺; CD69⁺CD25⁺CTLA-4⁺PD-1⁺; CD69⁺CTLA-4⁺PD-1⁺) encontraram-se diminuídas no grupo de animais tratados com mPEG-PV1-Fab' quando comparadas às do grupo não tratado (Fig.

12C). Contudo, as diferenças entre esses marcadores de ativação não foi significativa, muito provavelmente por conta do grande desvio padrão observado.

Figura 12. Expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórios por linfócitos T $CD4^+$ nos olhos de camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 μ g/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os olhos foram coletados para a imunofenotipagem dos leucócitos infiltrantes. (A) Estratégia de análise para definir a expressão de CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 (B) Proporção relativa das células T $CD4^+$ expressando CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 e suas possíveis combinações. (C) Frequência das células T $CD4^+$ expressando CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 e suas possíveis combinações. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. +, $p < 0.01$, pelo teste de t de Student.

Em suma, esses resultados indicam que a diminuição do grau de EAU após o bloqueio de CD28 por mPEG-PV1-Fab' é resultado de uma interferência no processo de ativação celular.

4.3 O bloqueio de CD28 com mPEG-PV1-Fab' diminui a ativação de linfócitos T nos órgãos linfóides periféricos

Para avaliar se os achados prévios estariam confinados ao microambiente inflamatório encontrado nos olhos dos camundongos com EAU, os linfonodos drenantes e o baço desses animais foram coletados no dia 14 pós-imunização para análise do perfil de ativação de

linfócitos T. É importante ressaltar que não foram encontradas diferenças nos números totais de células encontradas tanto nos dLN quanto no baço dos camundongos dos diferentes grupos experimentais (Fig. 13A). Mais ainda, frequências similares de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺, B, NKT e células NK foram observadas nos diferentes grupos experimentais (Fig. 13B). Esses resultados dão força à hipótese de que o tratamento com PV1 não possui efeitos citotóxicos ou altera a capacidade migratória de leucócitos.

Figura 13. Imunofenotipagem de leucócitos em linfonodos drenantes de camundongos tratados com PV1 ou não. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados para a imunofenotipagem. (A) Número total de leucócitos presentes nos linfonodos drenantes. (B) Frequências de subpopulações leucocitárias nos linfonodos drenantes. Os dados apresentados são representativos de dois experimentos independentes. *, p<0.05, pelo teste de Mann-Whitney.

Contudo, camundongos do grupo tratado com PV1 exibiram uma frequência significativamente menor de linfócitos T CD4⁺ efetores (CD44^{hi}CD62L^{lo}) e uma frequência significativamente maior de linfócitos T CD4⁺ *naïve* (CD44^{lo}CD62L^{hi}) tanto nos dLN (Fig. 14A) quanto no baço (Fig. 14B), quando comparados aos camundongos do grupo não tratado,

sugerindo que os efeitos do bloqueio de CD28 não estão limitados ao microambiente inflamatório do olho, mas é também visível nos órgãos linfoides periféricos.

Figura 14. Camundongos tratados com PV1 apresentaram menores frequências de linfócitos T ativados e maiores frequências de linfócitos T *naïve* em órgãos linfóide periféricos quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados para a imunofenotipagem. (A) Gráfico representativo da expressão de CD44 e CD62L por células T CD4⁺ e frequências, nos linfonodos drenantes, das células T_{efetora} e T_{naïve} (definidas pela expressão de CD44 e CD62L; sendo consideradas as células T CD44^{hi}CD62L^{lo} como células T_{efetora} e as células T CD44^{lo}CD62L^{hi} como células T_{naïve}) para linfócitos T CD4⁺ de camundongos B10.RIII. (B) Gráfico representativo da expressão de CD44 e CD62L por células T CD4⁺ e frequências, no baço, das células T_{efetora} e T_{naïve} (definidas pela expressão de CD44 e CD62L; sendo consideradas as células T CD44^{hi}CD62L^{lo} como células T_{efetora} e as células T CD44^{lo}CD62L^{hi} como células T_{naïve}) para linfócitos T CD4⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. *, p<0.05, **, p<0.01; ***, p<0.0001, pelo teste de Mann-Whitney.

Ademais, a expressão de diferentes moléculas marcadoras de ativação de linfócitos T encontrou-se alterada nos animais tratados com PV1. A expressão individual dos marcadores de ativação CD25, CD69 e PD-1 apresentou-se significativamente diminuída em linfócitos T CD4⁺ tanto nos dLN (Fig. 15A, B e C) quanto no baço (Fig. 16A, B e C) dos camundongos do grupo tratado com PV1, em relação ao grupo não tratado.

Figura 15. Linfócitos T CD4⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos tratados com PV1 apresentaram menor expressão de moléculas de ativação e co-estimulação quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados para a imunofenotipagem. (A) Gráfico representativo da expressão de CD69 por células T CD4⁺ e suas frequências nos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. (B) Gráfico representativo da expressão de CD25 por células T CD4⁺ e suas frequências nos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. (C) Gráfico representativo da expressão de PD-1 por células T CD4⁺ e suas frequências nos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. ***, p < 0.0001, pelo teste de Mann-Whitney.

Figura 16. Linfócitos T CD4⁺ no baço de camundongos tratados com PV1 apresentaram menor expressão de moléculas de ativação e co-estimulação quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e o baço foi coletado para a imunofenotipagem. (A) Gráfico representativo da expressão de CD69 por células T CD4⁺ e suas frequências no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. (B) Gráfico representativo da expressão de CD25 por células T CD4⁺ e suas frequências no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. (C) Gráfico representativo da expressão de PD-1 por células T CD4⁺ e suas frequências no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. *, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.0001, pelo teste de Mann-Whitney.

Analisando a expressão dos diferentes marcadores de ativação em conjunto, observou-se que nos animais tratados com PV1 a frequência de linfócitos T CD4⁺ em diferentes estágios de ativação, ou seja, recém ativadas (CD69⁺ e CD69⁺CD25⁺) e ativadas (CD69⁺CD25⁺PD-1 e CD69⁺CD25⁺CTLA-4⁺PD-1⁺) é significativamente menor nos dLN (Fig. 17C) e baço (Fig. 18C) em relação aos animais do grupo não tratado.

Figura 17. Expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórios por linfócitos T $CD4^+$ nos dLN de camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 μ g/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os dLN foram coletados para a imunofenotipagem de linfócitos. (A) Estratégia de análise para definir a expressão de CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 (B) Proporção relativa das células T $CD4^+$ expressando CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 e suas possíveis combinações. (C) Frequência das células T $CD4^+$ expressando CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 e suas possíveis combinações. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. +, $p < 0.01$, pelo teste de t de Student.

Figura 18. Expressão de moléculas de ativação e co-estimulatórios por linfócitos T $CD4^+$ no baço de

camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e o baço foi coletado para a imunofenotipagem de linfócitos. (A) Estratégia de análise para definir a expressão de CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 (B) Proporção relativa das células T CD4⁺ expressando CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 e suas possíveis combinações. (C) Frequência das células T CD4⁺ expressando CTLA-4, PD-1, BTLA, CD69 e CD25 e suas possíveis combinações. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. +, p<0.01, pelo teste de t de Student.

Para os linfócitos T CD8⁺ não foram encontradas diferenças significativas nas frequências de linfócitos *naïves* e efetores (Fig. 19, A e B) entre os diferentes grupos experimentais. Contudo, a expressão de CD69 (Fig. 19, C e D) e PD-1 (Fig. 19, E e F) nessas células encontrou-se diminuída tanto nos dLN quanto no baço dos camundongos tratados com PV1, quando comparados aos animais não tratados.

Figura 19. Linfócitos T CD8⁺ nos órgãos linfoides periféricos de camundongos tratados com PV1 apresentaram menor expressão de moléculas de ativação e co-estimulação quando comparados com camundongos não tratados. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes e baço foram coletados para a imunofenotipagem. Frequências das células T_{efetora} e T_{naïve} (definidas pela expressão de CD44 e CD62L; sendo consideradas as células T CD44^{hi}CD62L^{lo} como células T_{efetora} e as células T CD44^{lo}CD62L^{hi} como

células T_{naïve}) para linfócitos T CD8⁺ nos (A) linfonodos drenantes e (B) baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. Frequência de células T CD8⁺ expressando CD69 nos (C) linfonodos drenantes e (D) no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. Frequência de células T CD8⁺ expressando CD69 nos (E) linfonodos drenantes e (F) no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. *, p<0.05, **, p<0.01; ***, p<0.0001, pelo teste de Mann-Whitney.

Desta forma, observou-se que mPEG-PV1-Fab' também diminui o estado geral de ativação de linfócitos T na periferia, com a diminuição da expressão de diferentes moléculas de ativação e co-estimulação.

4.4 mPEG-PV1-Fab' possui efeito deletério na população de linfócitos T reguladores

Células T reguladoras são responsáveis por controlar a ativação e as respostas de linfócitos T e demonstrou-se a sua importância no controle de diversos modelos de doenças autoimunes (Josefowicz, 2012.) É sabido que a ativação incompleta de linfócitos T é um dos mecanismos de geração de linfócitos T_{reg}. (Waldmann, 2008; Poirier, 2010). Sendo assim, o bloqueio de CD28 com mPEG-PV1-Fab' poderia estar aumentando a frequência de linfócitos T_{reg} e assim causando a diminuição na severidade da EAU. Para testar essa hipótese as frequências e números dessas células nos dLN e baço (Fig. 20A). Surpreendentemente, o tratamento com PV1 levou a uma diminuição tanto nos números quanto nas frequências de linfócitos T_{reg} nos dLN (Fig. 20, B e C) e baço (Fig. 20, D e E).

Figura 20. O tratamento com mPEG PV1-Fab' diminui a população de linfócitos T reguladores nos órgãos linfoides periféricos. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 µg/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes e baço foram coletados para a imunofenotipagem de células T reguladoras. (A) Gráficos representativos da estratégia de *gating* para a definição da população de linfócitos T_{reg}. A expressão de Foxp3 foi definida utilizando o controle de FMO (*Fluorescence Minus One*). (B) Frequência e (C) número total de células CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ nos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. (D) Frequência e (E) número total de células CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ no baço de camundongos B10.RIII tratados ou não com PV1. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. *, p<0.05, **, p<0.01; ***, p<0.0001, pelo teste de Mann-Whitney.

Para confirmar esse aparente efeito deletério de mPEG-PV1-Fab' na população de linfócitos T reguladores, células dos linfonodos inguinais e peri-aórticos de camundongos B10.RIII *naïve* foram cultivadas por 72h na presença de estímulo inespecífico, na presença de um agonista convencional de CD28 ou na presença de mPEG-PV1-Fab'. Observou-se que o uso de PV1 mediante estímulo inespecífico levou a uma diminuição na população de

linfócitos T_{reg} . Contudo, quando utilizado sem a adição de estímulo PV1 não promove alterações na frequência da população de células T reguladoras (Fig. 21).

Figura 21. O tratamento de esplenócitos de B10.RIII *naïve* com mPEG PV1-Fab', *in vitro*, leva a uma diminuição da população de linfócitos T_{reg} . Camundongos B10.RIII *naïve* ($n = 3$ /grupo) foram sacrificados e tiveram seus baços retirados. Os esplenócitos foram colocados em cultura nas seguintes condições: não estimulados; anti-CD3 (10mg/mL) + anti-CD28 (2,5mg/mL); anti-CD3 (10mg/mL) + PV1 (2,5mg/mL); e PV1 (2,5mg/mL). Após 72h de estímulo as células foram marcadas para a população de linfócitos T reguladores.

Consequentemente, esses resultados demonstraram que o bloqueio de CD28 com mPEG-PV1-Fab' tem um efeito deletério na população de linfócitos T_{reg} . Sendo assim, a diminuição da severidade da EAU observada em animais tratados com PV1 não se deve a um aumento da população de linfócitos T_{reg} , muito embora a funcionalidade dessas células não tenha sido avaliada. Logo, a supressão da ativação de linfócitos T observada em animais tratados com PV1 se deve, provavelmente, a um efeito direto na população de células T efetoras.

4.5 O tratamento com mPEG-PV1-Fab' afeta a polarização de linfócitos para um perfil T_H1 , mas não possui efeito na polarização para o perfil T_H17

A patogênese da EAU é, em grande parte, dependente de linfócitos do perfil de resposta T_H1 (Rizzo, 1996), porém, nos últimos anos demonstrou-se que linfócitos T_H17 também possuem um papel importante na progressão da doença (Luger, 2008). Sendo assim, como os efeitos imunossupressores de PV1 não aparentaram ser dependentes de

linfócitos T reguladores, o efeito de PV1 na produção de IFN- γ , IL-17 e IL-2 por linfócitos T CD4⁺ foi avaliada nos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII dos diferentes grupos experimentais (Fig. 22A). Camundongos tratados com PV1 apresentaram uma redução na frequência e número total de linfócitos T CD4⁺IFN- γ ⁺ (Fig. 22, B, C e D) nos dLN quando comparados com camundongos não tratados. Contudo, não foram encontradas diferenças nas frequências de linfócitos CD4⁺IL-17⁺ (Fig. 22, B e C), apesar de terem sido encontrados menores números dessas células (Fig. 22F), nos linfonodos drenantes de camundongos do grupo tratado com PV1 em relação ao grupo não tratado. Apesar de não existir um marcador de superfície definitivo para células T_H1, a expressão de Tim-3 apresenta, em camundongos, uma boa correlação com a polarização para o perfil de resposta T_H1 (Monney, 2002; Rangachari, 2012). Assim sendo, foi analisada a expressão de Tim-3 em linfócitos T efetores (CD44^{hi}CD62L^{lo}) dos dLN de camundongos dos diferentes grupos experimentais. Camundongos tratados com PV1 apresentaram uma redução significativa na frequência de linfócitos CD4⁺Tim-3⁺ quando comparados com camundongos não tratados (Fig. 22E). A sinalização por CD28 é a principal via de indução de IL-2 (Riley, 2002), uma citocina que foi demonstrada crucial na polarização de linfócitos T para um perfil de resposta T_H1 (Liao, 2011). Porém, essa citocina não apresenta efeito na geração de respostas do tipo T_H17 (Liao, 2011). Tendo isso em vista, os resultados observados na produção de IFN- γ e IL-17 poderiam ser explicados com uma diminuição de IL-2, contudo, não foram observadas diferenças na frequência de células CD4⁺IL-2⁺ e CD4⁺IFN- γ ⁺IL-2⁺ (Fig. 22, B e C). Mais ainda, O tratamento com PV1 não afetou a frequência das populações de linfócitos T CD4⁺ polifuncionais (IFN- γ ⁺IL-17⁺ e IFN- γ ⁺IL-17⁺IL-2⁺), indicando uma ação específica em linfócitos do tipo T_H1 (Fig. 22, B E C).

Figura 22. mPEG PV1-Fab' diminui a produção de IFN- γ por linfócitos T CD4⁺ e a população de linfócitos T do tipo T_H1. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 μ g/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados para a marcação intracelular de citocinas. Para tal as células dos dLN foram coletadas e colocadas em cultura na concentração de 1×10^6 células/poço e estimuladas *overnight* com 100 ng/mL de PMA e 500 ng/mL de ionomicina, mais GolgiPlug na concentração recomendada pelo fabricante. (A) Estratégia de análise para definir as células produtoras de IL-2, IL-17 e IFN- γ (B) Proporção relativa das células T CD4⁺ produzindo IL-2, IL-17 e IFN- γ e suas possíveis combinações. (C) Frequência das células T CD4⁺ produzindo IL-2, IL-17 e IFN- γ e suas possíveis combinações. (D) Números de linfócitos T CD4⁺ produzindo apenas IFN- γ . (E) Gráfico representativo demonstrando a expressão de Tim-3 por linfócitos T_{eff} e frequência de células T_{eff}Tim-3⁺ nos dLN de camundongos B10.RIII tratados ou não com mPEG PV1-Fab'. (F) Números de linfócitos T CD4⁺ produzindo apenas IL-17. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. +, $p < 0.01$, pelo teste t de Student. **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$, pelo teste de Mann-Whitney.

Também não foram encontradas diferenças na produção de citocinas por linfócitos T CD8⁺ nos dLN de camundongos dos diferentes grupos experimentais (Fig. 23, A, B e C).

Figura 23. mPEG PV1-Fab' não afeta a produção de IFN- γ , IL-17 e IL-2 por linfócitos T CD8⁺. Camundongos B10.RIII fêmeas foram imunizados com 50 μ g/animal de peptídeo 161–180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. Começando no dia 9 pós-imunização, os camundongos foram tratados a cada quatro dias com o antagonista de CD28, mPEG-PV1-Fab'. No dia 14 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados para a marcação intracelular de citocinas. Para tal, as células dos dLN foram coletadas e colocadas em cultura na concentração de 1×10^6 células/poço e estimuladas *overnight* com 100 ng/mL de PMA e 500 ng/mL de ionomicina, mais GolgiPlug na concentração recomendada pelo fabricante. (A) Estratégia de análise para definir as células produtoras de IL-2, IL-17 e IFN- γ (B) Proporção relativa das células T CD8⁺ produzindo IL-2, IL-17 e IFN- γ e suas possíveis combinações. (C) Frequência das células T CD8⁺ produzindo IL-2, IL-17 e IFN- γ e suas possíveis combinações. Os dados apresentados são a combinação de três experimentos independentes. +, $p < 0.01$, **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.0001$, pelo teste t de Student.

Para confirmar essa hipótese, os dLN de camundongos B10.RIII imunizados para EAU foram coletados no dia 7 pós-imunização e suas células foram cultivadas na presença do peptídeo 161-180 da IRBP por 48h, na presença ou não de mPEG-PV1-Fab'.

Figura 24. mPEG PV1-Fab' diminui a frequência de linfócitos T $CD4^+FN-\gamma^+$ após re-estímulo, *in vitro*, de células dos dLN com peptídeo 161-180 da IRBP. Camundongos B10.RIII fêmeas ($n = 3$) foram imunizados com 50 $\mu\text{g}/\text{animal}$ de peptídeo 161-180 da IRBP em CFA (2,5mg/mL), mais um reforço de 500 ng/animal de PTx. No dia 7 pós-imunização os camundongos foram sacrificados e os linfonodos drenantes foram coletados e macerados em conjunto. Após a obtenção das células, as mesmas foram incubadas, na concentração de 1×10^6 células/poço, por 2h com PV1 e em seguida estimuladas com peptídeo 161-180 da IRBP por 48h (pep+PV1). Como controles foram utilizadas células não estimuladas e não tratadas (NE), não estimuladas e tratadas com PV1 (NE+PV1) e estimuladas com peptídeo 161-180 da IRBP e não tratadas (pep). Nas última 6h de estímulo GolgiPlug foi adicionado na cultura na concentração recomendada pelo fabricante. (A) Proporção relativa das células T $CD4^+$ produzindo IL-2, IL-17 e IFN- γ e suas possíveis combinações. (B) Frequência das células T $CD4^+$ produzindo IL-2, IL-17 e IFN- γ e suas possíveis combinações. Os dados apresentados são a combinação de dois experimentos independentes. +, $p < 0.01$, pelo teste t de Student.

Observou-se que a produção de IFN- γ diminuiu significativamente quando as células dos dLN foram desafiadas com peptídeo 161-180 da IRBP na presença de PV1, quando comparadas com o grupo controle (Fig. 24, A e B). Não foram observadas diferenças na produção de IL-17 e IL-2 entre as diferentes condições experimentais (Fig. 24, A e B).

De modo geral, esses resultados sugerem que mEG-PV1-Fab' inibe a produção de IFN- γ por linfócitos T $CD4^+$, diminuindo as células do perfil T_H1 , mas não possui nenhum efeito na produção de IL-17.

5 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi demonstrado que o bloqueio de CD28 utilizando-se um fragmento Fab monovalente foi efetivo no tratamento da uveíte autoimune experimental. Esse resultado está de acordo com estudos prévios (Silver, 2000; Perrin, 1999; Jang 2008), e com a hipótese inicial, já que molécula de CD28 possui um importante papel na ativação de linfócitos T, confirmando essa estratégia como uma opção terapêutica válida para o tratamento da uveíte autoimune. Contudo, esse é o primeiro estudo que utiliza um fragmento Fab monovalente anti-CD28 para o tratamento da EAU, garantindo a ausência de efeitos adversos por conta da porção efetora Fc do anticorpo, ou da reatividade cruzada com a molécula CTLA-4 (Poirier, 2010, 2012b). A ausência de efeitos adversos aparentes, como perda de peso e morte, em camundongos tratados com mPEG-PV1-Fab' corrobora a ideia de maior segurança garantida por essa estratégia. A diminuição na incidência de EAU observada no grupo de camundongos tratados com PV1 em relação aos grupos não-tratado e tratado com NHS pode ser reflexo de uma drenagem desigual dos antígenos oculares e adjuvantes durante a imunização com um consequente atraso na iniciação da resposta autoimune. Esse poderia ser o caso, já que em modelo de EAE o tratamento com mAb-PV1 levou a uma diminuição do grau médio de doença, mas não teve efeito na incidência da mesma (Perrin, 1999). Desta forma, no presente estudo, o bloqueio de CD28 poderia estar ocorrendo em diferentes etapas dessa resposta influenciando a indução da doença. Sendo assim, outros estudos são necessários para explorar os efeitos de PV1 diretamente em células T *naïve*, em células T durante o processo de apresentação de antígeno, ou em linfócitos T terminalmente diferenciados, visto que células *naïve* e de memória apresentam diferentes requerimentos de sinais co-estimulatórios (Boesteanu, 2009). Além de auxiliar na identificação dos mecanismos de ação de mPEG-PV1-Fab' os resultados obtidos poderiam auxiliar a elucidar o papel de CD28 no início da resposta autoimune e na patogênese da EAU.

A diminuição do grau médio de EAU nos camundongos tratados com o controle policlonal mPEG NHS-Fab' pode ser devido a natureza policlonal deste, que poderia estar se ligando a diferentes moléculas e afetando diferentes vias de sinalização, inclusive vias necessárias para a manutenção de uma resposta imune eficiente. Somado a isso, temos que a EAU é um modelo bastante sensível a introdução de agentes externos, sendo que até mesmo a inoculação de ovalbumina (OVA) pode levar a uma leve diminuição do grau médio

de doença (Rizzo, 2014, comunicação oral)¹.

Diferentes imunoterapias promovem seus efeitos supressores através do sequestro de linfócitos nos órgãos linfoides periféricos, e assim prevenindo a migração de células patogênicas para tecidos inflamados; esse é o caso do FTY720 (Commodaro, 2010) e de anticorpos monoclonais como o natalizumab (Börnsen, 2012; Zanotti, 2012). A molécula de CD28 está implicada no controle da circulação de linfócitos T autorreativos através da sinalização via ITK (*IL-2-inducible Tec kinase*) (Jain, 2013). Portanto, o bloqueio de CD28 utilizando mPEG PV1-Fab' poderia reduzir a migração de linfócitos T para os olhos inflamados, acarretando um menor dano tecidual e, conseqüentemente, menor grau de doença. Porém, a falta de diferenças entre os grupos tratado com PV1 e não tratado com relação ao número total de células nos linfonodos e infiltrando os olhos desses camundongos torna essa hipótese pouco provável. Mesmo a redução na frequência de linfócitos T CD4⁺ infiltrando os olhos dos animais tratados com PV1 não dá suporte a essa hipótese, já que esse achado não foi acompanhado de uma redução no número total dessas células. De qualquer forma, para que tal hipótese pudesse ser excluída de forma peremptória, a expressão de marcadores de *homing*, como por exemplo os receptores de quimiocina CXCR3, que medeia a migração de linfócitos T_H1 (Coursey, 2014), CCR6, para linfócitos T_H17 (Dohlman, 2013), e CXCR4, que está envolvido na migração de leucócitos para o tecido ocular (Zhang, 2009), deveria ter sido analisada. Pela mesma razão dos números e frequências de células semelhantes infiltrando os olhos e presentes nos órgãos linfoides periféricos dos animais tratados ou não com PV1, a hipótese de que esse anticorpo tenha a sua ação baseada na indução de apoptose é pouco provável. Somado a isso, em um modelo experimental de transplante cardíaco, Jang e colaboradores (2008), ao usarem o anticorpo PV1-IgG3 não observaram diferenças na expressão, em esplenócitos, de moléculas relacionadas à apoptose, como Bax, Bcl-2, Bcl-xl, em relação a ratos não tratados. Apesar de no estudo citado anteriormente do anticorpo utilizado ser do tipo IgG3, e não um fragmento Fab monovalente, e ter sido utilizado um modelo experimental de transplante, e não de autoimunidade, os dados obtidos corroboram as observações do presente estudo, indicando que mPEG PV1-Fab' não induz morte celular induzida por ativação (AICD). Contudo, para excluir essa hipótese ensaios específicos para a detecção de apoptose deveriam ter sido

¹ Rizzo LV, São Paulo, 2014

realizados.

Todavia, a diminuição da razão entre os linfócitos T infiltrantes efetores e *naïve* observada no grupo tratado com PV1 quando comparado ao grupo não tratado levanta a hipótese de que mPEG PV1-Fab' poderia estar impedindo a ativação completa dos linfócitos T. Além disso, observou-se uma diminuição em diferentes populações de linfócitos T CD4⁺ ativados expressando diferentes moléculas marcadoras de ativação e coestimulação (CD69⁺CD25⁺CTLA-4⁺; CD69⁺CD25⁺CTLA-4⁺PD-1⁺; CD69⁺CTLA-4⁺PD-1⁺) e um aumento nas populações de células CD4⁺ expressando BTLA (BTLA⁺ e BTLA⁺PD-1⁺), uma molécula cuja expressão é associada ao estado de anergia (Hurchla, 2005), mas tal diferença não se mostrou estatisticamente significativa, muito provavelmente por conta do alto desvio padrão observado. O alto desvio padrão encontrado poderia ser explicado ao levarmos em consideração que o olho inflamado é um ambiente que apresenta um equilíbrio dinâmico (principalmente no dia considerado, onde temos o pico de migração celular), com células inflamatórias chegando ao tecido, altas taxas de morte celular e liberação de mediadores inflamatórios. Além disso, esse alto desvio padrão está de acordo com aquele encontrado para a graduação de EAU nos animais tratados com PV1 (Fig. 1), mostrando que fatores individuais de cada camundongo poderiam estar influenciando na progressão da doença. De qualquer forma, os dados obtidos indicam que nos animais tratados, há uma menor frequência de populações de células efetoras e ativadas e uma maior frequência de células, possivelmente, anérgicas sugerindo que PV1 prejudica a ativação de linfócitos T CD4⁺ e os leva a um estado de não-resposta. Em relação aos linfócitos T CD8⁺ também se observou um aumento na frequência de células *naïve* e uma diminuição na população de células ativadas, reforçando a ideia de que o tratamento com PV1 interfere na ativação completa de linfócitos T, impedindo que essas células causem dano no órgão alvo.

Nos órgãos linfoides periféricos de camundongos tratados com mPEG PV1-Fab' também foram observadas menores frequências de linfócitos T CD4⁺ efetores e uma maior frequência de linfócitos T *naïve* confirmando que o anticorpo utilizado bloqueia a ativação de linfócitos T e que esse fenômeno tem implicações sistêmicas e não está confinado ao microambiente inflamatório dos olhos. De acordo com a teoria dos “dois sinais” para a ativação de linfócitos T, o engajamento de CD28 com seus ligantes leva a expressão de moléculas marcadoras de ativação e outras moléculas co-estimulatórias além de inibir a expressão de moléculas co-inibitórias (van Berkel, 2006). Particularmente o aumento da

expressão de CD25 (cadeia α do receptor da IL-2) é característico da sinalização CD28 através da indução de IL-2 (Riley, 2002). O eixo CD28-IL-2 também tem um importante papel na indução de PD-1, sendo a produção de IL-2 após a ativação de CD28 responsável pela inibição da expressão de PD-1 (Bennet, 2003). Assim, esperava-se que o bloqueio de CD28 gerasse sinais inibitórios mediados pelo aumento da expressão de moléculas co-inibitórias (Poirier, 2010). Os resultados obtidos, contudo, indicam o contrário: tanto a expressão das moléculas de ativação e co-estimulação, quanto as moléculas co-inibitórias encontraram-se diminuídas no grupo de camundongos tratado com PV1. O modelo clássico dos “dois sinais” ajudou a elucidar diversos mecanismos do sistema imunológico, entretanto, diversos estudos recentes começaram a se opor a essa visão simplificada da ativação de linfócitos T levando Zhu e colaboradores (2011) a revisar esse modelo. Em contraste, propuseram um “modelo de maré” (do inglês, *tide model*) que compara o processo de ativação das células do sistema imunológico com o fenômeno da maré, sendo a interação entre diferentes moléculas co-estimulatórias e co-inibitórias responsável pela subida e descida da “maré de ativação”. Sob a ótica dessa teoria, os resultados obtidos parecem apropriados. Como o CD28 é constitutivamente expresso em linfócitos T (Greenfield, 1997) e um dos primeiros sinais co-estimulatórios acionados após ativação, o bloqueio dessa via de sinalização levaria à inibição da expressão de moléculas de superfície, como CD69, CD25, CTLA-4 e PD-1, que, por sua vez, direcionariam a resposta imune para um padrão de não-resposta. E, de fato, observou-se uma diminuição significativa da expressão dessas moléculas em linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos camundongos tratados com PV1, quando comparados aos controles não tratados. Além disso observou-se uma diminuição da frequência de diversas populações de linfócitos T em diferentes estágios de ativação nesses animais, corroborando a hipótese levantada anteriormente. No entanto, não se observou um aumento nas frequências das populações de linfócitos BTLA⁺ nos órgãos linfoides periféricos, ao contrário do que se observou nos olhos dos camundongos do grupo tratado com mPEG PV1-Fab'. Contudo, é sabido que esse fenômeno surge durante a apresentação de antígenos, e é caracterizado pela interrupção na produção de IL-2 e pela expressão de algumas moléculas de superfície, como BTLA (Schwartz, 2003). Portanto, a ativação incompleta dos linfócitos T na periferia poderia condicioná-los a um estado de anergia que se manifestaria no sítio inflamatório mediante o reencontro de antígenos oculares, explicando assim os dados obtidos. Outra explicação para esses resultados seria que o bloqueio de CD28 em linfócitos presentes no

olho inflamado e recebendo uma grande quantidade de sinais pró-inflamatórios e de ativação, pode ter consequências diferentes do bloqueio de CD28 em linfócitos presentes na periferia. Essas hipóteses, entretanto, perderam força após ser observado que o re-estímulo de células dos linfonodos drenantes com o peptídeo 161-180 da IRBP, na presença ou não de mPEG PV1-Fab', não levou a uma diminuição nos linfócitos T $CD4^+IL-2^+$ indicando que talvez a indução de anergia não seja o mecanismo de ação de PV1. Para a exclusão completa dessa hipótese, a dosagem de IL-2 no sobrenadante de cultura do experimento citado anteriormente deveria ter sido realizada, além de se ter avaliado a produção dessa citocina por linfócitos T infiltrantes.

O controle da ativação e expansão de linfócitos T é a principal função dos linfócitos T reguladores. Células T_{reg} podem ser geradas na periferia com o intuito de manter a tolerância periférica e o controle das respostas a antígenos externos (Josefowicz, 2012). A supressão da atividade das células T pode ser alcançada de diversas formas, sendo uma delas a privação de IL-2 (Pandiyar, 2007), que afeta a proliferação e sobrevivência de linfócitos T. A ativação incompleta de linfócitos T, com a ausência de sinais coestimulatórios pode levar a anergia ou geração de linfócitos T_{reg} (Waldmann, 2008). E, de fato, o uso de anticorpos anti-CD28 monovalentes mostrou-se capaz de aumentar a função desses linfócitos (Poirier, 2010), levantando a hipótese de que o bloqueio de CD28 com mPEG PV1-Fab' poderia promover a geração de células T_{reg} , que estariam, por sua vez, impedindo a ativação dos linfócitos T nos órgãos linfoides periféricos e assim diminuindo a severidade da EAU. Contudo, os camundongos tratados com PV1 exibiram menores frequências e números totais de linfócitos T_{reg} nos órgãos linfoides periféricos, sugerindo um efeito deletério desse anticorpo nessa subpopulação de linfócitos T. Apesar dessa redução, não se pode excluir o fato de que as células T_{reg} poderiam ter migrado para os olhos inflamados de modo mais eficiente (Poirier, 2010) no grupo tratado com PV1, quando comparado ao grupo não tratado. Apesar das populações de linfócitos T $CD4^+CD25^+CTLA-4^+$ e $CD25^+CTLA-4^+PD-1^+$, indicativas da população de células T reguladoras (Arvey, 2014; Bodhankar, 2012), apresentarem frequências menores nos olhos dos camundongos tratados, a falta de marcação específica para o fator de transcrição Foxp3 não permite a exclusão dessa hipótese. Além disso, a diminuição da população de linfócitos T_{reg} após cultura *in vitro* com PV1 e estímulo inespecífico adiciona mais um indício da atividade deletéria desse anticorpo nessa população de células. Apesar de não esperado, esses resultados estão de acordo com

achados prévios que sugerem um papel importante de CD28 na manutenção da homeostase de linfócitos T reguladores na periferia (Gogishvili, 2012; Zhang, 2013). Ainda assim, esses resultados precisam ser explorados mais a fundo já que esse tópico ainda é bastante controverso e ainda existe uma dúvida quanto a real importância de CD28 para os linfócitos T_{reg} na periferia (Guo, 2008). Por enquanto, nossos dados reforçam a ideia de dependência de sinalização via CD28 para a manutenção e sobrevivência das células T_{reg} na periferia.

Como observado, a supressão da ativação de linfócitos T não está ligada a um aumento da população de linfócitos T reguladores, portanto os efeitos do bloqueio de CD28 deveriam ser direcionados aos linfócitos T efetores. E esses efeitos se mostraram direcionados à produção de IFN- γ e na homeostase da população de linfócitos T_{H1}. A diminuição da produção de IFN- γ e a frequência diminuída de linfócitos T_{H1} poderiam explicar a eficiência de mPEG PV1-Fab' no controle da EAU (Kaufmann, 2012; Kwak, 2001), e a permanência de linfócitos T produtores de IL-17 poderiam explicar a doença residual encontrada em alguns animais. Esses dados estão de acordo com os relatos da literatura que mostram que o bloqueio de B7.1 e B7.2 leva a uma diminuição da produção de IFN- γ por células dos linfonodos drenantes e menores graus de EAU (Silver, 2000), e que o uso de PV1-IgG3 em modelo de transplante leva a uma menor expressão de RNA mensageiro para IFN- γ nos enxertos dos ratos utilizados (Jang, 2008). Não está claro, porém, se PV1 age na geração dos linfócitos T_{H1}, prevenindo a sua polarização, ou se o anticorpo age em células do tipo T_{H1} terminalmente diferenciadas, bloqueando sinais de sobrevivência nessa população de células. Essa última hipótese aparenta ser mais provável, já que no dia 9 pós-imunização, quando foi iniciado o tratamento com PV1, a maioria dos linfócitos T específicos para o peptídeo 161-180 da IRBP já teriam sido ativados. Além disso, células dos linfonodos drenantes de camundongos B10.RIII não tratados após tratamento, *in vitro*, com mPEG PV1-Fab' exibem uma menor frequência de linfócitos T_{H1} após re-estímulo com o peptídeo 161-180 da IRBP. Esse experimento mimetiza, de certa forma, o que acontece *in vivo*, já que após ativação os linfócitos T migram para os olhos onde reencontrarão o antígeno ocular por qual foram ativados. Portanto, esses dados dão mais força à hipótese de que mPEG PV1-Fab' esteja agindo em linfócitos T terminalmente diferenciados. Todavia, a indução de uma resposta imune é um processo dinâmico e por conta de fenômenos como *epitope spreading* ou a contínua disponibilidade de antígenos oculares nesse protocolo de imunização não se pode excluir que a ação de PV1 ocorre também, ou tão somente, em linfócitos T *naïve*. Um

melhor entendimento dessa questão auxiliaria na elucidação do mecanismo de ação de mPEG PV1-Fab', além de auxiliar na definição dos melhores esquemas terapêuticos para o uso dessa estratégia na prática clínica.

Diferentes estudos demonstraram que diferentes moléculas co-estimulatórias são responsáveis pela indução de diferentes citocinas e, conseqüentemente, diferente polarização da resposta de linfócitos T (Camperio, 2014; Rudulier, 2014). A sinalização por CD28 é a principal via de indução de IL-2 (Riley, 2002), uma citocina que demonstrou-se ser crucial para o desenvolvimento de respostas do tipo T_H1 (Liao, 2011). Ao mesmo tempo, essa citocina apresenta efeito deletério na geração de respostas do tipo T_H17 (Liao, 2011). Nesse estudo, observou-se uma diminuição da população de linfócitos T_H1 enquanto a frequência da população de linfócitos T_H17 se manteve constante. Os menores números absolutos encontrados para a população de linfócitos T_H17 podem ser encarados como um reflexo da diminuição dos sinais inflamatórios nos animais tratados com PV1 e não como um efeito direto do anticorpo nessa subpopulação de linfócitos T, já que nos experimentos *in vitro* essa população não foi afetada. Somado a isso observou-se a diminuição de células T_{reg} , uma população de células conhecidamente dependente da sinalização via IL-2 para a sobrevivência. Portanto, era esperado que o bloqueio de CD28 por mPEG PV1-Fab' poderia estar interferindo na produção de IL-2 e assim explicar os efeitos observados no tratamento. Esse seria um mecanismo que estaria de acordo com o modelo utilizado, já que essa estratégia de intervenção na via de sinalização da IL-2 já se mostrou eficiente na EAU com a utilização de anticorpos anti-IL-2R, que deu origem ao anticorpo monoclonal daclizumab (Nussenblatt, 1999; Roberge, 1989; Yeh, 2008). Além disso, estudos utilizando PV1-IgG3 ou mAb-PV1 demonstraram diminuição na produção de IL-2 (Jang, 2008; Perrin, 1999). Contudo, no presente estudo, não foi observada diminuição da frequência de linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ produtores de IL-2, deixando em aberto o mecanismo pelo qual mPEG PV1-Fab' diminui a produção de IFN- γ e interfere na homeostase da população de linfócitos T_H1 . Como dito anteriormente, porém, para se excluir a interferência da via de IL-2 como mecanismo de ação de PV1, essa citocina deveria ter sido dosada no sobrenadante das culturas de células de linfonodos drenantes, e a população de linfócitos T produtores de IL-2 deveria ter sido avaliada nos olhos dos animais, tratados ou não com o anticorpo em questão. De qualquer maneira, a ação de mPEG PV1-Fab' aparenta ser direcionada especificamente à população de células do tipo T_H1 já que mesmo as populações de

linfócitos polifuncionais ($\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-17}^+$ e $\text{IFN-}\gamma^+\text{IL-17}^+\text{IL-2}^+$) não sofreram alteração após bloqueio de CD28.

6 CONCLUSÃO

Nesse estudo foi demonstrado que mPEG PV1-Fab', um novo antagonista monovalente de CD28, é uma ferramenta promissora para o tratamento de doenças autoimunes, em especial a uveíte autoimune. O uso desse anticorpo leva a uma diminuição do estado de ativação dos linfócitos T, tanto na periferia quanto no sítio inflamatório. Essa supressão da resposta imune não está ligada ao aumento da população de linfócitos T reguladores, como se esperava, já que o tratamento diminuiu as frequências dessa população *in vitro*, nos órgãos linfoides periféricos e possivelmente no tecido alvo da doença. O efeito de PV1, no entanto, é direcionado aos linfócitos T efetores, em particular aos linfócitos do tipo T_H1, sugerindo que o bloqueio de CD28 com mPEG-PV1-Fab' age na homeostase dessa população. Diferentemente dos relatos encontrados na literatura, não foi observada diferença nas células T CD4⁺ e CD8⁺ produtoras de IL-2. Contudo, diferentes facetas do bloqueio de CD28 ainda necessitam ser estudadas para se evitar efeitos indesejados no futuro. Um melhor entendimento dos efeitos de PV1 e da sinalização de CD28 na manutenção de células T reguladoras na periferia é de suma importância, já que a importância dessa população celular em doenças autoimunes e outras desordens imunológicas vêm ganhando bastante atenção. Além disso, seria interessante investigar a especificidade da imunossupressão causada por mPEG-PV1-Fab' e seus efeitos durante uma infecção, por exemplo, já que o foco das pesquisas de novas estratégias imunomodulatórias são terapias mais específicas e que não comprometam a resposta imune como um todo. Por fim, conhecer os mecanismos de ação de mPEG PV1-Fab' é crucial para que um dia essa estratégia de imunomodulação possa vir a ser utilizada na uveíte autoimune humana, e em outras doenças autoimunes.

REFERÊNCIAS²

Abe R, Vandenberghe P, Craighead N, Smoot DS, Lee KP, June CH. Distinct signal transduction in mouse CD4+ and CD8+ splenic T cells after CD28 receptor ligation. *J Immunol.* 1995;154(3):985-97.

Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, et al. TH17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nature Medicine.* 2007;13(6):711-8.

Arvey A, van der Veen J, Samstein RM, Feng Y, Stamatoyannopoulos JA, Rudensky AY. Inflammation-induced repression of chromatin bound by the transcription factor Foxp3 in regulatory T cells. *Nature Immunology.* 2014;15(6):580-7.

Bennett F, Luxenberg D, Ling V, Wang IM, Marquette K, Lowe D, et al. Program death-1 engagement upon TCR activation has distinct effects on costimulation and cytokine-driven proliferation: attenuation of ICOS, IL-4, and IL-21, but not CD28, IL-7, and IL-15 responses. *J Immunol.* 2003;170(2):711-8.

Bodhankar S, Vandembark AA, Offner H. Oestrogen treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis requires 17beta-oestradiol-receptor-positive B cells that up-regulate PD-1 on CD4+ Foxp3+ regulatory T cells. *Immunology.* 2012;137(4):282-93.

Boesteanu AC, Katsikis PD. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Seminars in Immunology.* 2009;21(2):69-77.

Bornsen L, Christensen JR, Ratzer R, Oturai AB, Sorensen PS, Sondergaard HB, et al. Effect of natalizumab on circulating CD4+ T-cells in multiple sclerosis. *PloS One.* 2012;7(11):e47578.

Camperio C, Muscolini M, Volpe E, Di Mitri D, Mechelli R, Buscarinu MC, et al. CD28 ligation in the absence of TCR stimulation up-regulates IL-17A and pro-inflammatory cytokines in relapsing-remitting multiple sclerosis T lymphocytes. *Immunology Letters.* 2014;158(1-2):134-42.

Carrera Silva EA, Chan PY, Joannas L, Errasti AE, Gagliani N, Bosurgi L, et al. T cell-derived protein S engages TAM receptor signaling in dendritic cells to control the magnitude of the immune response. *Immunity.* 2013;39(1):160-70

Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *The Journal of Clinical Investigation.* 2010;120(9):3073-83

² De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors. [Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Caspi RR, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ. The mouse as a model of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU). *Current Eye Research*. 1990;9 Suppl:169-74.

Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, et al. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol*. 1988;140(5):1490-5.

Chan CC, Caspi RR, Ni M, Leake WC, Wiggert B, Chader GJ, et al. Pathology of experimental autoimmune uveoretinitis in mice. *Journal of Autoimmunity*. 1990;3(3):247-55.

Commodaro AG, Peron JP, Lopes CT, Arslanian C, Belfort R, Jr., Rizzo LV, et al. Evaluation of experimental autoimmune uveitis in mice treated with FTY720. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(5):2568-74.

Cordero-Coma M, Yilmaz T, Onal S. Systematic review of anti-tumor necrosis factor-alpha therapy for treatment of immune-mediated uveitis. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2013;21(1):12-20.

Coursey TG, Bohat R, Barbosa FL, Pflugfelder SC, de Paiva CS. Desiccating Stress-Induced Chemokine Expression in the Epithelium Is Dependent on Upregulation of NKG2D/RAE-1 and Release of IFN-gamma in Experimental Dry Eye. *J Immunol*. 2014.

Dohlman TH, Chauhan SK, Kodati S, Hua J, Chen Y, Omoto M, et al. The CCR6/CCL20 axis mediates Th17 cell migration to the ocular surface in dry eye disease. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2013;54(6):4081-91.

Foster CS, Tufail F, Waheed NK, Chu D, Miserocchi E, Baltatzis S, et al. Efficacy of etanercept in preventing relapse of uveitis controlled by methotrexate. *Archives of Ophthalmology*. 2003;121(4):437-40.

Fukai T, Okada AA, Sakai J, Kezuka T, Keino H, Usui M, et al. The role of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in mice with experimental autoimmune uveoretinitis. *Graefes's archive for clinical and experimental ophthalmology = Albrecht von Graefes Archiv fur Klinische und Experimentelle Ophthalmologie*. 1999;237(11):928-33.

Furst DE, Clarke A, Fernandes AW, Bancroft T, Gajria K, Greth W, et al. Medical costs and healthcare resource use in patients with lupus nephritis and neuropsychiatric lupus in an insured population. *Journal of Medical Economics*. 2013;16(4):500-9.

Furst DE, Fernandes AW, Iorga SR, Greth W, Bancroft T. Annual medical costs and healthcare resource use in patients with systemic sclerosis in an insured population. *The Journal of Rheumatology*. 2012;39(12):2303-9.

Gasparin F, Takahashi BS, Scolari MR, Gasparin F, Pedral LS, Damico FM. Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arquivos Brasileiros de Oftalmologia*. 2012;75(2):143-7.

Giles AR. Guidelines for the use of animals in biomedical research. *Thrombosis and Haemostasis*. 1987;58(4):1078-84.

Gogishvili T, Luhder F, Goebbels S, Beer-Hammer S, Pfeffer K, Hunig T. Cell-intrinsic and -extrinsic control of Treg-cell homeostasis and function revealed by induced CD28 deletion. *European Journal of Immunology*. 2013;43(1):188-93.

Grajewski RS, Hansen AM, Agarwal RK, Kronenberg M, Sidobre S, Su SB, et al. Activation of invariant NKT cells ameliorates experimental ocular autoimmunity by a mechanism involving innate IFN-gamma production and dampening of the adaptive Th1 and Th17 responses. *J Immunol*. 2008;181(7):4791-7.

Greenfield EA, Howard E, Paradis T, Nguyen K, Benazzo F, McLean P, et al. B7.2 expressed by T cells does not induce CD28-mediated costimulatory activity but retains CTLA4 binding: implications for induction of antitumor immunity to T cell tumors. *J Immunol*. 1997;158(5):2025-34.

Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Critical Reviews in Immunology*. 1998;18(5):389-418.

Greenwald RJ, Oosterwegel MA, van der Woude D, Kubal A, Mandelbrot DA, Boussiotis VA, et al. CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *European Journal of Immunology*. 2002;32(2):366-73.

Gritz DC, Wong IG. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology*. 2004;111(3):491-500;

Guinan EC, Gribben JG, Boussiotis VA, Freeman GJ, Nadler LM. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood*. 1994;84(10):3261-82.

Guo F, Iclozan C, Suh WK, Anasetti C, Yu XZ. CD28 controls differentiation of regulatory T cells from naive CD4 T cells. *J Immunol*. 2008;181(4):2285-91.

Hamrah P, Dana MR. Corneal antigen-presenting cells. *Chemical Immunology and Allergy*. 2007;92:58-70.

Hardy KM, Perry HO, Pingree GC, Kirby TJ, Jr. Benign mucous membrane pemphigoid. *Archives of Dermatology*. 1971;104(5):467-75.

Hollsberg P, Scholz C, Anderson DE, Greenfield EA, Kuchroo VK, Freeman GJ, et al. Expression of a hypoglycosylated form of CD86 (B7-2) on human T cells with altered binding properties to CD28 and CTLA-4. *J Immunol*. 1997;159(10):4799-805.

Hurchla MA, Sedy JR, Gavrieli M, Drake CG, Murphy TL, Murphy KM. B and T lymphocyte attenuator exhibits structural and expression polymorphisms and is highly induced in anergic CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 2005;174(6):3377-85.

Jain N, Miu B, Jiang JK, McKinstry KK, Prince A, Swain SL, et al. CD28 and ITK signals regulate autoreactive T cell trafficking. *Nature Medicine*. 2013;19(12):1632-7.

Jang MS, Pan F, Erickson LM, Fisniku O, Crews G, Wynn C, et al. A blocking anti-CD28-specific antibody induces long-term heart allograft survival by suppression of the PKC theta-JNK signal pathway. *Transplantation*. 2008;85(7):1051-5.

Jiang HR, Lumsden L, Forrester JV. Macrophages and dendritic cells in IRBP-induced experimental autoimmune uveoretinitis in B10RIII mice. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1999;40(13):3177-85.

Jones LS, Rizzo LV, Agarwal RK, Tarrant TK, Chan CC, Wiggert B, et al. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J Immunol*. 1997;158(12):5997-6005.

Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annual Review of Immunology*. 2012;30:531-64.

Kaufmann U, Diedrichs-Mohring M, Wildner G. Dynamics of intraocular IFN-gamma, IL-17 and IL-10-producing cell populations during relapsing and monophasic rat experimental autoimmune uveitis. *PloS One*. 2012;7(11):e49008.

Kitaichi N, Kotake S, Morohashi T, Onoe K, Ohno S, Taylor AW. Diminution of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) in mice depleted of NK cells. *Journal of leukocyte biology*. 2002;72(6):1117-21.

Kwak HJ, Yang YS, Pae HO, Kim YM, Chung HT. Exogenous nitric oxide inhibits experimental autoimmune uveoretinitis development in Lewis rats by modulation of the Th1-dependent immune response. *Molecules and Cells*. 2001;12(2):178-84.

La Heij E, Kuijpers RW, Baarsma SG, Kijlstra A, van der Weiden M, Mooy CM. Adhesion molecules in iris biopsy specimens from patients with uveitis. *The British Journal of Ophthalmology*. 1998;82(4):432-7.

Li Z, Lim WK, Mahesh SP, Liu B, Nussenblatt RB. Cutting edge: in vivo blockade of human IL-2 receptor induces expansion of CD56(bright) regulatory NK cells in patients with active uveitis. *J Immunol*. 2005;174(9):5187-91.

Liao W, Lin JX, Wang L, Li P, Leonard WJ. Modulation of cytokine receptors by IL-2 broadly regulates differentiation into helper T cell lineages. *Nature Immunology*. 2011;12(6):551-9.

Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *The Journal of Experimental Medicine*. 2008;205(4):799-810.

Maca SM, Wagner J, Weingessel B, Vecsei-Marlovits PV. Acute anterior uveitis is associated with depression and reduction of general health. *The British Journal of Ophthalmology*.

2013;97(3):333-7.

Medawar PB. Immunological tolerance. *Nature*. 1961;189:14-7.

Monney L, Sabatos CA, Gaglia JL, Ryu A, Waldner H, Chernova T, et al. Th1-specific cell surface protein Tim-3 regulates macrophage activation and severity of an autoimmune disease. *Nature*. 2002;415(6871):536-41.

Nussenblatt RB. The natural history of uveitis. *International Ophthalmology*. 1990;14(5-6):303-8.

Nussenblatt RB, Fortin E, Schiffman R, Rizzo L, Smith J, Van Veldhuisen P, et al. Treatment of noninfectious intermediate and posterior uveitis with the humanized anti-Tac mAb: a phase I/II clinical trial. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1999;96(13):7462-6.

Onkamo P, Vaananen S, Karvonen M, Tuomilehto J. Worldwide increase in incidence of Type I diabetes--the analysis of the data on published incidence trends. *Diabetologia*. 1999;42(12):1395-403.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*. 2007;8(12):1353-62.

Papotto PH, Marengo EB, Sardinha LR, Goldberg AC, Rizzo LV. Immunotherapeutic strategies in autoimmune uveitis. *Autoimmunity Reviews*. 2014.

Pennesi G, Mattapallil MJ, Sun SH, Avichezer D, Silver PB, Karabekian Z, et al. A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice. *The Journal of Clinical Investigation*. 2003;111(8):1171-80.

Perrin PJ, June CH, Maldonado JH, Ratts RB, Racke MK. Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 1999;163(3):1704-10.

Poirier N, Azimzadeh AM, Zhang T, Dilek N, Mary C, Nguyen B, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Science Translational Medicine*. 2010;2(17):17ra0.

Poirier N, Blancho G, Vanhove B. CD28-specific immunomodulating antibodies: what can be learned from experimental models? *American Journal of Transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons*. 2012;12(7):1682-90.

Poirier N, Mary C, Dilek N, Hervouet J, Minault D, Blancho G, et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody. *American Journal of Transplantation : official journal of the American Society of*

Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons. 2012;12(10):2630-40.

Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, Chen A, et al. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nature Medicine*. 2012;18(9):1394-400.

Riley JL, Mao M, Kobayashi S, Biery M, Burchard J, Cavet G, et al. Modulation of TCR-induced transcriptional profiles by ligation of CD28, ICOS, and CTLA-4 receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99(18):11790-5.

Rizzo LV, Silver P, Wiggert B, Hakim F, Gazzinelli RT, Chan CC, et al. Establishment and characterization of a murine CD4⁺ T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice. *J Immunol*. 1996;156(4):1654-60.

Roberge FG, Lorberboum-Galski H, Le Hoang P, de Smet M, Chan CC, Fitzgerald D, et al. Selective immunosuppression of activated T cells with the chimeric toxin IL-2-PE40. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis. *J Immunol*. 1989;143(11):3498-502.

Roederer M, Nozzi JL, Nason MC. SPICE: exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. *Cytometry Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*. 2011;79(2):167-74.

Roitt IM. The role of autoantigens in the driving of autoimmune diseases. *Immunology Series*. 1993;59:119-29. Epub 1993/01/01.

Rudulier CD, McKinstry KK, Al-Yassin GA, Kroeger DR, Bretscher PA. The number of responding CD4 T cells and the dose of antigen conjointly determine the TH1/TH2 phenotype by modulating B7/CD28 interactions. *J Immunol*. 2014;192(11):5140-50.

Servat JJ, Mears KA, Black EH, Huang JJ. Biological agents for the treatment of uveitis. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 2012;12(3):311-28.

Shi Q, Niu Y, Cao H, Zhou X, Jiang S, Liu Z, et al. CD28 superagonist antibody treatment attenuated obliterative bronchiolitis in rat allo-orthotopic tracheal transplantation by preferentially expanding Foxp3-expressing regulatory T cells. *Transplantation Proceedings*. 2012;44(4):1060-6.

Siddique SS, Shah R, Suelves AM, Foster CS. Road to remission: a comprehensive review of therapy in uveitis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*. 2011;20(11):1497-515.

Silver PB, Hathcock KS, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J Immunol*. 2000;165(9):5041-7.

Silver PB, Rizzo LV, Chan CC, Donoso LA, Wiggert B, Caspi RR. Identification of a major pathogenic epitope in the human IRBP molecule recognized by mice of the H-2r haplotype.

Investigative Ophthalmology & Visual Science. 1995;36(5):946-54.

Smith JA, Thompson DJ, Whitcup SM, Suhler E, Clarke G, Smith S, et al. A randomized, placebo-controlled, double-masked clinical trial of etanercept for the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis and Rheumatism*. 2005;53(1):18-23.

St Clair EW. The calm after the cytokine storm: lessons from the TGN1412 trial. *The Journal of Clinical Investigation*. 2008;118(4):1344-7.

Stebbings R, Findlay L, Edwards C, Eastwood D, Bird C, North D, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol*. 2007;179(5):3325-31.

Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, et al. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J Immunol*. 2008;181(11):7525-36.

Sugita S, Horie S, Yamada Y, Keino H, Usui Y, Takeuchi M, et al. Suppression of bystander T helper 1 cells by iris pigment epithelium-inducing regulatory T cells via negative costimulatory signals. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2010;51(5):2529-36.

Sugita S, Keino H, Futagami Y, Takase H, Mochizuki M, Stein-Streilein J, et al. B7+ iris pigment epithelial cells convert T cells into CTLA-4+, B7-expressing CD8+ regulatory T cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2006;47(12):5376-84.

Sun B, Rizzo LV, Sun SH, Chan CC, Wiggert B, Wilder RL, et al. Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response. *J Immunol*. 1997;159(2):1004-11.

Suttorp-Schulten MS, Rothova A. The possible impact of uveitis in blindness: a literature survey. *The British Journal of Ophthalmology*. 1996;80(9):844-8.

Takeuchi M, Yokoi H, Tsukahara R, Sakai J, Usui M. Differentiation of Th1 and Th2 cells in lymph nodes and spleens of mice during experimental autoimmune uveoretinitis. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2001;45(5):463-9.

Tang J, Zhu W, Silver PB, Su SB, Chan CC, Caspi RR. Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol*. 2007;178(9):5578-87.

Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, Tooley AJ, Ye J, Subudhi SK, et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol*. 2003;171(7):3348-52.

Tesavibul N, Dorfman D, Sangwan VS, Christen W, Panayotis Z, Rojas B, et al. Costimulatory molecules in ocular cicatricial pemphigoid. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 1998;39(6):982-8.

Uramoto KM, Michet CJ, Jr., Thumboo J, Sunku J, O'Fallon WM, Gabriel SE. Trends in the incidence and mortality of systemic lupus erythematosus, 1950-1992. *Arthritis and Rheumatism*. 1999;42(1):46-50.

Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, et al. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. *Experimental Eye Research*. 2008;86(1):52-9.

Vallochi AL, Commodaro AG, Schwartzman JP, Belfort R, Jr., Rizzo LV. The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokine & Growth Factor Reviews*. 2007;18(1-2):135-41.

van Berkel ME, Oosterwegel MA. CD28 and ICOS: similar or separate costimulators of T cells? *Immunology Letters*. 2006;105(2):115-22.

Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov JA, Jr., Organisciak DT. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol*. 1977;119(6):1949-58.

Wakefield D, Abu El-Asrar A, McCluskey P. Treatment of severe inflammatory eye disease in patients of reproductive age and during pregnancy. *Ocular Immunology and Inflammation*. 2012;20(4):277-87.

Waldmann H, Adams E, Cobbold S. Reprogramming the immune system: co-receptor blockade as a paradigm for harnessing tolerance mechanisms. *Immunological Reviews*. 2008;223:361-70.

Walsh SJ, Rau LM. Autoimmune diseases: a leading cause of death among young and middle-aged women in the United States. *American Journal of Public Health*. 2000;90(9):1463-6.

Whitcup SM, Nussenblatt RB. Immunologic mechanisms of uveitis. New targets for immunomodulation. *Archives of Ophthalmology*. 1997;115(4):520-5.

Xu H, Forrester JV, Liversidge J, Crane IJ. Leukocyte trafficking in experimental autoimmune uveitis: breakdown of blood-retinal barrier and upregulation of cellular adhesion molecules. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2003;44(1):226-34.

Yeh S, Wroblewski K, Buggage R, Li Z, Kurup SK, Sen HN, et al. High-dose humanized anti-IL-2 receptor alpha antibody (daclizumab) for the treatment of active, non-infectious uveitis. *Journal of Autoimmunity*. 2008;31(2):91-7.

Yu AP, Tang J, Xie J, Wu EQ, Gupta SR, Bao Y, et al. Economic burden of psoriasis compared to the general population and stratified by disease severity. *Current Medical Research and Opinion*. 2009;25(10):2429-38.

Zamiri P, Sugita S, Streilein JW. Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial

cells and the subretinal space. *Chemical Immunology and Allergy*. 2007;92:86-93.

Zanotti C, Chiarini M, Serana F, Sottini A, Garrafa E, Torri F, et al. Peripheral accumulation of newly produced T and B lymphocytes in natalizumab-treated multiple sclerosis patients. *Clin Immunol*. 2012;145(1):19-26.

Zhang R, Huynh A, Whitcher G, Chang J, Maltzman JS, Turka LA. An obligate cell-intrinsic function for CD28 in Tregs. *The Journal of Clinical Investigation*. 2013;123(2):580-93.

Zhang Z, Zhong W, Hall MJ, Kurre P, Spencer D, Skinner A, et al. CXCR4 but not CXCR7 is mainly implicated in ocular leukocyte trafficking during ovalbumin-induced acute uveitis. *Experimental Eye Research*. 2009;89(4):522-31. Epub 2009/06/16.

Zhou R, Caspi RR. Ocular immune privilege. *F1000 Biology Reports*. 2010;2.

Zhu Y, Yao S, Chen L. Cell surface signaling molecules in the control of immune responses: a tide model. *Immunity*. 2011;34(4):466-78.

Zierhut M, Wild U, Roser R, Wiggert B, Thiel HJ, Stiemer R. [Experimental autoimmune uveitis. Characterization of retina infiltrating cells]. *Der Ophthalmologe : Zeitschrift der Deutschen Ophthalmologischen Gesellschaft*. 1999;96(4):252-6. Experimentelle Autoimmun-Uveitis. Charakterisierung der die Retina infiltrierenden Zellen.

APÊNDICE

Revisão publicada na revista Autoimmunity Reviews, maio de 2014

DOI: 10.1016/j.autrev.2014.05.003

IMMUNOTHERAPEUTIC STRATEGIES IN AUTOIMMUNE UVEITIS

Pedro Henrique Papotto¹, Eliana Blini Marengo¹, Luiz Roberto Sardinha¹, Anna Carla Goldberg^{1,2}, Luiz Vicente Rizzo^{1,2,#}

¹Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Albert Einstein 627-701 – 2º subsolo Bloco A, ZIP CODE 05651-901 - São Paulo, Brazil.

² Instituto de Investigação em Imunologia – Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (iii-INCT), Brazil

Running Title: Costimulation blockade in autoimmune uveitis

Keywords: autoimmune uveitis, experimental autoimmune uveitis, costimulation blockade, immune modulation, CD28 antagonists

#Corresponding author: Luiz Vicente Rizzo (lvirizzo@einstein.br) –, Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Morumbi, 627-701 – Bloco A 2º subsolo, ZIP CODE 05651-901 - São Paulo, Brazil. Phone: +55 11 2151 1338; Fax +55 11 2151 1338.

Review

Immunotherapeutic strategies in autoimmune uveitis

Pedro Henrique Papotto^a, Eliana Blini Marengo^a, Luiz Roberto Sardinha^a,
Anna Carla Goldberg^{a,b}, Luiz Vicente Rizzo^{a,b,*}

^a Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Albert Einstein 627-701, 2-SS Bloco A, 05651-901 São Paulo, Brazil

^b Instituto de Investigação em Imunologia, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (iii-INCT), Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 4 April 2014

Accepted 20 April 2014

Available online 12 May 2014

Keywords:

Autoimmune uveitis
Experimental autoimmune uveitis
Costimulation blockade
Immune modulation
CD28 antagonists

ABSTRACT

Autoimmune uveitis is an organ-specific disorder characterized by irreversible lesions to the eye that predominantly affect people in their most productive years and is among the leading causes of visual deficit and blindness. Currently available therapies are effective in the treatment of a wide spectrum of uveitis, but are often associated with severe side effects. Here, we review ongoing research with promising immunomodulatory therapeutic strategies, describing their specific features, interactions and the responses triggered by the targeted immune molecules that aim to minimize clinical complications and the likelihood of disease relapse. We first review the main features of the disease, diagnostic tools, and traditional forms of therapy, as well as the animal models predominantly used to understand the pathogenesis and test the novel intervention approaches aiming to control the acute immune and inflammatory responses and to dampen chronic responses. Both exploratory research and clinical trials have targeted either the blockade of effector pathways or of their companion co-stimulatory molecules. Examples of targets are T cell receptors (CD3), their co-stimulatory receptors (CD28, CTLA-4) and corresponding ligands (B7-1 and B7-2, also known as CD80 and CD86), and cytokines like IL-2 and their receptors. Here, we summarize the available evidence on effectiveness of these treatments in human and experimental uveitis and highlight a novel CD28 antagonist monovalent Fab' antibody, FR104, which has shown preclinical efficacy suppressing effector T cells while enhancing regulatory T cell function and immune tolerance in a humanized graft-versus-host disease (GVHD) mice model and is currently being tested in a mouse autoimmune uveitis model with encouraging results.

© 2014 Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/>).

Contents

1. Introduction	910
2. Autoimmune uveitis	910
3. Animal models of autoimmune uveitis	911
3.1. Experimental autoimmune uveitis (EAU)	911
3.2. Transgenic IRBP-specific T cell model of spontaneous EAU	911
3.3. Humanized model of EAU	911
3.4. Endotoxin-induced uveitis	912
3.5. Experimental melanin protein-induced uveitis	912
3.6. TAM-receptor knockout mice	912
4. Immunomodulation strategies for non-infectious uveitis	912
4.1. The IL-2/IL-2R pathway	912
4.2. Anti-CD3 therapy	912
4.3. The CD28, CTLA4, and B7 costimulation trinity	913
4.4. Blockade of other co-stimulatory pathways	913
4.5. Blockade with anti-CD28 Fab' fragment	914
5. Conclusion	914
Take-home messages	914
Acknowledgments	914
References	915

* Corresponding author at: Hospital Israelita Albert Einstein, Av. Albert Einstein, 627-701-Bloco A, 2-SS, 05651-901 São Paulo, Brazil. Tel./fax: +55 11 2151 1338.
E-mail address: lvrizzo@einstein.br (L.V. Rizzo).

1. Introduction

Autoimmune disorders encompass a wide range of chronic inflammatory conditions and are among the leading causes of disability in the world (report from The Autoimmune Diseases Coordinating Committee of the National Institutes of Health, 2005 at <http://www.niaid.nih.gov/topics/autoimmune/research/Pages/coordComm.aspx>, updated April 30, 2012). These diseases are characterized by an abnormal response of the immune system, which failing to distinguish self from non-self-molecules reacts against organs, tissues and cells of the individual. Although the specific mechanisms triggering each type of autoimmune disease are not completely understood, it is well established that the development and progression of autoimmune disorders is strongly associated with both genetic and environmental factors, which predispose the individual to the disease.

Although each specific autoimmune condition has usually a low incidence, collectively autoimmune disorders affect 14.7 to 23.5 million people in the United States (<http://www.niaid.nih.gov/topics/autoimmune>, updated August 1, 2013) alone. The high burden of autoimmune diseases is exacerbated by the chronic character of these conditions, the impairment in the quality of life of patients and the cost of the available treatments. More effective, safer and affordable therapies targeted at specific molecules and conditions would be ideal characteristics of a good treatment, several of which are under development, but are currently still not available.

Much clinical and experimental research on autoimmune diseases is directed towards the investigation of novel therapies or the improvement of currently available treatments. Owing to the great variability in the mechanisms underlying disease development and progression, current studies focus on the understanding of specific features and molecular pathways associated with each disorder. In particular, the use of therapies targeted at rare or distinctive autoimmune diseases currently represents promising areas of study. One such disease is autoimmune uveitis, an organ-specific disorder characterized by irreversible lesions to the eye. Autoimmune uveitis (AIU) predominantly affects people in their most productive years (from 20 to 50 years of age), and is among the leading causes (approximately 10% of all cases) of visual deficit and blindness. AIU has an incidence of 52.4 per 100,000 and a prevalence of 115.3 per 100,000 habitants in the United States [1], and is also considered a global socioeconomic problem (The International Uveitis Study Group – <http://www.iusg.net>, updated November 16, 2013).

The heterogeneity of underlying factors and the variable disease severity of AIU patients reinforce the need for an accurate diagnosis. Although currently available therapies are effective in the treatment of a wide spectrum of uveitis, most are associated with important and severe side effects. In this sense, treatments based on novel molecules or employing well-known molecules, tuning their use to the various hierarchical levels of the immune response, represent promising avenues of research. Moreover, the investigation of alternative or combined treatments focusing on groups of patients with a similar disorder may be also fruitful.

Here, we review ongoing research to treat AIU with promising immunomodulatory therapeutic strategies, highlighting their specific features, interactions and the responses triggered by the targeted immune molecules that aim to minimize clinical complications and the likelihood of disease relapse. For improved comprehension we first review the main features of AIU, diagnostic tools and traditional forms of therapy, as well the animal models predominantly used to understand its pathogenesis and test novel intervention approaches.

2. Autoimmune uveitis

Uveitis is an inflammation of the uvea, a layer located between the sclera and the retina of the eye that includes the iris, ciliary body, and choroid, but can also extend to adjacent tissues, such as retina, optic nerve, and vitreous humor [2]. The disease is broadly classified into

infectious and non-infectious (which includes AIU) uveitis and in humans, can affect the anterior, intermediate, and posterior portions of the eye [3]. Furthermore, a series of autoimmune diseases may additionally present uveitis, with overlapping AIU features but also unique characteristics. That is the case for Behçet's disease [4], reactive arthritis [5], sarcoidosis [6], and Vogt–Koyanagi–Harada syndrome [7,8]. In contrast, AIU is confined to the eye.

In AIU, ocular antigens such as arrestin also known as S-antigen [9], the interphotoreceptor retinoid binding protein IRBP, and/or recoverin [10] are exposed and an immune response against these molecules is initiated [11]. Among the events involved in this response, blood–retinal barrier disruption and retinal antigen recognition by auto-reactive T cells are critical elements. In addition, predisposing MHC class II alleles have been identified in some populations, namely, HLA-DR4, HLA-DR3 and some HLA-DQ alleles [12]. Under normal conditions, special micro-anatomical features that characterize the so-called immune privilege of the eye [13] ensure that retinal molecules are protected from autoimmune responses and that tissue integrity is maintained [14,15]. These features include the blood–retinal barrier, the lack of MHC Class II positive professional antigen-presenting cells (APCs) [16,17], the absence of a lymphatic drainage, the presence of soluble immunosuppressive factors secreted by ocular cells, such as TGF- β , FasL [18], PDL-1 [19], CTLA-4 [20], CTLA-2 [21], CD200, CD55, CD46, and decay-accelerating factor (DAF) [22,23], the constitutive expression of several of these regulatory molecules, the generation of regulatory T cells [24–27], and finally, eye antigen expression in the thymus that counteracts the escape of autoreactive T cells into the peripheral blood [28].

Although many features of uveitis have been extensively studied, therapeutic interventions that work in animal models have frequently failed due to the heterogeneity of this disorder. Additionally, many of the approaches are not disease-specific leading to enhancement of local and systemic side-effects. Therefore, a precise diagnosis of the type of uveitis is often needed to guarantee the best therapeutic control of the progression of eye lesions. Diagnosis of AIU requires considering multiple factors in the patient's history like age and the exclusion of injuries resulting from trauma, infections, or tumors, as well as a detailed laboratory investigation, which should include complete blood count, erythrocyte sedimentation rate, angiotensin converting enzyme and lysozyme levels, serology for syphilis, HLA, and of course, ocular imaging including funduscopy [29]. Eligible treatments should also be addressed aiming to minimize ocular complications that lead to decrease in visual acuity and ultimately may cause irreversible blindness. Aggravating features include cystoid macular edema, cataract, glaucoma, retinal vascular abnormalities, macular lesions, retinal detachment, corneal opacities, optic-nerve atrophy, and phthisis that have also been frequently reported [30].

Current treatments focus on immunosuppressive therapies to control acute inflammation and to ensure the maintenance of long-term remission. Corticosteroids are usually among the first chosen due to their effectiveness at controlling inflammation both in the short term and in the long term. However, a myriad of possible side effects (e.g. weight gain, gastric ulceration, osteoporosis, fluid retention, hypertension, diabetes mellitus, and changes in mental status) as well as ocular *sequelae* (e.g. acceleration of cataract formation and glaucoma) may be observed. More specific therapies have been associated with more positive effects [31]. Such therapies include the prescription of antimetabolite drugs (including Methotrexate, Azathioprine, Mycophenolate mofetil), T cell and calcineurin inhibitors (cyclosporine, FK506/Tacrolimus), alkylating/cytotoxic agents (cyclophosphamide, chlorambucil), intravenous immunoglobulin and modern immunobiologicals. The latter group includes several agents, such as Infliximab (a TNF- α antagonist mouse–human chimeric antibody), Adalimumab (a human antibody developed against TNF- α), Etanercept (another TNF- α antagonist, but less efficient than Infliximab or Adalimumab), interleukin-2 receptor antagonists such as Daclizumab, as well as interferon- α based therapies [32–34].

Overall, though considerable success in stemming the clinical progression of uveitis has been achieved, the search for safe and effective alternative therapies and disease-specific interventions are still going on [31].

3. Animal models of autoimmune uveitis

Owing to their ability to reproduce specific features of human diseases at diverse levels, from molecules to tissues and organs, animal models have been increasingly used to gain understanding of the pathogenesis of several autoimmune diseases. However, despite the similarities in molecular, morphological, and physiological aspects, a single animal model will often lack the ability to adequately mimic the complexity of mechanisms underlying a human disease. As a result, a number of models are usually combined to explain the many facets of autoimmune disorders.

To this date, several animal models have been used to study AIU (reviewed in [35,36]). In the next sections we review the most frequently used models to study the immunopathogenesis as well as some promising systems for evaluation of novel therapies.

3.1. Experimental autoimmune uveitis (EAU)

EAU is the most frequently used animal model of uveitis. This T-cell-mediated intraocular inflammatory disease is predominantly induced by immunization with the retinal antigens S-ag and IRBP coupled to Complete Freund's Adjuvant (CFA) and a *Bordetella pertussis* toxin (PTX) boost [37], with a 2-week time of onset. In mice, the resulting disease is mainly confined to the posterior part of the eye, with focal lesions affecting the retina and choroid. Vasculitis and the presence of granulomas in the posterior layers of the eye are often seen and are accompanied by serous detachment of the retina and disorganization of the photoreceptor layer. Severity of EAU is scored on a scale of 0 (no disease) to 4 (maximum disease) in half-point increments, according to a semi quantitative system described previously [37], according to lesion type, size, and number by histopathology examination of the eyes. Briefly, the minimal criteria for scoring an eye as positive for uveitis is presence of inflammatory cell in the ciliary body, choroids, or retina (EAU grade 0.5); progressive higher grades present discrete lesions in the tissue such as vasculitis, granuloma formation, retinal folding and/or detachment and photoreceptor damage [37].

Compared to other rodent models [38], mouse EAU is of longer duration and presents with recurrences, hence facilitating therapeutic handling of the disease [37].

The genetic predisposition for the development of eye autoimmunity, where only some mice lineages are susceptible to the induction of disease is quite clear in this model. Susceptibility is linked with specific H-2 MHC haplotypes, like H-2^b found in C57BL/6 and C57BL/10 mice, H-2^k found in B10.BR mice, and H-2^r found in B10.RIII mice, with H-2^r being the most susceptible, followed by H-2^k and H-2^b [35]. EAU susceptibility is also dependent on the pattern of immune response. For example, strains prone to a more exacerbated T_H1 response are more susceptible than those with predominantly low T_H1 responses [39].

As to the involvement of T-cell mediated inflammation cellular features of EAU resemble those of the human disease. T cells are mainly CD4⁺ exhibiting a T_H1 phenotype *in vivo* [40], but are not required for antigen priming and retinal damage. This is suggested by the observation that IFN- γ knockout mice mount a deviant immune response against eye tissues when immunized with IRBP [41]. Although expected, T_H2 lymphocytes do not confer resistance to uveitis. Nevertheless, a bias in the immune response towards the T_H2 response profile has been shown to reduce pathogenic T_H1 responses [39]. Recently, many groups have shown the importance of T_H17 cells in the pathogenesis of AIU [42–44]. However it is difficult to determine their real role in the establishment and maintenance of disease, as it seems that both T_H1 and T_H17 cells can independently promote the disease onset [42].

The importance of cytokines both in EAU and in human uveitis is incontestable, but the understanding of their precise effects is a matter of great complexity. For example IFN- γ , the major cytokine of T_H1 profile, is not required for onset and maintenance of EAU [41]. In addition, lack of IL-17, the main product of T_H17 lymphocytes, does not abrogate EAU susceptibility either [44]. Therefore, it seems that the type of immune response will be driven not by the presence or absence of a particular cytokine, but by the balance of the cytokine milieu in the eye, which comprises IL-1, IL-12, IL-23, IL-4, IL-10 and several others (reviewed in [45]).

Altogether, these features make EAU an interesting animal model to acquire further understanding on aspects of the immune regulation taking place in the diseased eye.

3.2. Transgenic IRBP-specific T cell model of spontaneous EAU

Recently, a novel EAU model was developed to study basic autoimmune responses occurring in an immunoprivileged site such as the eye [46,47]. This spontaneous model uses an IRBP161–180 peptide-specific transgenic T cell receptor mouse model on a B10.RIII background, and shows the hallmarks of the human autoimmune uveitis as judged by histology and fundoscopic analysis. The CD4⁺ T cells infiltrating the uveitic eyes were of an effector/memory phenotype, but the infiltrate also included Th17 inflammatory and extrathymically-derived regulatory T cells. According to the level of transgenes present in the T cell population, disease severity varied. Additionally, in a classic adoptive transfer experiment IRBP-peptide activated Th1 cells could implement the disease in wild type naive recipients [46], according to the level of transgene in each of the lineages. On the other hand, the time course of the spontaneous disease in this model and also in Aire knockout B10.RIII mice was longer, with an onset of about 6 weeks instead of the usual 2 weeks in the original model [47]. Thus, even when using the same retinal antigen, time courses, severity of the pathology, and T cell profiles can be quite different, highlighting the variability of the disease.

3.3. Humanized model of EAU

Despite the usefulness of animal models in the understanding of mechanisms underlying the pathogenesis of autoimmune diseases, there are limitations regarding the specificity of effector cells or the genetic background underlying disease development. This is particularly important considering that AIU is more likely to be a group rather than a single disease as disease course and clinical manifestations can be highly heterogeneous. Genetic heterogeneity may underlie much of this variation associated with the clinical disease. For instance, previous evidence has shown a substantial degree of heterogeneity in the HLA loci from patients diagnosed with the classical (not linked to Behçet's, ankylosing spondylitis, or rheumatoid arthritis) autoimmune uveitis [48]. HLA-DR4, HLA-DR3 and even some HLA-DQ alleles have been linked with the pathogenesis of the disease in humans [49,50].

Humanized models have therefore been established in the last decade as important tools for the study of eye immunology. For example, although T cells from many patients diagnosed with autoimmune uveitis respond to immunization with S-ag [51], there is currently no mouse model exhibiting a similar response. Conversely, humanized HLA-DR3, HLA-DR4, and HLA-DQ8 transgenic mice can develop uveitis after immunization with retinal antigens [12]. For example, HLA-DR3 + mice develop the disease following immunization with S-ag. Similarly, HLA-A29 transgenic mice have been also shown to spontaneously develop a retinopathy resembling human birdshot chorioretinopathy [52].

Taken together, these models were important in the characterization of MHC-class II antigen presentation in AIU and represent the bottom line for studies aiming to identify relevant auto-antigenic epitopes and the establishment of antigen-specific immunotherapies.

3.4. Endotoxin-induced uveitis

In this animal model, uveitis is not induced by immunization with any retinal antigen to trigger autoimmunity, suggesting that the observed inflammatory response may be due to other mechanisms. In Lewis rats, the induction is achieved by immunization with lipopolysaccharide (LPS) [53] and in mice, immunization is carried out with a *Salmonella typhimurium* endotoxin, indicating an important role for the innate arm of immune response. In both rodent models the resulting disease is an anterior uveitis of short duration, which does not resemble any specific human uveitis. Although this model does not duplicate all the features of the human anterior uveitis, pathways activated during the innate response can be elicited by its use. Hence, its importance during disease onset, not only in the anterior uveitis but also in other types of uveitis might as well be studied using this model.

3.5. Experimental melanin protein-induced uveitis

In this rat model of uveitis, the disease induction is achieved by immunization with melanin protein in CFA or Hunter's Adjuvant and a PTX boost [54–56]. The resulting disease is characterized by infiltration and damage of the anterior portion of the eye by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, macrophages and neutrophils. Clinical manifestations start approximately 14 days after disease induction and are very similar to those found in human anterior uveitis, including iritis and iridocyclitis, but with no retinal commitment.

This model comprises important innate immune response features and has been useful to clarify the role of nitric oxide (NO) in eye inflammation [56], to evaluate specific therapies aiming at the NO pathway, and even to achieve a better understanding of the differences between anterior and posterior uveitis.

3.6. TAM-receptor knockout mice

The TAM family of receptor tyrosine kinases is involved in the control of dendritic cell cytokine signaling [57] and the knockout of three receptors of this family (TAM TKO) has been shown to lead to multi-organ autoimmune disease in mice [58]. Recently, Ye and colleagues demonstrated that TAM TKO mice usually develop eye inflammation and are more susceptible to immunization with IRBP peptides. These mice show postnatal degeneration of the ocular photoreceptor layer and cellular infiltration by T lymphocytes and macrophages. Moreover, IRBP-specific T lymphocytes are found in these mice, explaining their high susceptibility to the development of uveitis even when induced by low doses of IRBP [59].

As in this model disease develops spontaneously it may provide an important tool to understand the role of the environment in overall vulnerability for autoimmunity in the eye. It may also help unravel the contribution of a deregulated population of APCs to the onset and maintenance of disease.

4. Immunomodulation strategies for non-infectious uveitis

Strategies focusing on diverse immunomodulatory targets for treatment of autoimmune diseases have been reported in humans and in experimental models. The main goal of these approaches is to control the acute immune and inflammatory responses and to dampen chronic responses. These avenues have been explored also in inflammatory ocular disorders [60]. Furthermore, exploratory research and clinical trials have targeted either the blockade of effector pathways or of their companion co-stimulatory molecules at different checkpoints of the immune response. Examples of targets evaluated are T cell receptors (CD3), their costimulatory receptors (CD28, CTLA-4) and corresponding ligands (B7-1 and B7-2, also known as CD80 and CD86), and cytokines like IL-2 and their receptors. Here, we summarize the available evidence on effectiveness of these treatments in human and experimental uveitis.

4.1. The IL-2/IL-2R pathway

IL-2 is a 15 kDa α -helical cytokine produced predominantly by activated T lymphocytes. It binds to the IL-2 receptor (IL-2R), which is formed by three subunits: α (CD25), β (CD122), and the common γ (CD132) chains (reviewed in [61]).

IL-2 has several functions in the development and maintenance of the immune system. Initially, this cytokine was known for its ability to promote the growth and clonal expansion of all T cells. However, many years of research have shown that IL-2 is also essential for the maintenance of regulatory T cells in the periphery and for the control of T_H17 and follicular helper T cells (reviewed in [62]).

Because of such a central role in the control of the immune response, many efforts have targeted the IL-2 pathway as a means to control disease progression. By the time the first studies using IL-2 blockade or chimeric IL-2 toxins were conducted using experimental models of autoimmune disease, it was already known that a large proportion of eye-infiltrating cells in an EAU model bore high amounts of IL-2R [63]. These facts led Roberge and colleagues to inhibit EAU with an IL-2 chimeric toxin [64]. If treatment was initiated 7 or 10 days after induction of disease this therapy resulted in lesser incidence and disease severity in a rat EAU model. The efficacy of this approach was then confirmed with monoclonal antibodies directed against IL-2R [65,66].

In humans, treatment became available with a humanized antibody directed against the α chain of the IL-2R (Daclizumab). At first, a phase I/II clinical trial was conducted, which showed that following 12 months of Daclizumab, 8 of 10 patients diagnosed with chronic severe sight-threatening intermediate and posterior uveitis had their disease under control and immunosuppressive agent dosage could be abated with no major side effects. In some cases of anterior uveitis, however, patients responded to cyclosporin but not to Daclizumab, suggesting that different mechanisms are involved in this subtype of uveitis [67]. Subsequent clinical trials have achieved similar results [68–70], supporting the use of Daclizumab as a valid immunotherapy for some, but not all AIU patients.

4.2. Anti-CD3 therapy

Based on a similar rationale, namely aiming at a widespread down-regulation of effector T cell responses, antibodies targeting CD3 molecules have been the focus of research on treatment of autoimmune disorders since the first antibody specific for humans was produced in 1979, by Kung and Goldstein [71]. Anti-CD3-induced tolerance has long been investigated (reviewed in [72]). Continuous research efforts directed towards the production of safer anti-CD3 antibodies, such as the humanized antibodies with mutated Fc regions, as well as extensive work on tolerance induction, led anti-CD3 antibodies to form a new category of immunotherapeutic agents used to treat autoimmune diseases as well as to ensure long-term survival of organ allografts [72].

In animal models, the use of oral anti-CD3 was able to suppress experimental autoimmune encephalomyelitis in a mouse model that could be explained by the induction of CD4⁺CD25⁺LAP⁺ regulatory T cells in a TGF- β -dependent fashion [73]. Additionally, the use of nasal anti-CD3 ameliorated systemic lupus erythematosus in two different mice models by inducing IL-10. In this case IL-10 was secreted by CD4⁺CD25⁺LAP⁺ regulatory cells, which downregulated follicular helper T cells and probably led to the observed tolerance [74]. Success using anti-CD3 was also obtained in animal models of diabetes [75,76].

In humans, clinical improvement of type 1 diabetic patients was observed after treatment with an anti-CD3 monoclonal antibody (hOKT3 γ 1 (Ala-Ala); Teplizumab) and did not require use of any other immunosuppressive treatment during a 2-year follow-up [77]. Likewise, psoriatic arthritis patients treated with a similar anti-CD3 antibody showed better clinical outcome after a two-week treatment [78].

Despite the widespread use of anti-CD3 to treat autoimmunity, there is only one study testing its effectiveness in uveitis. Using the EAU

model in B10.RIII mice, Ke and colleagues [79] demonstrated that anti-CD3 was able to ameliorate disease. The anti-CD3 used was directed against the invariant CD3 ϵ chain and was unable to bind Fc receptors. The antibody given intraperitoneally for 6 or 10 days after disease induction was able to suppress EAU development in both treatment schemes, indicating its effectiveness during disease onset and upon priming of T cells. Additionally, long-term tolerance in the treated mice was achieved.

Although further research is needed to confirm these findings for other treatment schemes (such as different administration routes or under the association with other immunomodulatory drugs), the results indicate that anti-CD3 might be a promising immunotherapy for the treatment of uveitis. An important issue remaining concerns the adverse effects caused by CD3 treatment, the development of anti-drug antibodies, and the contrasting results obtained in preclinical and clinical trials [80,81].

4.3. The CD28, CTLA4, and B7 costimulation trinity

CD28, a membrane protein belonging to the well-known family of co-stimulatory molecules, transduces signals, which act synergistically as a second signal with the T cell receptor complex to activate naïve T cells. CD28 is constitutively expressed in most of CD4⁺ and in 50% of CD8⁺ T cells in humans; additionally, it is found in all mouse naïve T cells [82]. The CD28 co-stimulator receptor is a homodimer structured by disulfide bonds on the T cell surface that binds to the B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and ICOS-L (B7RP1) molecules expressed in activated APCs [83,84]. B7-1 and B7-2 receptors are up-regulated by inflammatory as well as antigen-specific signals and act as ligands for both CD28 and cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 (CTLA-4) expressed on T cells [83].

CD28 enhances distinct T cell responses, which include survival and clonal expansion, IL-2 cytokine production, and naïve T cell differentiation into effector and memory phenotypes. In fact, there have been many reports on successful immunosuppression achieved by the blockade of the CD28/B7 pathway during treatment of autoimmune diseases, rejection of grafted organs, and in graft versus host disease [85]. However, the importance of pre-clinical and clinical studies even with promising therapeutic agents are highlighted by the extremely severe events that occurred during the phase I study of the superagonistic anti-CD28 antibody TGN1412 in six healthy human volunteers. The treatment caused massive trapping of T cells in spleen and lymph nodes in both rats and men, but the human volunteers, differently from the non-human primates tested suffered a massive cytokine storm and multiorgan failure which counteracted the possible benefits derived from the expected induction of regulatory T cells [86,87].

CTLA-4 (CD152) is structurally very similar to CD28, but differs in the binding affinity and temporal expression (reviewed by [85]). It is constitutively expressed on the surface of regulatory T cells and is induced upon activation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes [88,89] and is responsible for inhibiting the CD28-induced signals to competitively downregulate and ultimately block the T cell response by specific binding to B7. Accordingly, CTLA-4 knockout mice present enhanced T cell activation and proliferation and an increased incidence of systemic autoimmunity [90].

Due to the fact that both CTLA-4 and CD28 recognize and act through the same B7 molecules expressed on the surface of APCs, the opposite signals generated by these costimulatory molecules have been the focus of many studies. CTLA-4 blockade with monoclonal antibodies such as Ipilimumab and Tremelimumab leads to increased effector T cell activity and this approach is being used in several types of malignancies (reviewed in [91,92]), in both pre-clinical and clinical studies. In other words, the contrasting effects induced by blockade of CD28 and CTLA-4 confirm that, in the latter case, the approach does not apply to treatment of autoimmune diseases. Indeed, colitis was one of the more common adverse effects associated with this treatment [91].

Inhibition of immune responses via blockade of the CD28 receptor B7 (CD80 and CD86), however, remains a valid option for autoimmune diseases, and is being explored through the use of Abatacept (CTLA-4-Ig), a second generation recombinant fusion protein consisting of CTLA-4 and a modified Fc fragment of human IgG1 [93,94] that binds to both CD80 and CD86. Abatacept is approved by the Food and Drug Administration (FDA) for treatment of rheumatoid arthritis and juvenile idiopathic arthritis [94,95] and shows promising results in the case of systemic lupus erythematosus (SLE) patients [93].

It has become apparent however, that due to its capacity to bind both receptors, Abatacept blocks not only the CD28-mediated activation of effector cells, but also an important subset of regulatory T cells which function through CTLA4–CD80 signal transduction (reviewed in [96]). A newer generation of CTLA-4Ig antibodies addresses the issue of the double CD28 and CTLA-4 blockade aiming to enhance preferential binding of the therapeutic antibody to CD86 over CD80 [97]. This version (LEA29Y) of the molecule carries two amino acid changes and has been developed trying to increase the binding avidity for CD86 [98,99]. This change may be important because CD86 appears to be the dominant costimulatory ligand in a number of experimental models and, in treating mouse models of autoimmune disease, inhibition via CD86 was more effective than inhibition via CD80.

There are only few reports on the role of the CD28/B7 pathway in ocular autoimmune conditions that suggest CD28 may be a promising molecule for the treatment of AIU [97]. One of the trials [100] showed a percentual increase in co-stimulatory molecules, that is, of CD28, B7-1, and B7-2 positive cells in the eye biopsies of patients with ocular cicatricial pemphigoid (OCP), a chronic autoimmune disease affecting mucosal areas, including ocular (which represent about 70% of cases) and skin manifestations [101]. Authors suggested that these molecules contribute to the sustained immune activation in the OCP conjunctiva.

Intervention with anti-B7 antibodies was tested in EAU B10.A mice and led to disease remission [102]. Data were confirmed in an elegant study showing the efficacy of a combined anti-B7-1 and B7-2 treatment. Authors complemented these experiments evaluating the protection against EAU in B10.A mice in vivo with anti-CD28 antibodies. However, although these approaches were able to control effector immune responses they failed to reverse disease when mice were challenged with IRBP [103]. In another study, CTLA-4-Ig significantly decreased the average score when compared to saline-treated animals in an EAU model [104]. Additionally, Abatacept was shown to abrogate eye inflammation in cases of JIA-associated uveitis [105,106]. Taken together, these findings support promising results with CTLA-4Ig in the treatment of ocular autoimmune disorders.

4.4. Blockade of other co-stimulatory pathways

Blockade with other co-stimulatory molecules such as ICOS and PD-1 have also been essayed, with variable results.

PD-1 is a receptor broadly expressed in T and B cells and is involved in limiting T cell responses, and therefore may have a role in autoimmunity scenarios [91,107]. As occurs with CTLA-4:B7 the blockade of PD-1:PD-L1 leads to an enhancement of T cell activity, and is being explored in cancer therapy [108]; the first trials in humans with the BMS-936558 antibody were recently concluded [91,108]. In contrast, the use of surrogate PD1 ligands was shown to induce immunosuppression in multiple sclerosis [109], autoimmune glomerulonephritis [110], and SLE mouse models [111]. However, no studies on ocular autoimmunity have been carried out up to this date.

ICOS is also a co-stimulatory molecule from the CD28 family, but does not bind strongly to either B7-1 or B7-2 [84]. Instead, the major ICOS ligand is B7RP-1 and its engagement enhances cell activation and stimulates the production of inflammatory cytokines [112]. Accordingly, ICOS:B7RP-1 blockade dampened autoimmunity in experimental autoimmune encephalitis [113], in a (NZBxNZW)_{F1} mouse model of SLE [114], and in EAU [115]. The current understanding of overall T cell-

4.5. Blockade with anti-CD28 Fab' fragment

B10.RIII mice were immunized subcutaneously with the IRBP 161-180 peptide emulsified in Complete Freund's Adjuvant, plus a *B. pertussis* toxin boost and were then treated with the murine FR104 analog mPEG-PV1Fab' (PV1) after the onset of disease. Histopathology analysis showed that the general disease score was significantly lower in the PV1-treated group when compared with its untreated counterpart and an impact upon incidence of the disease was also observed in the PV1-treated group. This effect seemed to correlate with higher frequencies of naïve T

5. Conclusion

The present review shows that current research on AIU is diversified, aiming at multiple aspects of disease pathogenesis. As T cells have a central participation in the development of uveitis, encompassing the recognition of retinal antigens to the genesis of immunological memory, intervention schemes focused on lymphocyte signaling pathways are encouraging. Among them, the more promising strategies are targeted at the IL-2 cytokine involved in disease progression and also at the CD28/B7 molecular pathway, bypassing the antagonistic CTLA-4 signal transduction.

- Autoimmune uveitis is a T-cell mediated disease caused by immune responses against ocular arrestin, interphotoreceptor retinoid binding protein and/or recoverin.
- Experimental autoimmune uveitis in genetically susceptible mice exhibits focal lesions affecting retina and choroid, with vasculitis and granulomas, serous detachment of the retina and disorganization of the photoreceptor layer.
- Research and clinical trials aim at the blockade of effector pathways or of their companion co-stimulatory molecules, such as CD3 T cell receptors and their costimulatory CD28, CTLA-4 receptors and corresponding ligands, and the IL-2 pathway.
- FR104, a CD28 antagonist monovalent Fab' antibody, has shown pre-clinical efficacy suppressing effector T cells while enhancing regulatory T cell function and immune tolerance in autoimmune disease models.

We are thankful for the funding support of the European project TRIAD (EU-FP7-Health program EC-GA N281493; www.triad-CD28.com).

Fig. 1. Summarizes the preliminary data from our group showing that in an autoimmune uveitis B10.RIII model, treatment with a murine analog of FR104 (Effimune) protects against severe disease when compared to untreated mice. Moreover, this effect seems to be associated with higher frequencies of naïve T cells infiltrating the eyes of the treated mice, suggesting that the CD28 blockade by this novel Fab' CD28 antagonist prevents a full activation of T cells, rendering them in a naïve state. Furthermore, this effect appears to be associated with a dampened memory formation. Thus, the T cells from treated mice infiltrate the eyes but cannot induce a potent inflammatory response, restoring immune equilibrium in the eyes and protecting against disease progression.

eu). LVR (303763/2010-8) and ACG (304900/2010-9) are recipients of a personal fellowship from CNPq.

References

- [1] Gritz DC, Wong IG. Incidence and prevalence of uveitis in Northern California; the Northern California Epidemiology of Uveitis Study. *Ophthalmology* 2004;111(3):491–500 [discussion 500].
- [2] Whitcup SM, Nussenblatt RB. Immunologic mechanisms of uveitis. New targets for immunomodulation. *Arch Ophthalmol* 1997;115(4):520–5.
- [3] Selmi C. Diagnosis and classification of autoimmune uveitis. *Autoimmun Rev* 2014;13(4–5):591–4.
- [4] Comarmond CB, Wechsler B, Bodaghi B, Cacoub P, Saadoun D. Biotherapies in Behcet's disease. *Autoimmun Rev* 2014;13(7):762–9.
- [5] Selmi C, Gershwin ME. Diagnosis and classification of reactive arthritis. *Autoimmun Rev* 2014;13(4–5):546–9.
- [6] Jamilloux YL, Kodjikian L, Broussolle C, Seve P. Sarcoidosis and uveitis. *Autoimmun Rev* 2014;13(8):840–9.
- [7] Sakata VM, da Silva FT, Hirata CE, de Carvalho JF, Yamamoto JH. Diagnosis and classification of Vogt–Koyanagi–Harada disease. *Autoimmun Rev* 2014;13(4–5):550–5.
- [8] Greco A, Fusconi M, Gallo A, Turchetta R, Marinelli C, Macri GF, et al. Vogt–Koyanagi–Harada syndrome. *Autoimmun Rev* 2013;12(11):1033–8.
- [9] Wacker WB, Donoso LA, Kalsow CM, Yankeelov Jr JA, Organisciak DT. Experimental allergic uveitis. Isolation, characterization, and localization of a soluble uveitopathogenic antigen from bovine retina. *J Immunol* 1977;119(6):1949–58.
- [10] Gery I, Wiggert B, Redmond TM, Kuwabara T, Crawford MA, Vistica BP, et al. Uveoretinitis and pinealitis induced by immunization with interphotoreceptor retinoid-binding protein. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1986;27(8):1296–300.
- [11] Roitt IM. The role of autoantigens in the driving of autoimmune diseases. *Immunol Ser* 1993;59:119–29.
- [12] Pennesi G, Mattapallil MJ, Sun SH, Avichezer D, Silver PB, Karabekian Z, et al. A humanized model of experimental autoimmune uveitis in HLA class II transgenic mice. *J Clin Invest* 2003;111(8):1171–80.
- [13] Medawar PB. Immunological tolerance. *Nature* 1961;189:14–7.
- [14] Caspi RR. Ocular autoimmunity: the price of privilege? *Immunol Rev* 2006;213:23–35.
- [15] Ohta K, Wiggert B, Taylor AW, Streilein JW. Effects of experimental ocular inflammation on ocular immune privilege. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1999;40(9):2010–8.
- [16] Hamrah P, Dana MR. Corneal antigen-presenting cells. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:58–70.
- [17] Forrester JV, Xu H, Kuffova L, Dick AD, McMenamin PG. Dendritic cell physiology and function in the eye. *Immunol Rev* 2010;234(1):282–304.
- [18] Griffith TS, Ferguson TA. The role of FasL-induced apoptosis in immune privilege. *Immunol Today* 1997;18(5):240–4.
- [19] Usui Y, Okunuki Y, Hattori T, Kezuka T, Keino H, Ebihara N, et al. Functional expression of B7H1 on retinal pigment epithelial cells. *Exp Eye Res* 2008;86(1):52–9.
- [20] Sugita S, Keino H, Futagami Y, Takase H, Mochizuki M, Stein-Streilein J, et al. B7 + iris pigment epithelial cells convert T cells into CTLA-4 +, B7-expressing CD8 + regulatory T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006;47(12):5376–84.
- [21] Sugita S, Horie S, Nakamura O, Futagami Y, Takase H, Keino H, et al. Retinal pigment epithelium-derived CTLA-2alpha induces TGFbeta-producing T regulatory cells. *J Immunol* 2008;181(11):7525–36.
- [22] Zhou R, Caspi RR. Ocular immune privilege. *F1000 Biol Rep* 2010;2.
- [23] Forrester JV, Xu H, Lambe T, Cornall R. Immune privilege or privileged immunity? *Mucosal Immunol* 2008;1(5):372–81.
- [24] Taylor A, Shang F, Obin M. Relationships between stress, protein damage, nutrition, and age-related eye diseases. *Mol Aspects Med* 1997;18(5):305–414.
- [25] Yoshida M, Kezuka T, Streilein JW. Participation of pigment epithelium of iris and ciliary body in ocular immune privilege. 2. Generation of TGF-beta-producing regulatory T cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000;41(12):3862–70.
- [26] Zamiri P, Sugita S, Streilein JW. Immunosuppressive properties of the pigmented epithelial cells and the subretinal space. *Chem Immunol Allergy* 2007;92:86–93.
- [27] Sugita S, Horie S, Yamada Y, Keino H, Usui Y, Takeuchi M, et al. Suppression of bystander T helper 1 cells by iris pigment epithelium-inducing regulatory T cells via negative costimulatory signals. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010;51(5):2529–36.
- [28] DeVoss J, Hou Y, Johannes K, Lu W, Liou GI, Rinn J, et al. Spontaneous autoimmunity prevented by thymic expression of a single self-antigen. *J Exp Med* 2006;203(12):2727–35.
- [29] Biscette OMF, H.F., Flynn TE. Uveitis Diagnosis. Management, and Treatment Retinal Physician 2007.
- [30] Rothova A, Buitenhuis HJ, Meenken C, Brinkman CJ, Linssen A, Alberts C, et al. Uveitis and systemic disease. *Br J Ophthalmol* 1992;76(3):137–41.
- [31] Heo J, Sepah YJ, Yohannan J, Renner M, Akhtar A, Gregory A, et al. The role of biologic agents in the management of non-infectious uveitis. *Expert Opin Biol Ther* 2012;12(8):995–1008.
- [32] Smith JA, Thompson DJ, Whitcup SM, Suhler E, Clarke G, Smith S, et al. A randomized, placebo-controlled, double-masked clinical trial of etanercept for the treatment of uveitis associated with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis Rheum* 2005;53(1):18–23.
- [33] Foster CS, Tufail F, Waheed NK, Chu D, Miserocchi E, Baltatzis S, et al. Efficacy of etanercept in preventing relapse of uveitis controlled by methotrexate. *Arch Ophthalmol* 2003;121(4):437–40.
- [34] Smith JR, Levinson RD, Holland GN, Jabs DA, Robinson MR, Whitcup SM, et al. Differential efficacy of tumor necrosis factor inhibition in the management of inflammatory eye disease and associated rheumatic disease. *Arthritis Rheum* 2001;45(3):252–7.
- [35] Caspi RR. A look at autoimmunity and inflammation in the eye. *J Clin Invest* 2010;120(9):3073–83.
- [36] Gasparin F, Takahashi BS, Scolari MR, Gasparin F, Pedral LS, Damico FM. Experimental models of autoimmune inflammatory ocular diseases. *Arq Bras Oftalmol* 2012;75(2):143–7.
- [37] Caspi RR, Roberge FG, Chan CC, Wiggert B, Chader GJ, Rozenszajn LA, et al. A new model of autoimmune disease. Experimental autoimmune uveoretinitis induced in mice with two different retinal antigens. *J Immunol* 1988;140(5):1490–5.
- [38] Wildner G, Kaufmann U. What causes relapses of autoimmune diseases? The etiological role of autoreactive T cells. *Autoimmun Rev* 2013;12(11):1070–5.
- [39] Sun B, Rizzo LV, Sun SH, Chan CC, Wiggert B, Wilder RL, et al. Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveitis involves more than a predisposition to generate a T helper-1-like or a T helper-2-like response. *J Immunol* 1997;159(2):1004–11.
- [40] Rizzo LV, Silver P, Wiggert B, Hakim F, Gazzinelli RT, Chan CC, et al. Establishment and characterization of a murine CD4 + T cell line and clone that induce experimental autoimmune uveoretinitis in B10.A mice. *J Immunol* 1996;156(4):1654–60.
- [41] Jones LS, Rizzo LV, Agarwal RK, Tarrant TK, Chan CC, Wiggert B, et al. IFN-gamma-deficient mice develop experimental autoimmune uveitis in the context of a deviant effector response. *J Immunol* 1997;158(12):5997–6005.
- [42] Tang J, Zhu W, Silver PB, Su SB, Chan CC, Caspi RR. Autoimmune uveitis elicited with antigen-pulsed dendritic cells has a distinct clinical signature and is driven by unique effector mechanisms: initial encounter with autoantigen defines disease phenotype. *J Immunol* 2007;178(9):5578–87.
- [43] Amadi-Obi A, Yu CR, Liu X, Mahdi RM, Clarke GL, Nussenblatt RB, et al. Th17 cells contribute to uveitis and scleritis and are expanded by IL-2 and inhibited by IL-27/STAT1. *Nat Med* 2007;13(6):711–8.
- [44] Luger D, Silver PB, Tang J, Cua D, Chen Z, Iwakura Y, et al. Either a Th17 or a Th1 effector response can drive autoimmunity: conditions of disease induction affect dominant effector category. *J Exp Med* 2008;205(4):799–810.
- [45] Vallochi AL, Commodaro AG, Schwartzman JP, Belfort Jr R, Rizzo LV, et al. The role of cytokines in the regulation of ocular autoimmune inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18(1–2):135–41.
- [46] Horai R, Silver PB, Chen J, Agarwal RK, Chong WP, Jittayasothorn Y, et al. Breakdown of immune privilege and spontaneous autoimmunity in mice expressing a transgenic T cell receptor specific for a retinal autoantigen. *J Autoimmun* 2013;44:21–33.
- [47] Chen J, Qian H, Horai R, Chan CC, Falick Y, Caspi RR. Comparative analysis of induced vs. spontaneous models of autoimmune uveitis targeting the interphotoreceptor retinoid binding protein. *PLoS One* 2013;8(8):e72161.
- [48] Caspi RR. Immunogenetic aspects of clinical and experimental uveitis. *Reg Immunol* 1992;4(5):321–30.
- [49] Davey MP, Rosenbaum JT. The human leukocyte antigen complex and chronic ocular inflammatory disorders. *Am J Ophthalmol* 2000;129(2):235–43.
- [50] Levinson RD. Immunogenetics of ocular inflammatory disease. *Tissue Antigens* 2002;69(2):105–12.
- [51] de Smet MD, Yamamoto JH, Mochizuki M, Gery I, Singh VK, Shinohara T, et al. Cellular immune responses of patients with uveitis to retinal antigens and their fragments. *Am J Ophthalmol* 1990;110(2):135–42.
- [52] Szpak Y, Vieville JC, Tabary T, Naud MC, Chopin M, Edelson C, et al. Spontaneous retinopathy in HLA-A29 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98(5):2572–6.
- [53] Rosenbaum JT, McDevitt HO, Guss RB, Egbert PR. Endotoxin-induced uveitis in rats as a model for human disease. *Nature* 1980;286(5773):611–3.
- [54] Broekhuysen RM, Kuhlmann ED, Winkens HJ. Experimental autoimmune anterior uveitis (EAAU). II. Dose-dependent induction and adoptive transfer using a melanin-bound antigen of the retinal pigment epithelium. *Exp Eye Res* 1992;55(3):401–11.
- [55] Bora NS, Kim MC, Kabeer NH, Simpson SC, Tandhasetti MT, Cirrito TP, et al. Experimental autoimmune anterior uveitis. Induction with melanin-associated antigen from the iris and ciliary body. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1995;36(6):1056–66.
- [56] Matteson DM, Shen DF, Chan CC. Inhibition of experimental melanin protein-induced uveitis (EMIU) by targeting nitric oxide via phosphatidylcholine-specific phospholipase C. *J Autoimmun* 1999;13(2):197–204.
- [57] Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007;131(6):1124–36.
- [58] Lu Q, Lemke G. Homeostatic regulation of the immune system by receptor tyrosine kinases of the Tyro 3 family. *Science* 2001;293(5528):306–11.
- [59] Ye F, Li Q, Ke Y, Lu Q, Han L, Kaplan HJ, et al. TAM receptor knockout mice are susceptible to retinal autoimmune induction. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2011;52(7):4239–46.
- [60] Saadoun D, Bodaghi B, Bienvenu B, Sene D, Trad S, et al. Biotherapies in inflammatory ocular disorders: interferons, immunoglobulins, monoclonal antibodies. *Autoimmun Rev* 2013;12(7):774–83.
- [61] Hoyer KK, Dooms H, Barron L, Abbas AK. Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease. *Immunol Rev* 2008;226:19–28.
- [62] Banchereau J, Pascual V, O'Garra A. From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines. *Nat Immunol* 2012;13(10):925–31.
- [63] Chan CC, Nussenblatt RB, Wiggert B, Redmond TM, Fujikawa LS, Chader GJ, et al. Immunohistochemical analysis of experimental autoimmune uveoretinitis (EAU) induced by interphotoreceptor retinoid-binding protein (IRBP) in the rat. *Immunol Invest* 1987;16(1):63–74.
- [64] Roberge FG, Lorberbaum-Galski H, Le Hoang P, de Smet M, Chan CC, Fitzgerald D, et al. Selective immunosuppression of activated T cells with the chimeric toxin

- IL-2-PE40. Inhibition of experimental autoimmune uveoretinitis. *J Immunol* 1989;143(11):3498–502.
- [65] Higuchi M, Diamantstein T, Osawa H, Caspi RR. Combined anti-interleukin-2 receptor and low-dose cyclosporine therapy in experimental autoimmune uveoretinitis. *J Autoimmun* 1991;4(1):113–24.
- [66] Guex-Crosier Y, Raber J, Chan CC, Kriete MS, Benichou J, Pilson RS, et al. Humanized antibodies against the alpha-chain of the IL-2 receptor and against the beta-chain shared by the IL-2 and IL-15 receptors in a monkey uveitis model of autoimmune diseases. *J Immunol* 1997;158(1):452–8.
- [67] Nussenblatt RB, Fortin E, Schiffman R, Rizzo L, Smith J, Van Veldhuisen P, et al. Treatment of noninfectious intermediate and posterior uveitis with the humanized anti-Tac mAb: a phase I/II clinical trial. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(13):7462–6.
- [68] Nussenblatt RB, Thompson DJ, Li Z, Chan CC, Peterson JS, Robinson RR, et al. Humanized anti-interleukin-2 (IL-2) receptor alpha therapy: long-term results in uveitis patients and preliminary safety and activity data for establishing parameters for subcutaneous administration. *J Autoimmun* 2003;21(3):283–93.
- [69] Papaliodis GN, Chu D, Foster CS. Treatment of ocular inflammatory disorders with daclizumab. *Ophthalmology* 2003;110(4):786–9.
- [70] Yeh S, Wroblewski K, Buggage R, Li Z, Kurup SK, Sen HN, et al. High-dose humanized anti-IL-2 receptor alpha antibody (daclizumab) for the treatment of active, non-infectious uveitis. *J Autoimmun* 2008;31(2):91–7.
- [71] Kung P, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. *Science* 1979;206(4416):347–9.
- [72] Chatenoud L. CD3-specific antibody-induced active tolerance: from bench to bedside. *Nat Rev Immunol* 2003;3(2):123–32.
- [73] Ochi H, Abraham M, Ishikawa H, Frenkel D, Yang K, Basso AS, et al. Oral CD3-specific antibody suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing CD4+CD25+ LAP+ T cells. *Nat Med* 2006;12(6):627–35.
- [74] Wu HY, Quintana FJ, Weiner HL. Nasal anti-CD3 antibody ameliorates lupus by inducing an IL-10-secreting CD4+ CD25+ LAP+ regulatory T cell and is associated with down-regulation of IL-17+ CD4+ ICOS+ CXCR5+ follicular helper T cells. *J Immunol* 2008;181(9):6038–50.
- [75] Herold KC, Bluestone JA, Montag AG, Parihar A, Wiegner A, Gress RE, et al. Prevention of autoimmune diabetes with nonactivating anti-CD3 monoclonal antibody. *Diabetes* 1992;41(3):385–91.
- [76] Chatenoud L, Thervet E, Primo J, Bach JF, et al. Anti-CD3 antibody induces long-term remission of overt autoimmunity in nonobese diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(1):123–7.
- [77] Herold KC, et al. A single course of anti-CD3 monoclonal antibody hOKT3gamma1(Ala-Ala) results in improvement in C-peptide responses and clinical parameters for at least 2 years after onset of type 1 diabetes. *Diabetes* 2005;54(6):1763–9.
- [78] Utset TO, et al. Modified anti-CD3 therapy in psoriatic arthritis: a phase I/II clinical trial. *J Rheumatol* 2002;29(9):1907–13.
- [79] Ke Y, et al. Anti-CD3 antibody ameliorates experimental autoimmune uveitis by inducing both IL-10 and TGF-beta dependent regulatory T cells. *Clin Immunol* 2011;138(3):311–20.
- [80] Dean Y, Depis F, Kosco-Vilbois M. Combination therapies in the context of anti-CD3 antibodies for the treatment of autoimmune diseases. *Swiss Med Wkly* 2012;142:w13711.
- [81] Phillips B, Trucco M, Giannoukakis N. Current state of type 1 diabetes immunotherapy: incremental advances, huge leaps, or more of the same? *Clin Dev Immunol* 2011;2011:432016.
- [82] Gross JA, Callas E, Allison JP. Identification and distribution of the costimulatory receptor CD28 in the mouse. *J Immunol* 1992;149(2):380–8.
- [83] Greenwald RJ, et al. CTLA-4 regulates cell cycle progression during a primary immune response. *Eur J Immunol* 2002;32(2):366–73.
- [84] Yao S, et al. B7-h2 is a costimulatory ligand for CD28 in human. *Immunity* 2011;34(5):729–40.
- [85] Greenfield EA, Nguyen KA, Kuchroo VK. CD28/B7 costimulation: a review. *Crit Rev Immunol* 1998;18(5):389–418.
- [86] Stebbings R, et al. "Cytokine storm" in the phase I trial of monoclonal antibody TGN1412: better understanding the causes to improve preclinical testing of immunotherapeutics. *J Immunol* 2007;179(5):3325–31.
- [87] St Clair EW. The calm after the cytokine storm: lessons from the TGN1412 trial. *J Clin Invest* 2008;118(4):1344–7.
- [88] Guinan EC, et al. Pivotal role of the B7:CD28 pathway in transplantation tolerance and tumor immunity. *Blood* 1994;84(10):3261–82.
- [89] Takahashi T, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000;192(2):303–10.
- [90] Stohl W, et al. Global T cell dysregulation in non-autoimmune-prone mice promotes rapid development of BAFF-independent, systemic lupus erythematosus-like autoimmunity. *J Immunol* 2008;181(1):833–41.
- [91] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64.
- [92] Ramsay AG. Immune checkpoint blockade immunotherapy to activate anti-tumour T-cell immunity. *Br J Haematol* 2013;162(3):313–25.
- [93] Romo-Tena J, Gomez-Martin D, Alcocer-Varela J. CTLA-4 and autoimmunity: new insights into the dual regulator of tolerance. *Autoimmun Rev* 2013;12(12):1171–6.
- [94] Kremer JM, et al. Treatment of rheumatoid arthritis by selective inhibition of T-cell activation with fusion protein CTLA4lg. *N Engl J Med* 2003;349(20):1907–15.
- [95] Rosman Z, Shoenfeld Y, Zandman-Goddard G. Biologic therapy for autoimmune diseases: an update. *BMC Med* 2013;11:88.
- [96] Bluestone JA, St Clair EW, Turka LA. CTLA4lg: bridging the basic immunology with clinical application. *Immunity* 2006;24(3):233–8.
- [97] Salomon B, Bluestone JA. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu Rev Immunol* 2001;19:225–52.
- [98] Moreland LW, et al. Costimulatory blockade in patients with rheumatoid arthritis: a pilot, dose-finding, double-blind, placebo-controlled clinical trial evaluating CTLA-4lg and LEA29Y eighty-five days after the first infusion. *Arthritis Rheum* 2002;46(6):1470–9.
- [99] Larsen CP, et al. Rational development of LEA29Y (belatacept), a high-affinity variant of CTLA4-Ig with potent immunosuppressive properties. *Am J Transplant* 2005;5(3):443–53.
- [100] Tesavibul N, et al. Costimulatory molecules in ocular cicatricial pemphigoid. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39(6):982–8.
- [101] Hardy KM, et al. Benign mucous membrane pemphigoid. *Arch Dermatol* 1971;104(5):467–75.
- [102] Fukai T, et al. The role of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 in mice with experimental autoimmune uveoretinitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1999;237(11):928–33.
- [103] Silver PB, et al. Blockade of costimulation through B7/CD28 inhibits experimental autoimmune uveoretinitis, but does not induce long-term tolerance. *J Immunol* 2000;165(9):5041–7.
- [104] Verwaerde C, et al. Ocular transfer of retinal glial cells transduced ex vivo with adenovirus expressing viral IL-10 or CTLA4-Ig inhibits experimental autoimmune uveoretinitis. *Gene Ther* 2003;10(23):1970–81.
- [105] Zulian F, et al. Abatacept for severe anti-tumor necrosis factor alpha refractory juvenile idiopathic arthritis-related uveitis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 2010;62(6):821–5.
- [106] Kenawy N, et al. Abatacept: a potential therapy in refractory cases of juvenile idiopathic arthritis-associated uveitis. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2011;249(2):297–300.
- [107] Wu YL, et al. Immunotherapies: the blockade of inhibitory signals. *Int J Biol Sci* 2012;8(10):1420–30.
- [108] Lipson EJ, et al. Durable cancer regression off-treatment and effective reinduction therapy with an anti-PD-1 antibody. *Clin Cancer Res* 2013;19(2):462–8.
- [109] Ortler S, et al. B7-H1 restricts neuroantigen-specific T cell responses and confines inflammatory CNS damage: implications for the lesion pathogenesis of multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2008;38(6):1734–44.
- [110] Reynolds J, et al. Stimulation of the PD-1/PDL-1 T-cell co-inhibitory pathway is effective in treatment of experimental autoimmune glomerulonephritis. *Nephrol Dial Transplant* 2012;27(4):1343–50.
- [111] Wong M, La Cava A, Hahn BH. Blockade of programmed death-1 in young (New Zealand Black × New Zealand White)F1 mice promotes the suppressive capacity of CD4+ regulatory T cells protecting from lupus-like disease. *J Immunol* 2013;190(11):5402–10.
- [112] Sporic RA, Perrin PJ. Costimulation of memory T-cells by ICOS: a potential therapeutic target for autoimmunity? *Clin Immunol* 2001;100(3):263–9.
- [113] Rottman JB, et al. The costimulatory molecule ICOS plays an important role in the immunopathogenesis of EAE. *Nat Immunol* 2001;2(7):605–11.
- [114] Hu YL, et al. B7RP-1 blockade ameliorates autoimmunity through regulation of follicular helper T cells. *J Immunol* 2009;182(3):1421–8.
- [115] Usui Y, et al. The role of the ICOS/B7RP-1 T cell costimulatory pathway in murine experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur J Immunol* 2006;36(11):3071–81.
- [116] Hunig T. Manipulation of regulatory T-cell number and function with CD28-specific monoclonal antibodies. *Adv Immunol* 2007;95:111–48.
- [117] Poirier N, et al. Inducing CTLA-4-dependent immune regulation by selective CD28 blockade promotes regulatory T cells in organ transplantation. *Sci Transl Med* 2010;2(17):17ra10.
- [118] Poirier N, et al. Preclinical efficacy and immunological safety of FR104, an antagonist anti-CD28 monovalent Fab' antibody. *Am J Transplant* 2012;12(10):2630–40.
- [119] Poirier N, Blanche G, Vanhove B. A more selective costimulatory blockade of the CD28-B7 pathway. *Transpl Int* 2011;24(1):2–11.
- [120] Poirier N, Blanche G, Vanhove B. CD28-specific immunomodulating antibodies: what can be learned from experimental models? *Am J Transplant* 2012;12(7):1682–90.

ANEXO

Critérios para análise histopatológica de olhos de camundongos com EAU

<i>Grau de doença</i>	<i>Critérios</i>
0	Sem alteração
0,5	Pouco infiltrado de células inflamatórias; sem dano
1	Infiltrado inflamatório; dobra nas camadas da retina e descolamento localizado da retina; poucos granulomas na coroide e retina; perivascularidade
2	Infiltrado inflamatório moderado; dobras e descolamento da retina; dano (localizado) das células fotorreceptoras; granulomas de pequeno a médio tamanho; perivasculite e vasculite
3	Infiltrado inflamatório moderado a extenso; extenso dobramento das camadas da retina e seu descolamento; dano moderado das células fotorreceptoras; granulomas de médio tamanho; neovascularização retiniana
4	Extenso infiltrado inflamatório; descolamento difuso da retina com exsudato seroso e sangramento subretiniano; extenso dano das células fotorreceptoras; lesões granulomatosas de grande tamanho; neovascularização retiniana

Referência:

Caspi, R.R. et al (1994). Endogenous systemic interferon-gamma has a protective role against ocular autoimmunity in mice. *J. Immunol.* 152:890- 899.