

**Escola Superior de Ensino do Instituto Butantan
Programa de Especialização na Área da Saúde
Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos**

Ana Paula Peixoto

**Avaliação imunológica dos camundongos geneticamente selecionados para diferente
capacidade de produção de anticorpo**

São Paulo

2023

Ana Paula Peixoto

**Avaliação imunológica dos camundongos geneticamente selecionados para diferente
capacidade de produção de anticorpo**

Trabalho de conclusão de curso apresentado ao Curso de Especialização em Biotecnologia para a Saúde – Vacinas e Biofármacos do Programa de Especialização na Área da Saúde da Escola Superior do Instituto Butantan como requisito básico para a obtenção do título de Especialista em Biotecnologia para Saúde.

Orientadora: Nancy Starobinas

São Paulo

2023

Catálogo na Publicação
Instituto Butantan
Dados inseridos pelo(a) aluno(a)

Peixoto, Ana Paula

Avaliação imunológica dos camundongos geneticamente selecionados para diferente capacidade de produção de anticorpo / Ana Paula Peixoto ; orientador(a) Nancy Starobinas - São Paulo, 2023.

52 p. : il.

Monografia (Especialização) - Escola Superior do Instituto Butantan, Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos.

1. Anticorpo IgG 2. Heterogênicos. 3. Isogênicos. 4. Linfócitos T e B I. Starobinas, Nancy. II. Escola Superior do Instituto Butantan. III. Especialização na Área da Saúde - Biotecnologia Para a Saúde - Vacinas e Biofármacos. IV. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela equipe da Biblioteca do Instituto Butantan

AUTORIZAÇÃO PARA ACESSO E REPRODUÇÃO DE TRABALHO

Eu, Ana Paula Peixoto, aluna do Curso de Especialização em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos, autorizo a divulgação do meu trabalho de conclusão de curso por mídia impressa, eletrônica ou qualquer outra, assim como a reprodução total deste trabalho de conclusão de curso após publicação, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

Prazo de liberação da divulgação do trabalho de conclusão de curso após a data da avaliação:

- Imediato
 06 meses
 12 meses
 Outro prazo _____ Justifique:

São Paulo, 10 de janeiro de 2023

Ana Paula Peixoto

.....
Aluna: Ana Paula Peixoto

Nancy Starobinas

De acordo:.....

Orientador(a): Nancy Starobinas

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo e primeiramente à Deus, por me permitir continuar adquirindo experiência de vida e conhecimento com a Especialização no Instituto Butantan.

Aos meus pais, José Odail e Zaida, por todo apoio e perseverança no meu caminho trilhado até aqui, por cada ação e esforço que realizaram para que eu tivesse toda e qualquer oportunidade.

À minha avó Anna que torce sempre pelo meu sucesso e família que sempre foram base para força adquirida em minha caminhada, em especial a Tia Marina, Tio Damm e Mari que sempre presentes, forneceram o melhor cantinho, me deixando extremamente à vontade para que eu pudesse realizar o curso.

Ao meu namorado, André, amigo, amor e confidente que esteve comigo em todos os momentos e sempre solícito.

Aos amigos queridos feitos no curso e no Laboratório de Imunogenética, Mayrielle, Jéssica, Grazielly, Nayara e Nathalia, que se fizeram essenciais no dia a dia, por todo companheirismo e auxílio durante o decorrer desse ano.

À Professora Dra. Nancy Starobinas, pela orientação, oportunidade, paciência e todo ensinamento passado, contribuindo grandemente para o meu crescimento profissional e pessoal. Assim, como aos professores todos do curso de pós-graduação em Biotecnologia para a Saúde (sem deixar de citar a Dra. Aryene Goes Trezena, Dra. Milene Tino e Dr. Orlando Garcia Ribeiro Filho) por todo conhecimento e disponibilidade entregues com destreza a nós alunos.

Aos órgãos de fomento, Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, Fundação Butantan, Instituto Butantan e Escola Superior do Instituto Butantan pelo apoio financeiro na realização dos experimentos e incentivo pessoal.

Por fim, deixo meus sinceros agradecimentos a todos que direta ou indiretamente contribuíram com a minha formação e elaboração deste trabalho.

"Na vida não existe nada a temer, mas a entender".

Marie Curie

RESUMO

PEIXOTO, Ana Paula. **Avaliação imunológica dos camundongos geneticamente selecionados para diferente capacidade de produção de anticorpo**. 2023. 52 p. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Biotecnologia para Saúde – Vacinas e Biofármacos) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

INTRODUÇÃO: A potencialidade da resposta inflamatória ou da resposta imune específica do indivíduo são características complexas que variam de forma contínua e têm uma distribuição normal numa população heterogênea, pois estão sob controle poligênico. Visando o estudo da regulação genética da imunidade específica nosso laboratório desenvolveu linhagens de camundongos heterogênicos geneticamente selecionadas para alta (“*High*” - H_{III}) e baixa (“*Low*” - L_{III}) capacidade de produção de anticorpos a certos antígenos através do processo de seleção genética bidirecional. Para alguns estudos genéticos e imunológicos devem ser utilizados camundongos isogênicos, assim, produzimos no Biotério do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan troncos isogênicos destas linhagens parentais, que após o processo seletivo foram submetidas a cruzamentos consanguíneos. **OBJETIVO:** Avaliar a capacidade de produção de anticorpos assim como as células – linfócitos B e T (CD4⁺ e CD8⁺) após o estímulo do sistema imune com anatoxina diftérica comparando os troncos isogênicos com as linhagens parentais. **METODOLOGIA:** Camundongos isogênicos (*High* – Tronco A e *Low* – Tronco E) e heterogênicos (H_{III} e L_{III}) foram imunizados com anatoxina diftérica. A resposta imune humoral primária e secundária foram avaliadas no soro pela quantificação da produção de anticorpos IgG antidiftéricos através da técnica de ELISA. Para a caracterização do perfil de resposta celular de linfócitos T e B, foram coletados o baço e linfonodos e as células foram identificadas por marcadores de superfície (CD4, CD8, B220) e avaliadas por citometria de fluxo. **RESULTADOS:** Os resultados mostram aumentos significativos na concentração de anticorpos produzidos pelos grupos quando comparadas o soro normal com as respostas primária e secundária. A produção de anticorpos na resposta secundária foi maior nos animais das linhagens H_{III} e Tronco A em relação aos outros grupos. Na resposta celular foi visualizado no linfonodo um aumento significativo de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) e linfócitos B no grupo H_{III} experimental em relação aos outros grupos, entretanto no baço a resposta significativamente aumentada das células T foi detectada nos animais imunizados do grupo L_{III}. Em relação aos troncos isogênicos, os animais do Tronco A apresentaram um aumento de linfócitos T CD4⁺ quando comparados ao Tronco E experimental nas células esplênicas. **CONCLUSÕES:** Os animais selecionados para alta

capacidade de produção de anticorpos apresentaram respostas maiores tanto na secreção de IgG na resposta secundária como na maior frequência de células T e B nos linfonodos. Sendo importante o estudo aprofundado do mecanismo de modulação da resposta imune nessas linhagens para entendimento de efeitos genéticos multiespecíficos frente a determinados antígenos.

Palavras-chave: Camundongos geneticamente selecionados. Anticorpo IgG. Heterogênicos. Isogênicos. Linfócitos T. Linfócitos B.

ABSTRACT

PEIXOTO, Ana Paula. **Immunological evaluation of mice genetically selected for different antibody production capacity.** 2023. 52 p. Monograph (Specialist in Biotechnology in Health) – Escola Superior do Instituto Butantan, São Paulo, 2023.

INTRODUCTION: The potentiality of the inflammatory response or the specific immune response of the individual are complex characteristics that vary continuously and have a normal distribution in a heterogeneous population, since they are under polygenic control. Aiming at the study of the genetic regulation of specific immunity, our laboratory developed strains of heterogeneous mice genetically selected for high – H_{III} and low – L_{III} ability to produce antibodies to certain antigens through the process of genetic selection bidirectional. For some genetic and immunological studies, isogenic mice must be used. Therefore, we produced isogenic trunks of these parental lines in the vivarium of the Immunogenetics laboratory of the Butantan Institute, which after the selection process were subjected to inbreeding.

OBJECTIVE: Evaluate the ability to produce antibodies as well as cells – B and T lymphocytes (CD4 and CD8) after stimulating the immune system with diphtheria anatoxin, comparing isogenic trunks with parental lineages. **METHODOLOGY:** Isogenic mice from Stem A (High) and Stem E (Low) and heterogeneous (H_{III} and L_{III}) were immunized with diphtheria anatoxin. The primary and secondary humoral immune response was evaluated in serum by quantifying the production of anti-diphtheria IgG antibodies using the ELISA technique. For the characterization of the T and B lymphocyte cell response profile, the spleen and lymph nodes were collected and the cells were identified by surface markers (CD4, CD8, B220) and evaluated by flow cytometry. **RESULTS:** The results show significant increases in the concentration of antibodies produced by the groups when comparing normal serum with primary and secondary responses. The production of antibodies in the secondary response was higher in animals from the H_{III} and Stem A strains compared to the other groups. In the cellular response, a significant increase in T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) and B lymphocytes was seen in the lymph node in the experimental H_{III} group compared to the other groups, however in the spleen a significantly increased T cell response was detected in the immunized animals in the L_{III} group. Regarding the isogenic trunks, the animals from Stem A showed an increase in CD4⁺ T lymphocytes when compared to the experimental Stem E in splenic cells. **CONCLUSIONS:** Animals selected for high antibody production capacity showed greater responses both in IgG secretion in the secondary response and in the higher frequency of T and B cells in the lymph nodes. It is important to in-depth study of the modulation mechanism of

the immune response in these strains to understand the multi-specific genetic effects against certain antigens.

Keywords: Mice genetically selected. Immunoglobulin G. Heterogenic. Isogenic. T-Lymphocytes. B-Lymphocytes.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo	21
Figura 2 – Grupos do estudo	22
Figura 3 – Representação da estratégia de análise de citometria de fluxo de células do linfonodo de camundongo macho isogênico experimental (Tronco A).....	26
Figura 4 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (soro normal) em camundongos isogênicos e heterogênicos	28
Figura 5 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (resposta primária) em camundongos isogênicos e heterogênicos	29
Figura 6 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (resposta secundária) em camundongos isogênicos e heterogênicos	30
Figura 7 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (resposta secundária) em camundongos experimentais isogênicos e heterogênicos	31
Figura 8 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (soro normal, resposta primária e secundária) em camundongos experimentais isogênicos e heterogênicos	32
Figura 9 - Gráfico de cinética representando os títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (normal, RP e RS) em camundongos isogênicos e heterogênicos.....	33
Figura 10 – Frequência de linfócitos T CD4 ⁺ no linfonodo de camundongos isogênicos e heterogênicos.....	34
Figura 11 - Frequência de células T CD4 ⁺ no baço de camundongos isogênicos e heterogênicos	35
Figura 12 - Frequência de células T CD8 ⁺ no linfonodo de camundongos isogênicos e heterogênicos.....	36
Figura 13 - Frequência de linfócitos T CD8 ⁺ no baço de camundongos isogênicos e heterogênicos	37
Figura 14 - Frequência de células B220 ⁺ no linfonodo de camundongos isogênicos e heterogênicos.....	38
Figura 15 - Frequência de células B220 ⁺ no baço de camundongos isogênicos e heterogênicos	39
Figura 16 - Gráficos de radar dos linfócitos T e B em camundongos isogênicos	40
Figura 17 - Gráficos de radar dos Linfócitos T e B em camundongos heterogênicos	40
Figura 18 - Correlação entre anticorpos IgG anti-difteria e a frequência de células B no linfonodo e baço de camundongos isogênicos e heterogênicos	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Marcações extracelulares para citometria de fluxo	26
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD – Anatoxina Diftérica
Al(OH)₃ – Hidróxido de Alumínio
BD – Becton Dickinson
BSA – Albumina sérica bovina
CD – Cluster de diferenciação
cels – Células
CEUA – Comitê de Ética no uso de Animais
DTP – Difteria, Tétano, Coqueluche
EF2 – Fator de alongamento 2
ELISA – *enzyme-linked immunosorbent assay*
FVS - *Fixable Viability Stain*
H_{III} – *High III*
IgG – Imunoglobulina G
IL-2 – Interleucina-2
kDa – Kilodalton
Kg – Kilogramas
L_{III} – *Low III*
mAb – Anticorpo monoclonal
mg – Miligramas
MHV3 – Vírus vivo da hepatite murina 3
mL – Mililitros
nm - Nanômetros
OPD – O-Phenylenediamine dihydrochloride
PBS – Tampão fosfato-salino
RP – Resposta Primária
rpm – Rotação por minuto
RS – Resposta Secundária
SBA-15 – Sílica mesoporosa nanoestruturada
SFB – Soro fetal bovino
T CD4⁺ – Linfócito T auxiliar
T CD8⁺ – Linfócito T citotóxico
µg – Microgramas

μL – Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Resposta Imune Adaptativa e seu papel efetor às vacinas.....	15
1.2 Anatoxina Diftérica	15
1.3 Linhagens e Modelo Experimental	16
1.3.1 Seleção III.....	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 Geral	20
2.2 Específicos	20
3 METODOLOGIA.....	21
3.1 Delineamento experimental	21
3.2 Animais	21
3.2.1 Grupos	22
3.3 Preparação do Inóculo	22
3.4 Imunizações via subcutânea e avaliação da memória imunológica	23
3.5 Coleta	23
3.6 Determinação dos títulos de anticorpos.....	23
3.6.1 ELISA	23
3.7 Avaliação da Imunidade celular.....	24
3.7.1 Citometria de Fluxo	24
3.8 Análise estatística.....	27
4 RESULTADOS	28
4.1 Quantificação dos títulos de anticorpos anti-diftéricos.....	28
4.2 Linfócitos T presentes no linfonodo e baço	33
4.3 Linfócitos B presentes no linfonodo e baço	37
5 DISCUSSÃO	42
6 CONCLUSÕES.....	48
REFERÊNCIAS	49

1 INTRODUÇÃO

1.1 Resposta Imune Adaptativa e seu papel efetor às vacinas

A defesa dos organismos contra injúrias e microrganismos é mediada pelos mecanismos efetores da imunidade inata juntamente com a resposta adaptativa, essencial para a ativação de uma resposta mais efetiva e duradoura. Fazem parte desta última a imunidade humoral com produção de anticorpos (Linfócitos B) e a imunidade mediada por células (Linfócitos T) e seus produtos, em que os linfócitos expressam alta gama de receptores capazes de reconhecer diversos antígenos, tendo como característica especificidade, diversidade, memória e autotolerância (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2019).

A resposta imune adaptativa às vacinas de antígenos complexos é heterogênea e tem como resposta protetora eficaz predominante a produção de anticorpos específicos para o antígeno (capazes de se ligar especificamente a uma toxina ou um patógeno), ativação de células B (são essencialmente ativadas nos gânglios linfáticos), indução de linfócitos T CD8⁺ citotóxicos que reconhecem e matam células infectadas, com secreção de citocinas antivirais específicas e subconjuntos de linfócitos T CD4⁺ auxiliares de papel importante na produção de citocinas pró e anti-inflamatórias que dão suporte para a geração e manutenção das demais respostas (SIEGRIST, 2008).

A maioria das vacinas protege por indução de anticorpos, porque muitos patógenos como o agente da difteria exercem sua ação através da produção de toxinas que podem ser neutralizadas por antitoxina, portanto nesse caso os anticorpos são considerados o correlato da proteção absoluta (uma quantidade de resposta imune específica a vacina garante quase 100% de proteção) para qual a vacina é eficaz (PLOTKIN, 2008). Dessa forma a imunidade à difteria envolve uma resposta de anticorpos à toxina diftérica após doença clínica (MURPHY, 1996).

1.2 Anatoxina Diftérica

A toxina causadora da difteria, infecção altamente transmissível e potencialmente mortal que acomete a garganta e o nariz (RASMUSSEN et al., 2021) é considerada uma exotoxina sintetizada como uma forma precursora de 61kDa pela bactéria intracelular *Corynebacterium diphtheriae*, que age inibindo a síntese proteica envolvendo o fator de alongamento 2 (EF2) (GUILHEN et al., 2014).

Para a prevenção da difteria, a utilização dessa toxina como vacina começou em 1924, nos estudos realizados por Gaston Ramon do Instituto Pasteur que descreveu que toxinas como a da difteria quando inativadas por formaldeído ou tratamento térmico continuavam antigênicas mediante imunização em cobaias e cavalos, mas sem a presença de toxicidade e ainda com a variação dos títulos de anticorpos nos animais (CAVAILLON, 2018). Glenny e Hopkins (1923) propuseram o uso de toxinas tratadas com formalina, descobrindo uma imunização mais eficaz do toxóide (toxina inativada) precipitado com alúmen.

Para melhorar a resposta imune ao componente diftérico de uma vacina, várias formas de adjuvantes são testadas e implantadas, pois não é uma opção viável aumentar a dosagem do componente diftérico devido a ocorrência de efeitos colaterais como os vistos por Simonsen e colaboradores (1986), tendo como causa vacinas de reforço com altas concentrações de toxóide diftérico. A maior imunogenicidade foi obtida quando adsorvida com sais de alumínio (PARK; SCHRODER, 1932), utilizado ainda atualmente o hidróxido de alumínio ($\text{Al}(\text{OH})_3$) está presente na formulação de vacinas multivalentes para difteria combinadas com outros antígenos.

O Instituto Butantan começou o desenvolvimento de vacinas contra difteria em 1930 e atualmente fornece ao Ministério da Saúde a vacina de proteção contra a difteria inserida na produção da vacina tríplice bacteriana (DTP), dupla adulto, dupla infantil e vacina acelular que contém o toxóide ou anatoxina diftérica (que é a toxina detoxificada) obtida da produção pelas bactérias *Corynebacterium diphtheriae* adsorvida por $\text{Al}(\text{OH})_3$ (Instituto Butantan, 2021).

1.3 Linhagens e Modelo Experimental

A genética possui papel essencial na formação das respostas imunológicas em estados fisiológicos e patológicos, proveniente dela estão os genes que codificam os elementos do sistema imune e esses possuem importantes *loci* reguladores acondicionados no genoma, quando na presença de alterações, mudanças nas respostas defensivas equilibradas do sistema imunológico são decorrentes. Dessa forma a imunogenética trabalha para entender e encontrar o conjunto de genes responsáveis pela modulação da resposta imune que auxilia no estudo da patogênese de doenças complexas (RAJABI; JABALAMELI; REZAEI, 2022).

A potencialidade da resposta inflamatória ou da resposta imune específica do indivíduo são características complexas que variam de forma contínua e têm uma distribuição normal numa população heterogênea, pois estão sob controle poligênico, ou seja, são regulados pela interação aditiva de vários *loci* gênicos que segregam independentemente (FALCONER, 1970;

BIOZZI et al., 1979). Para estudar a genética de caracteres multifatoriais, a seleção genética bidirecional é um método que permite concentrar nas linhagens obtidas muitas das variantes alélicas nos diversos *loci* que são implicados na variação fenotípica de interesse (SOUZA et al., 2004).

Visando o estudo da regulação genética da imunidade específica, nosso laboratório desenvolveu linhagens de camundongos geneticamente selecionadas para a produção de anticorpos. A partir de populações heterogêneas quanto à expressão destes caracteres, através do processo de seleção genética bidirecional, obtiveram-se linhagens que expressam os extremos desse fenótipo. As linhagens selecionadas foram obtidas após várias gerações de acasalamentos entre os indivíduos que expressavam os fenótipos extremos de produção de anticorpos. Evitando cruzamentos consanguíneos, buscou-se atingir a máxima separação fenotípica entre essas linhagens, ponto em que se admite que os alelos com efeito aditivo e oposto na determinação do caráter estejam segregados e em homozigose em todos os *loci* que é alcançado quando a diferença entre as respectivas linhagens é máxima (limite de seleção).

O processo de seleção promove uma progressiva divergência entre as linhagens com concomitante redução da variância intralinhagem quanto à expressão dos caracteres de interesse. Os animais selecionados expressam fenótipos extremos não encontrados na população inicial, devido ao efeito aditivo dos vários *loci* gênicos, que contribuem para a alta ou baixa resposta, que foram acumulados nas respectivas linhagens durante o processo seletivo (BIOZZI et al., 1979). Dentre os fenótipos selecionados está a capacidade de produção de anticorpos nas linhagens da Seleção III.

A partir então, de uma população inicial heterogênica (F0) de camundongos albinos (Swiss) não consanguíneos oriundos de quatro colônias distintas, cinco seleções foram desenvolvidas por cruzamentos seletivos de duas vias para resposta máxima ou mínima à aglutinina e imunógenos naturais (eritrócitos, *Salmonella* ou proteínas) em cada geração consecutiva. Esse acasalamento seletivo foi feito com a resposta mais alta que geraram camundongos da linhagem H (*high*) e com a resposta mais baixa que geraram camundongos com a linhagem L (*low*), que só foi possível pela interação de alelos, localizados em vários *loci* independentes, que se acumulam progressivamente em camundongos H e L durante as gerações consecutivas até a homozigose (DORIA et al., 1997).

A divergência fenotípica que ocorreu nestes animais devido as alterações genéticas promovidas pela pressão seletiva exercida durante o processo de obtenção destas linhagens, repercutiu também em diferenças significativas relacionadas a caracteres complexos como a sensibilidade a doenças autoimunes (JENSEN et al., 2001; ROSSATO et al., 2019), a incidência

de tumores induzidos (IBAÑEZ et al., 1999), bem como, a resistência a diversas infecções bacterianas (BIOZZI et al., 1985; TREZENA et al., 2002) e parasitárias (SIQUEIRA et al., 1985) dentre as quais inclui-se a diferença de resistência ao *T. cruzi* observada nas linhagens da Seleção III (VORRARO et al., 2014).

1.3.1 Seleção III

Essa seleção foi desenvolvida para estudo da regulação gênica da resposta imune específica e teve como resultado duas linhagens que apresentam capacidade de alta (*High* – H_{III}) e baixa (*Low* – L_{III}) produção de anticorpos a antígenos complexos. A pressão seletiva exercida sobre estas linhagens atuou em fatores do controle genético da produção de anticorpos por efeito multiespecífico na seleção III em que os efeitos alto e baixo dos alelos selecionados não estão limitados ao antígeno de seleção.

O fenótipo da seleção III se deu pela reprodução seletiva para pico de resposta por aglutinina (quantificação dos títulos aglutinantes de anticorpos séricos produzidos na resposta secundária aos antígenos flagelares de *Salmonella* entérica dos sorotipos (*Typhimurium* e *Oranienburg*) utilizados alternadamente na imunização de gerações consecutivas, de modo a evitar a interferência de anticorpos maternos na caracterização do fenótipo. A máxima separação das linhagens responsivas para alta e baixa capacidade de produção de anticorpo foi atingida após 16 a 19 gerações consecutivas, isso indica que a responsividade a aglutinina é controlada pelo efeito aditivo de vários *loci* independentes (regulação poligênica) (SIQUEIRA et al., 1976; SANT'ANNA et al., 1982).

Esta diferença, porém, estende-se a outros antígenos complexos não relacionados aos de seleção, tais como o antígeno somático de *Salmonella*, eritrócitos de carneiro, imunoglobulinas humana e bovina (SIQUEIRA et al., 1977).

Na investigação dos diversos mecanismos que poderiam ser responsáveis pela diferença no potencial de resposta destas linhagens foi constatado que ainda que a razão entre as subpopulações de células T CD4⁺ e T CD8⁺ (citotóxicos) e de linfócitos B tenha se mostrado semelhante nas linhagens H_{III} e L_{III}, a neutralização de células T CD4⁺ *in vivo* teve um efeito mais duradouro e severo quanto a retomada da produção de anticorpos para os animais L_{III} (REIS et al., 1992).

No entanto, a capacidade de resposta linfoproliferativa antígeno-específica, inclusive para antígenos não relacionados aos de seleção, foi maior nos animais H_{III} em relação aos L_{III}, mesmo sendo a produção de Interleucina-2 (IL-2) similar nas duas linhagens. Indicando assim

que ambas as linhagens possuem capacidade semelhante de apresentação do antígeno, visto que o tratamento *in vivo* com sílica, que neutraliza a atividade catabólica do antígeno pelos macrófagos, não teve efeito na diferença de produção de anticorpos das linhagens H_{III} e L_{III} (REIS et al., 1992; GENNARI et al., 1987).

Para alguns estudos genéticos e imunológicos devem ser utilizados camundongos isogênicos. Assim, produzimos no Biotério do laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan troncos isogênicos destas linhagens H_{III} e L_{III} que após o processo seletivo, foram submetidas a cruzamentos consanguíneos para promover a isogênia também do fundo genético destes animais, foi observado que esses animais apresentavam o mesmo fenótipo de produção de anticorpos observado nas linhagens parentais não isogênicas (JENSEN et al., 2006).

Estas linhagens demonstraram possuir significado biológico importante em fenômenos imunológicos regidos por um controle genético complexo. A variedade de fenótipos distintos associados a estas linhagens poderia indicar que os *loci* gênicos reguladores da resposta imune específica nestes animais, poderiam ser também fatores genéticos determinantes do tipo de resposta frente a estas doenças multifatoriais.

Desse modo, o presente estudo pretende avaliar a capacidade de produção de anticorpos assim como a resposta imune celular utilizando como estímulo a imunização com anatoxina diftérica e comparar esses fenótipos nos troncos isogênicos com as linhagens parentais.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Comparar a resposta imune entre os animais dos troncos isogênicos (Tronco A e Tronco E) e das linhagens parentais heterogêneas (H_{III} e L_{III}) imunizados com anatoxina diftérica (AD) e/ou alúmen, além de grupos heterogêneos (H_{III} e L_{III}) sem imunização, pela avaliação quantitativa da produção de anticorpos e da frequência celular de linfócitos B e T (CD4⁺ e CD8⁺) desses camundongos geneticamente selecionados para diferente capacidade de produção de anticorpos.

2.2 Específicos

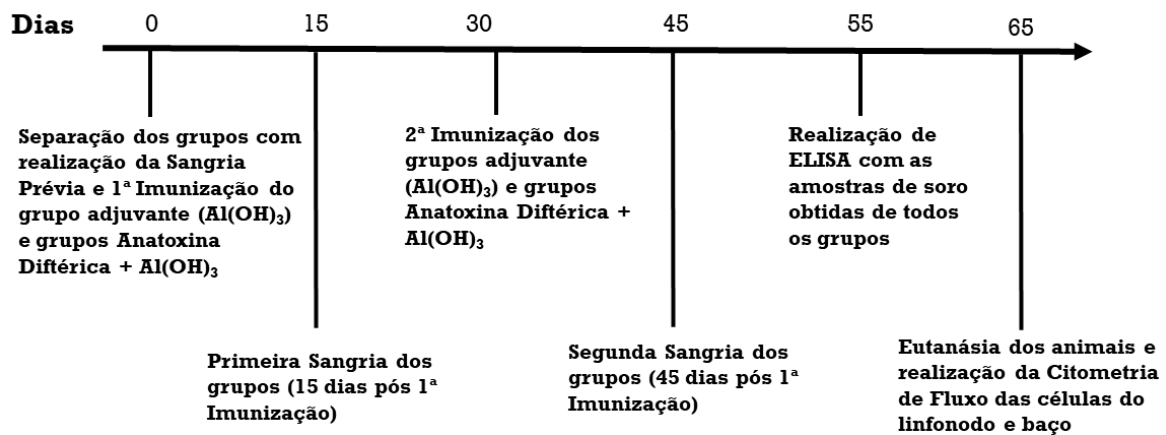
- a) Quantificar por ELISA o título de anticorpos obtidos do soro dos animais heterogênicos e isogênicos imunizados com AD e/ou alúmen.
- b) Quantificar por citometria de fluxo a frequência celular de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) obtidos do linfonodo e do baço dos animais heterogênicos e isogênicos imunizados com AD e/ou alúmen.
- c) Quantificar por citometria de fluxo a frequência celular de linfócitos B obtidos do linfonodo e do baço dos animais heterogênicos e isogênicos imunizados com AD e/ou alúmen.
- d) Correlacionar a produção de anticorpos (resposta humoral) com a frequência de resposta celular encontrada nos camundongos heterogênicos e isogênicos imunizados com AD.

3 METODOLOGIA

3.1 Delineamento experimental

O projeto realizado no laboratório de Imunogenética pertencente ao Instituto Butantan, destinado a avaliação imunológica teve como amostras biológicas para a realização do estudo, sangue, baço e linfonodos de animais geneticamente selecionados para diferente capacidade de produção de anticorpo, sendo possível a avaliação da produção de anticorpo anti-anatoxina diftérica (resposta humoral primária e secundária) e da frequência de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) e B (resposta celular ao antígeno).

Figura 1 – Delineamento experimental do estudo



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Delineamento representando as fases do estudo, técnicas realizadas e os respectivos dias.

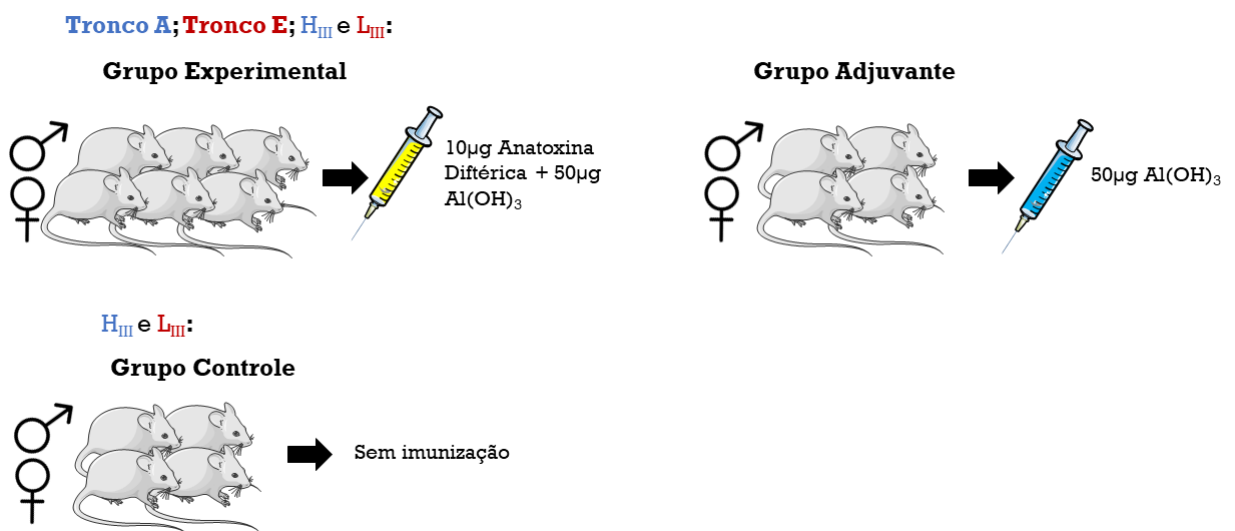
3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, com aproximadamente 3 meses de idade, todos derivados da seleção III, H_{III} e L_{III} da linhagem original parental heterogênea F123 (geração) e camundongos isogênicos F70 (geração) do Tronco A e Tronco E, geneticamente selecionados para alta (H_{III} e Tronco A) e baixa (L_{III} e Tronco E) produção de anticorpos, provenientes do Biotério do Laboratório de Imunogenética do Instituto Butantan. A pesquisa foi aprovada pela Comissão de Ética do Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB Nº 6914010422).

3.2.1 Grupos

Os animais foram separados em grupos adjuvante que é controle da imunização (imunizados apenas com $\text{Al}(\text{OH})_3$, constituídos por 4 animais, 2 machos e 2 fêmeas) e grupos experimentais (imunizados com a AD + $\text{Al}(\text{OH})_3$, constituídos por 6 animais, 3 machos e 3 fêmeas) por linhagem e dentro de cada uma pela diferente capacidade de produção de anticorpo: isogênicos (Tronco A e Tronco E) e heterogênicos (H_{III} e L_{III}). Também foram separados grupos controles heterogênicos H_{III} e L_{III} sem imunização/basal, constituído por 4 animais sendo 2 machos e 2 fêmeas.

Figura 2 – Grupos do estudo



Fonte: próprio autor, 2023.

3.3 Preparação do Inóculo

O toxóide diftérico ou AD, foi fornecido pela Central de Purificação de Produtos Bacterianos da Divisão Bioindustrial do Instituto Butantan em uma concentração de 2mg/mL. Cada dose do antígeno foi preparada com 10µg de AD em 50µg de gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ 2% *Brenntag* (10mg/mL), diluída em 200µL de solução de Tampão fosfato-salino (PBS). As soluções com apenas 50µg de gel de $\text{Al}(\text{OH})_3$ 2% também foram preparadas.

3.4 Imunizações via subcutânea e avaliação da memória imunológica

Os camundongos H_{III}, L_{III}, Tronco A e Tronco E foram imunizados com AD e/ou Al(OH)₃ (200µL/animal) por via subcutânea no dia 0. Para a avaliação da resposta humoral secundária, os animais receberam dose reforço 30 dias após a primeira imunização, assim o esquema de imunização foi composto por 2 doses. O acompanhamento das respostas primária (RP) e secundária (RS) foram feitos a partir de sangrias quinzenais pelo plexo venoso retro orbital, para posterior avaliação da cinética de produção de anticorpos séricos Imunoglobulina G (IgG) total.

3.5 Coleta

Pela sangria então, coletou-se de 100µL a 200µL de sangue de cada animal previamente anestesiados com colírio de cloridrato de proximetacaína 0,5%, por punção com tubo capilar via plexo retro-orbital, acondicionado em tubos *BD Microtainer SST™* (com aditivo ativador de coágulo e gel separador). As amostras foram então centrifugadas a 10.000rpm por 2 minutos para obtenção do soro, que foi armazenado a -20°C até o uso. Utilizadas posteriormente para a avaliação da produção de anticorpos.

3.6 Determinação dos títulos de anticorpos

Os títulos de anticorpos anti-difteria foram determinados por ELISA, foram utilizados os soros obtidos nos dias 0, 15 e 45 entre as imunizações.

3.6.1 ELISA

Para a realização da técnica de ELISA foi utilizada placa de 96 poços, sensibilizada com o antígeno da difteria a uma concentração de 5µg/ml de antígeno (0,5µg/poço). Para tanto, 25µL da AD (2mg/mL) foi adicionado em 9.975µL de tampão Carbonato-Bicarbonato 0,1M, pH=9,5, para que 100µL dessa solução fosse adicionado por poço, com posterior incubação em estufa a 37°C por 2 horas. O líquido foi descartado da placa para que fosse inserido 200µL por poço da solução de bloqueio, que consiste em albumina sérica bovina (BSA) 1% + PBS com posterior incubação da placa a 4°C *overnight*.

No dia seguinte lavou-se a placa três vezes (3 ciclos de 300µL) com tampão de lavagem contendo PBS + *tween 20* (0,02%) (procedimento feito na máquina *WellWash™ Thermo Scientific*). O próximo passo foi pipetar as amostras na placa com diluição (50µL) de forma seriada (fator 2) em tampão PBS + *tween* (0,02%) + BSA 1%, sendo a diluição padronizada para cada amostra de soro a ser analisada, como controle da reação foram colocados soro positivo, soro normal sem anticorpos para difteria e só o tampão de diluição como branco (50µL). Foi realizada incubação de 1 hora a 37°C na estufa.

Posteriormente, a placa foi lavada com 3 ciclos, pipetou-se 50µL/por poço do anticorpo de detecção conjugado (anti-IgG de camundongo, marcado com enzima peroxidase (KPL, EUA) diluído a 1:7500 com incubação por 1 hora a 37°C na estufa. Foi realizado novo ciclo de lavagens e para a revelação foi adicionado substrato de O-Fenilenodiamina (OPD) em tampão Citrato-Fosfato (pH=5,0) + água oxigenada 30% (*Sigma*) e incubação por 15 minutos a temperatura ambiente com ausência de luz.

No último passo, foi adicionado ácido sulfúrico (H₂SO₄ 2N) para parada da reação. A leitura foi realizada no espectrofotômetro automático *µQuant™ - BioTek Instruments*, com a DO no leitor a 490nm. Os resultados foram obtidos com filtro “*blank 490*” tendo assim o desconto das amostras em branco.

3.7 Avaliação da Imunidade celular

Os animais dos grupos experimentais e adjuvantes (isogênicos e heterogêneos) foram então eutanasiados e coletado seu baço e linfonodos (axiais, inguinais) para obtenção das células que foram marcadas com anticorpos (Anti-CD4, anti-CD8, anti-B220 e “*Fixable Viability Stain*” (FVS) para avaliação no Citômetro de fluxo.

3.7.1 Citometria de Fluxo

O baço e os linfonodos dos animais dos grupos experimental, adjuvante e controle heterogênico foram retirados e divulsionados mecanicamente, com auxílio de pinças e passagem por seringa de 1mL para o baço, para os linfonodos utilizou-se um homogeneizador com êmbolo.

As células obtidas dos órgãos foram transferidas para tubos cônicos de 15mL acoplado com filtro de nylon (previamente lavado com 1mL de PBS 10% SFB) para filtração e acrescentado 1mL de PBS 10% SFB, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1200rpm à

4°C e descartado o sobrenadante. Para o baço foi necessário acrescentar 5mL do tampão de lise ao tubo com incubação em banho maria 37°C por 5 minutos, após uma nova centrifugação o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspensão em 1mL de PBS 10% SFB para a contagem.

A contagem das células foi feita em hemocitômetro de *Malassez*TM *HBG*, seguindo as suas respectivas diluições (baço: 1/50, consistindo de 5µL de células + 25µL de azul de tripan + 220µL de PBS) e (linfonodo: 1/10 (10µL de células + 20µL de azul de tripan + 70µL de PBS) e a concentração foi acertada para 10⁶ células por poço de marcação, diluídas em 25µL/poço de PBS + FVS com incubação por 15 minutos no escuro a 25°C.

As células foram lavadas acrescentando 100µL de PBS 2% SFB por poço e a placa centrifugada, com sobrenadante descartado. A placa foi então bloqueada com 10µL de *Fc-Block* (720µg/mL) por 10 minutos a 4°C no escuro (diluição 1µg/10⁶ células) e depois lavada com PBS 2% SFB com posterior centrifugação e descarte do sobrenadante. Foi feita a marcação com os anticorpos acoplados ao fluorocromo (25µL), as células foram incubadas a 4°C por 30 minutos na ausência de luz. Posteriormente estas foram lavadas novamente com PBS 2% SFB para remoção dos anticorpos não ligados e centrifugadas por 5 minutos em 1200rpm a 4°C. Com o sobrenadante descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 100 µl de PBS 2% SFB sendo transferidos para tubos de FACS com adição de paraformaldeído 2% para conservar até a leitura no citômetro.

Foram feitos tubos sem marcação nenhuma para a retirada do isotipo como controle e nos tubos de marcação as células foram marcadas na superfície com *Rat Anti-Mouse* CD4-FITC (cat:553729; clone:GK1.5; *BD Pharmingen*TM) para linfócitos T auxiliares, com *Rat Anti-Mouse* CD8-APC (cat:553035; clone:53-6.7; *Pharmingen*TM) para linfócitos T citotóxicos e com *Rat Anti-Mouse* B220-PE (cat:553089; clone:RA3-6B2; *Pharmingen*TM) para linfócitos B. Foi utilizado também um marcador de viabilidade celular FVS (*Pacific-Blue*TM).

As amostras foram adquiridas pelo Citômetro BD *FACSCanto II*TM BD (*BD Biosciences*), exportadas como arquivos FCS e analisadas usando o software *FlowJo*® versão 10.8.1 (FlowJo LLC, Ashland, OR, EUA).

Após a realização da técnica de citometria de fluxo, foi realizada a análise onde foram avaliadas as populações de interesse por Gate (indica a população de células que possui uma determinada molécula) na amostra que está sendo estudada. Nessa avaliação, também foi utilizada a porcentagem de células positivas para as moléculas de interesse.

Para a análise da frequência de células (linfócitos T e B) do baço e dos linfonodos dos animais avaliados, o valor da porcentagem dos quadrantes provenientes da marcação por Gate

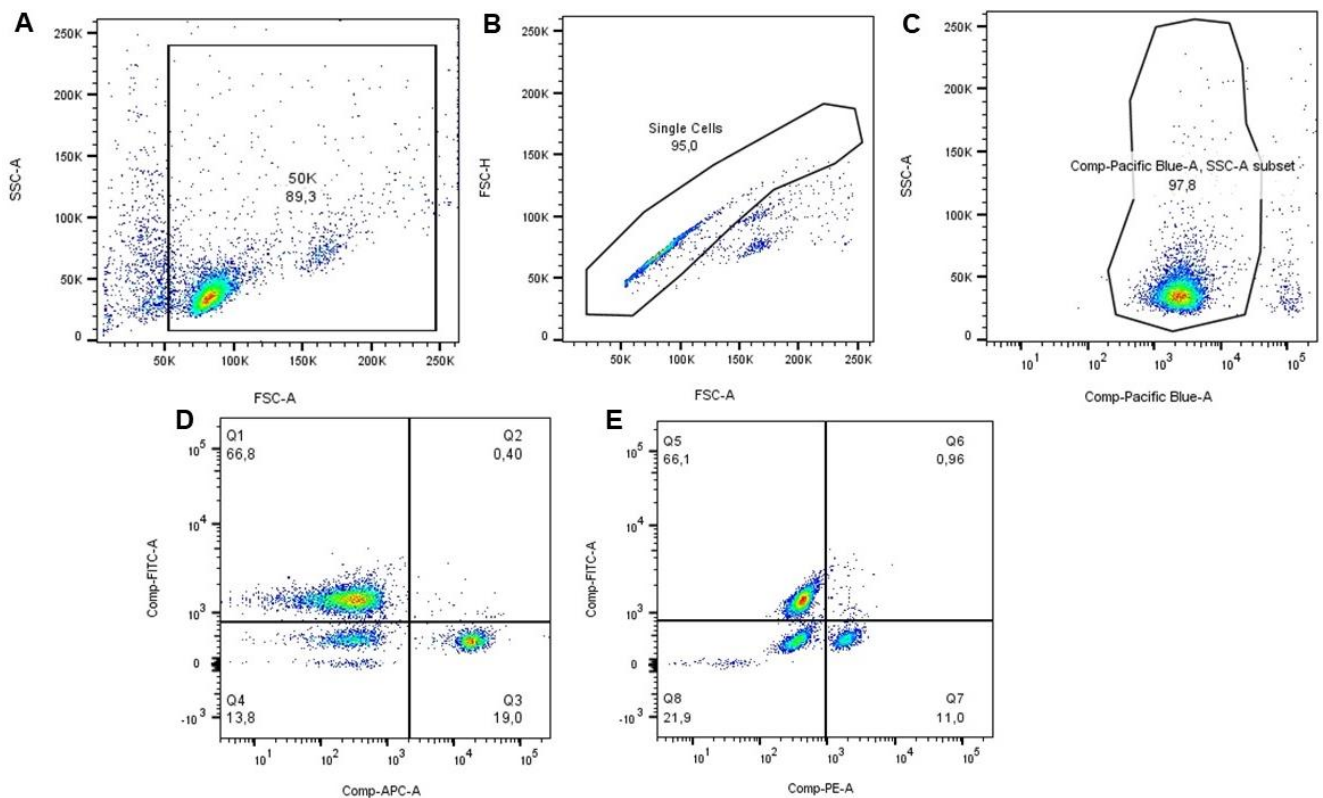
foi transformado em número absoluto de acordo com o número total de células obtidos na contagem dos órgãos analisados.

Tabela 1 – Marcações extracelulares para citometria de fluxo

Tubos	Descrição	Marcação extracelular
1	Linfócitos T e B	Controle não marcado
2	Linfócitos T e B	CD4 - FITC CD8 - APC B220 - PE FVS Pacific-Blue

Fonte: próprio autor, 2023.

Figura 3 – Representação da estratégia de análise de citometria de fluxo de células do linfonodo de camundongo macho isogênico experimental (Tronco A)



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: a) Estratégia de gate para retirada de debris. b) Gate para Single cells. c) A viabilidade (FVS) foi usada como marcador vivo/morto. d) Linfócitos T auxiliares CD4⁺ (FITC) e linfócitos T citotóxicos CD8⁺ (APC). e) Linfócitos B B220⁺ (PE).

3.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram testados para verificar a distribuição normal. Quando a distribuição se apresentou normal, foi utilizado o teste paramétrico “*one-way ANOVA*” com pós teste de “*Tukey*” para comparação entre mais de 2 grupos não pareados, com resultados expressos em média \pm desvio padrão. Quando a distribuição se apresentou não gaussiana, foi utilizado o teste não paramétrico (“*kruskal-wallis*” com pós teste de “*Dunn*”) para comparação entre mais de 2 grupos não pareados, sendo os resultados expressos em medianas com valores mínimo e máximo. As diferenças observadas foram consideradas significantes $p < 0,05$ (5%). Para análise dos dados foi utilizado o *GraphPad Prism 8.4.3* (GraphPad Software).

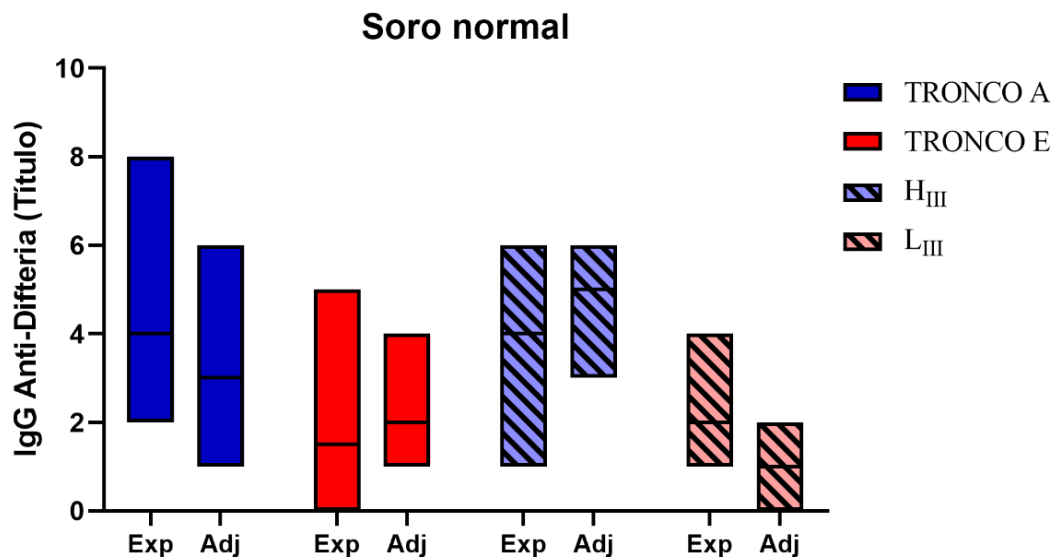
4 RESULTADOS

4.1 Quantificação dos títulos de anticorpos anti-diftéricos

Títulos séricos de anticorpos anti-difteria (IgG total). Para análise da resposta humoral (RP e RS) dos grupos foi quantificado o título de anticorpos dos animais heterogênicos e isogênicos (experimentais e adjuvantes) pela técnica de ELISA. Os anticorpos foram quantificados no soro coletado nos dias 0 (soro normal), 15 (sangria primária) e 45 (sangria secundária) referentes a resposta basal, resposta (RP) primária e resposta secundária (RS), respectivamente.

A concentração de anticorpos no soro normal foi semelhante entre os grupos e linhagens sem diferença estatística significativa. Demonstrando uma resposta em homeostase desses animais sem nenhum estímulo imunizante (Figura 4).

Figura 4 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (soro normal) em camundongos isogênicos e heterogênicos



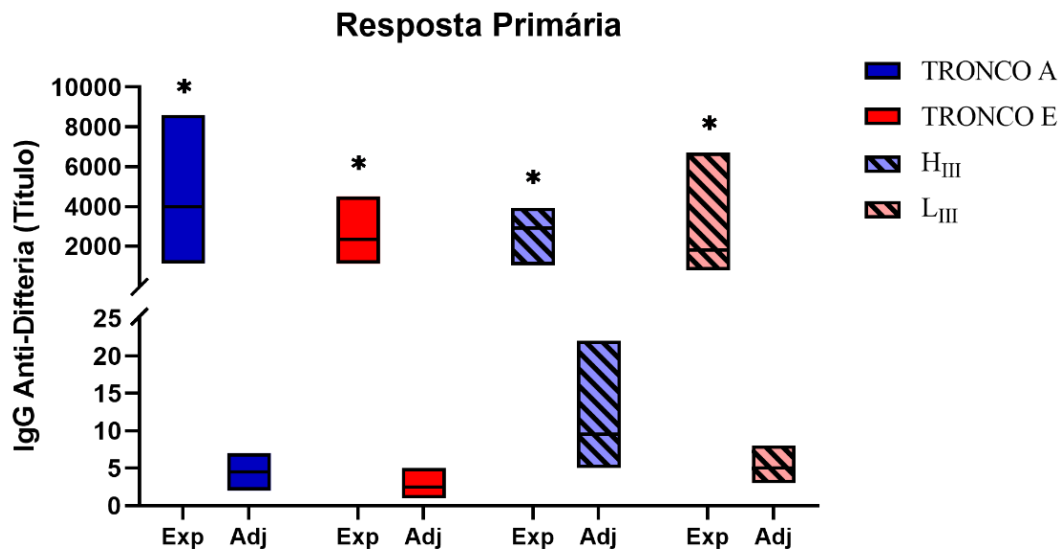
Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: O gráfico representa a concentração de anticorpos séricos IgG totais detectados por ELISA no soro normal dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}. Para comparação dos dados não paramétricos foi realizado o teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn para mais de 3 grupos e o teste Mann-Whitney para 2 grupos (resultado expresso em mediana min e max).

A concentração de anticorpos na RP se encontra semelhante nos animais (machos e fêmeas) experimentais das linhagens Tronco A (com mediana 3996), Tronco E (2342), H_{III} (2914) e L_{III} (1795), assim como nos animais do grupo adjuvante das linhagens Tronco A (4,5),

Tronco E (2,5), H_{III} (9,5) e L_{III} (5,0), sem diferença significativa. É possível ver diferença significativa no aumento da concentração de anticorpos dos grupos experimentais *vs* adjuvantes dentro de cada linhagem (Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}) quando comparadas entre si as medianas 15 dias após a primeira imunização (Figura 5). Mostrando que a imunização induziu a produção de anticorpos em todas as linhagens analisadas.

Figura 5 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (resposta primária) em camundongos isogênicos e heterogênicos

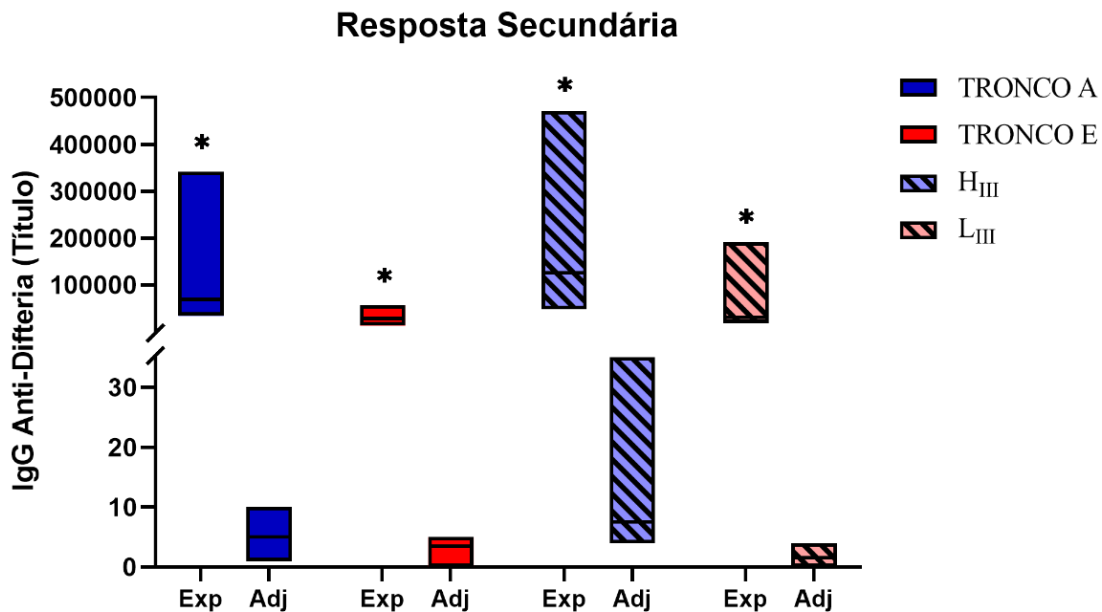


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: O gráfico representa a concentração de anticorpos séricos IgG totais detectados por ELISA no soro da resposta primária dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}. Para comparação dos dados não paramétricos foi realizado o teste Mann-Whitney para 2 grupos (resultado expresso em mediana min e max). * $p < 0,05$ (comparação entre os animais experimentais e adjuvantes).

O mesmo perfil é encontrado no título de IgG total obtido da RS quando comparadas entre si as medianas dos animais experimentais com as dos animais do grupo adjuvante na mesma linhagem: Tronco A experimental (com mediana 68938) *vs* adjuvante (5,0), Tronco E experimental (27086) *vs* adjuvante (3,5), H_{III} experimental (125292) *vs* adjuvante (7,5) e L_{III} experimental (29764) *vs* adjuvante (1,5), sendo possível ver diferença significativa, com aumento da concentração de anticorpos nos grupos experimentais em relação aos animais que receberam apenas o adjuvante, 45 dias após a primeira imunização (Figura 6).

Figura 6 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (resposta secundária) em camundongos isogênicos e heterogênicos

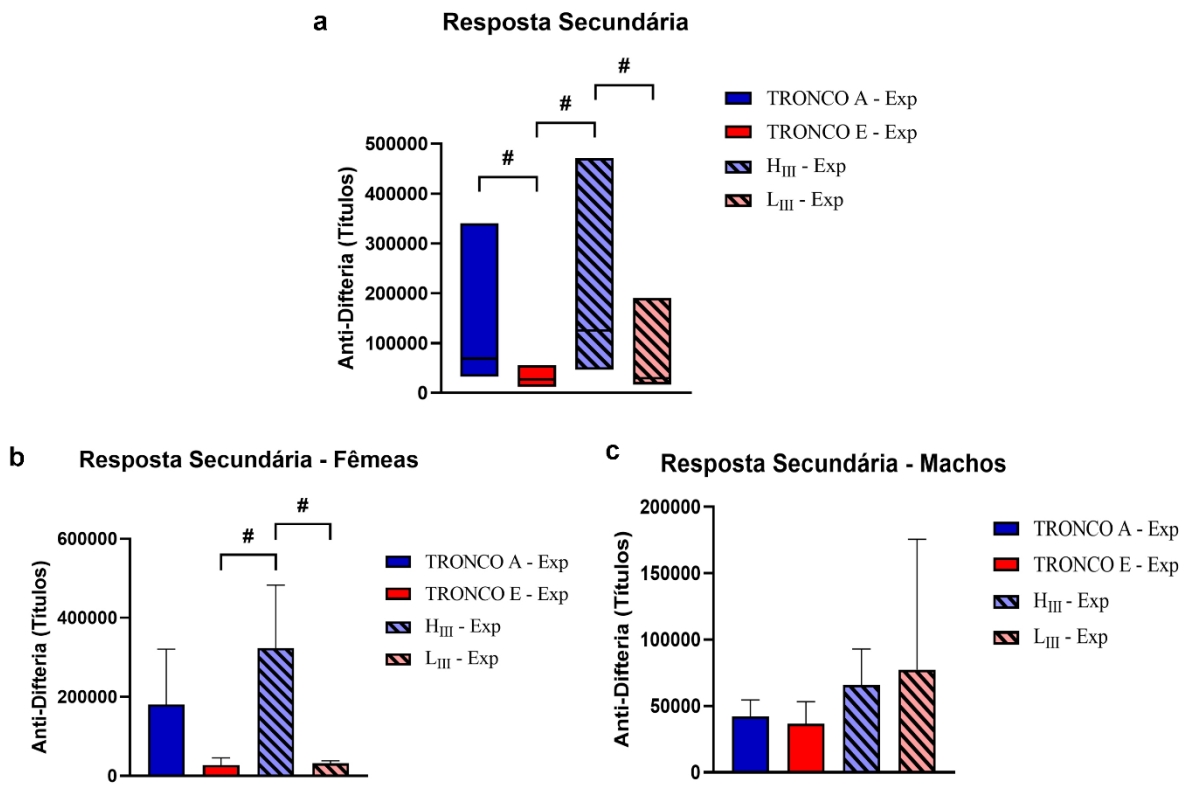


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: O gráfico representa a concentração de anticorpos séricos IgG totais detectados por ELISA no soro da resposta secundária dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}. Para comparação dos dados não paramétricos foi realizado o teste Mann-Whitney para comparar 2 grupos (resultado expresso em mediana min e max). * $p < 0,05$ (comparação entre os animais experimentais e adjuvantes).

A concentração de anticorpos na RS encontra-se significativamente aumentada no grupo experimental (machos e fêmeas) da linhagem Tronco A (com mediana 68938) em relação ao Tronco E experimental (27086), de mesma forma se encontra aumentada no grupo H_{III} experimental (25292) comparada às concentrações obtidas no Tronco E experimental (27086) e L_{III} experimental (29764) (Figura – 7a). Esses resultados mostram que os animais selecionados para alta resposta de produção de anticorpos H_{III} e Tronco A secretaram quantidades maiores de IgG anti-diftéricos em relação aos animais das linhagens L_{III} e Tronco E que produzem menos anticorpos. Podemos observar também uma diferença entre os sexos, nos animais fêmeas as diferenças no aumento da concentração de IgG dos animais H_{III} comparado aos Tronco E e a linhagem L_{III} foram significativas (Figura – 7b). No entanto, o mesmo não ocorreu nos camundongos machos onde as concentrações foram semelhantes (Figura – 7c).

Figura 7 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (resposta secundária) em camundongos experimentais isogênicos e heterogênicos

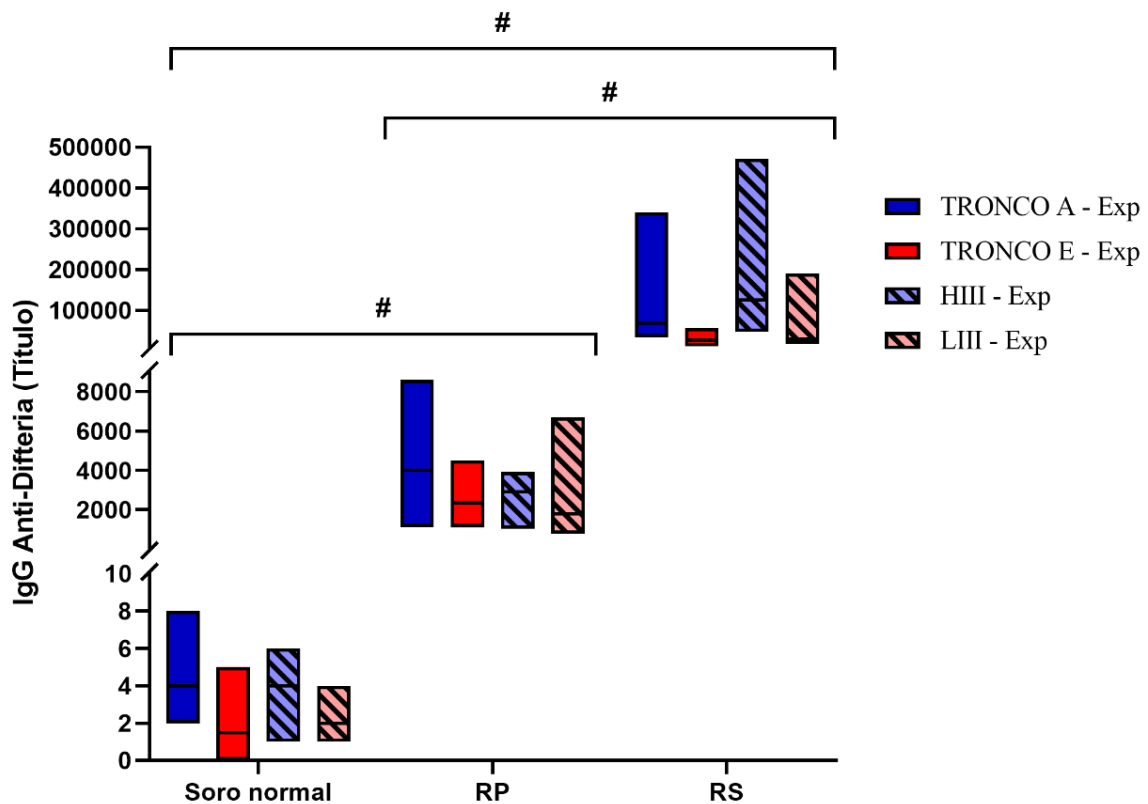


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: O gráfico representa a concentração de anticorpos séricos IgG totais detectados por ELISA no soro da resposta secundária dos grupos experimentais (Exp) geral (a), fêmeas (b) e machos (c) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}. Para comparação dos dados não paramétricos, foi realizado o teste Mann-Whitney entre 2 grupos (resultado expresso em mediana min e max). Para as amostras paramétricas, foi realizado o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais).

Quando comparadas as três respostas entre si (normal, RP e RS) a diferença na concentração de anticorpos é significativa, com aumento da concentração na RP em relação à resposta normal dos animais não imunizados e aumento na concentração da RS em relação às concentrações de anticorpos das respostas normal e RP, isso se dá entre as respostas de todos os grupos experimentais dentro de cada linhagem (RP vs Soro normal; RS vs Soro normal; RS vs RP), tanto dos animais isogênicos quanto dos animais heterogênicos, demonstrando eficácia da imunização em cada dose aplicada (Figura 8).

Figura 8 - Títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (soro normal, resposta primária e secundária) em camundongos experimentais isogênicos e heterogênicos

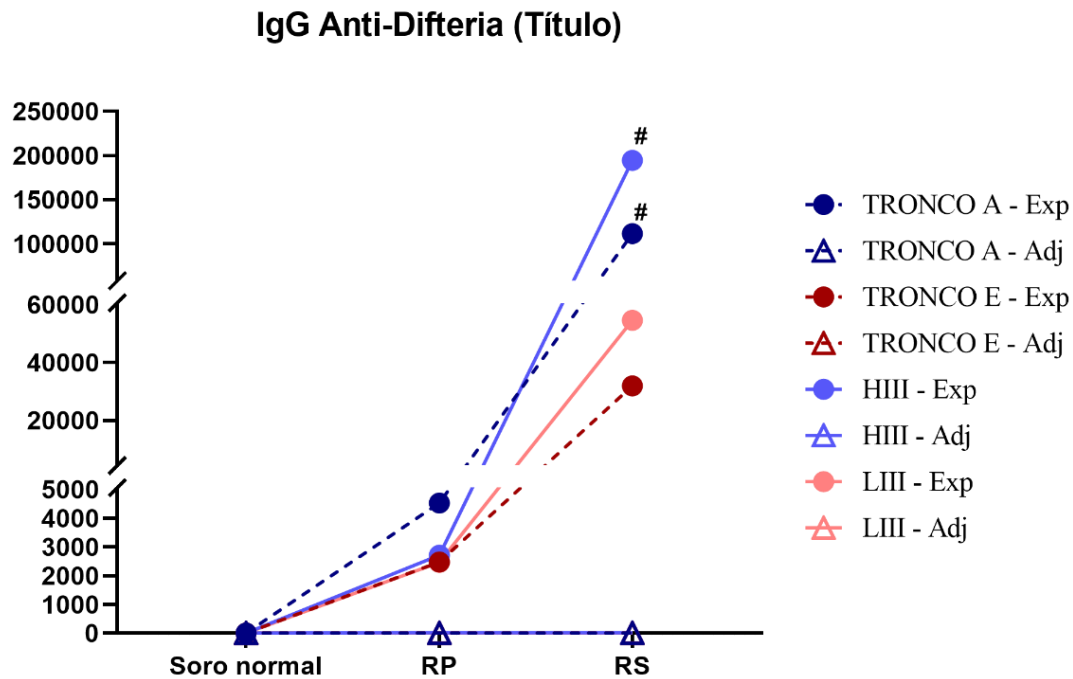


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: O gráfico representa a concentração de anticorpos séricos IgG totais detectados por ELISA no soro dos grupos experimentais (Exp) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}. Para comparação dos dados não paramétricos, foi realizado o teste Kruskal-Wallis e pós teste de Dunn para mais de 3 grupos e o teste Mann-Whitney para 2 grupos (resultado expresso em mediana min e max). #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais da mesma linhagem).

É possível ver essa diferença entre as três respostas como citado anteriormente também no gráfico de cinética (Figura 9) em que é evidente o aumento gradativo da concentração de IgG total anti-difteria entre soro normal, RP e RS quando comparadas nos grupos experimentais e adjuvantes também de cada linhagem, evidenciando que estes animais das linhagens H_{III} e Tronco A, possuem um aumento na concentração de anticorpos em relação as linhagens L_{III} e Tronco E na RS.

Figura 9 - Gráfico de cinética representando os títulos séricos de anticorpos anti-diftéricos (normal, RP e RS) em camundongos isogênicos e heterogênicos



Fonte: próprio autor, 2023.

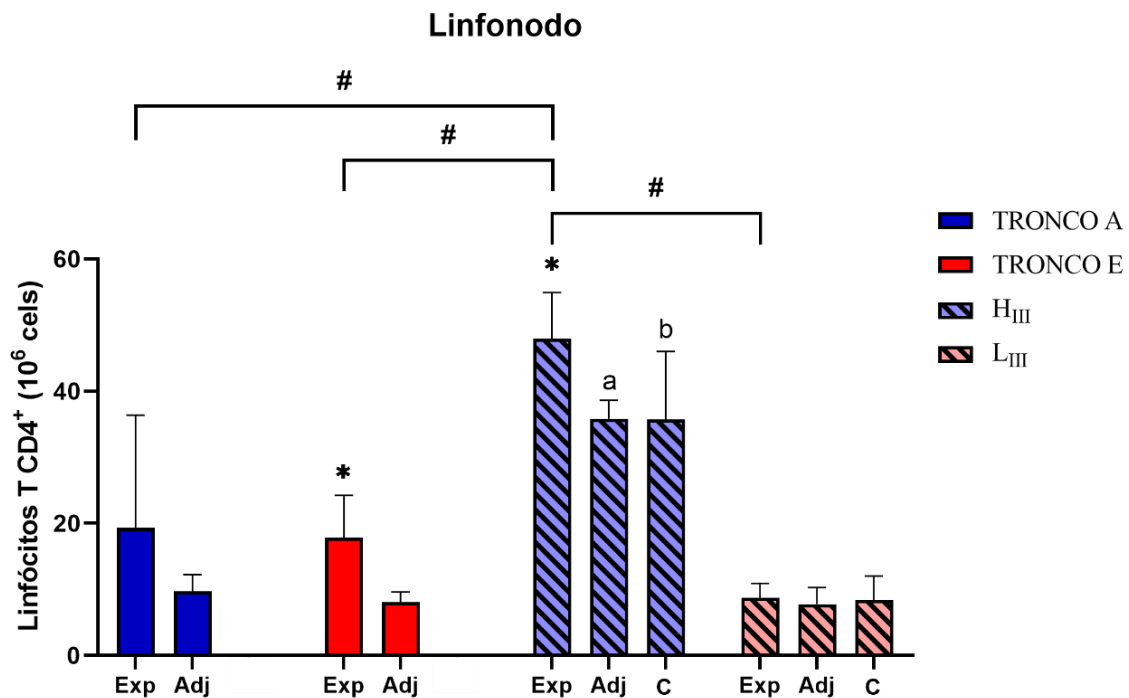
Legenda: O gráfico representa a concentração de anticorpos séricos IgG totais detectados por ELISA no soro dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, HIII e LIII. (Resultado expresso em média).

4.2 Linfócitos T presentes no linfonodo e baço

Linfócitos T auxiliares. Para avaliar a resposta imune celular dos animais previamente imunizados, foram analisadas as células T CD4⁺ no linfonodo e no baço de camundongos (machos e fêmeas) heterogênicos e isogênicos, após 35 dias da última imunização.

Os linfonodos dos animais do grupo experimental HIII apresentaram um número maior de linfócitos CD4⁺ com média ($47,95 \pm 6,99$) aumentada em relação aos animais experimentais do Tronco A ($19,28 \pm 17,11$), Tronco E ($17,82 \pm 6,43$) e LIII ($8,7 \pm 2,22$). Em relação ao grupo dos animais que receberam apenas o adjuvante podemos observar menor frequência de células T CD4⁺ comparado aos grupos experimentais da mesma linhagem (HIII e Tronco E). Na comparação entre grupos adjuvantes é possível ver um aumento significativo de células CD4⁺ nos animais HIII. E entre os grupos controle, o aumento é significativo em HIII em relação ao grupo LIII (Figura 10).

Figura 10 – Frequência de linfócitos T CD4⁺ no linfonodo de camundongos isogênicos e heterogênicos

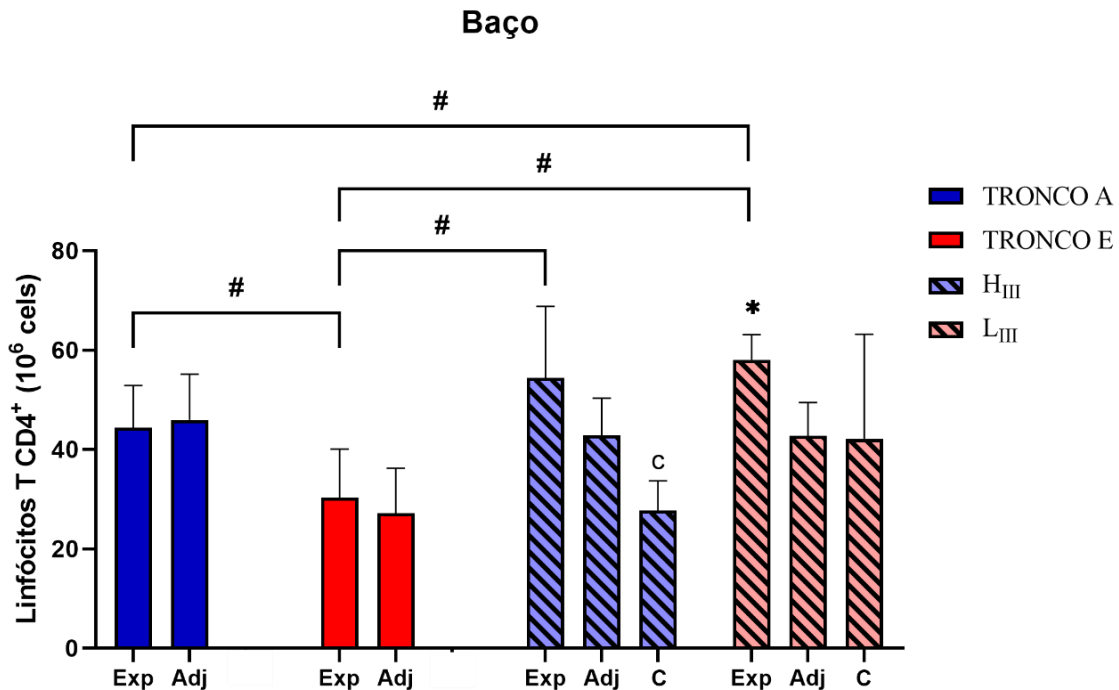


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a frequência de células T CD4⁺ obtida por citometria de fluxo no linfonodo dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, assim como grupos controles (C) H_{III} e L_{III}. Para as amostras paramétricas, foi realizado o teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey para mais de 3 grupos e o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). *p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais e adjuvantes); #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais); ^ap<0,05 (comparação entre os grupos adjuvantes); ^bp<0,05 (comparação entre os grupos controle).

Já nas células esplênicas, a frequência de células T CD4⁺ também apresentou significância estatística, quando analisadas as médias \pm desvio padrão do grupo experimental H_{III} (54,38 \pm 14,41) e experimental do Tronco A (44,40 \pm 8,47) é visto aumento em relação à média dos animais experimentais do Tronco E (30,37 \pm 9,73), entretanto a frequência celular do grupo experimental L_{III} (58,02 \pm 5,10) encontra-se significativamente aumentada em relação aos grupos experimentais do Tronco A e do Tronco E. Observando o grupo L_{III} experimental nota-se um aumento de células quando comparado ao grupo adjuvante L_{III} (42,78 \pm 6,65). O grupo controle H_{III} possui número menor de células comparado aos grupos experimental e adjuvante da mesma linhagem (Figura 11).

Figura 11 - Frequência de células T CD4⁺ no baço de camundongos isogênicos e heterogênicos



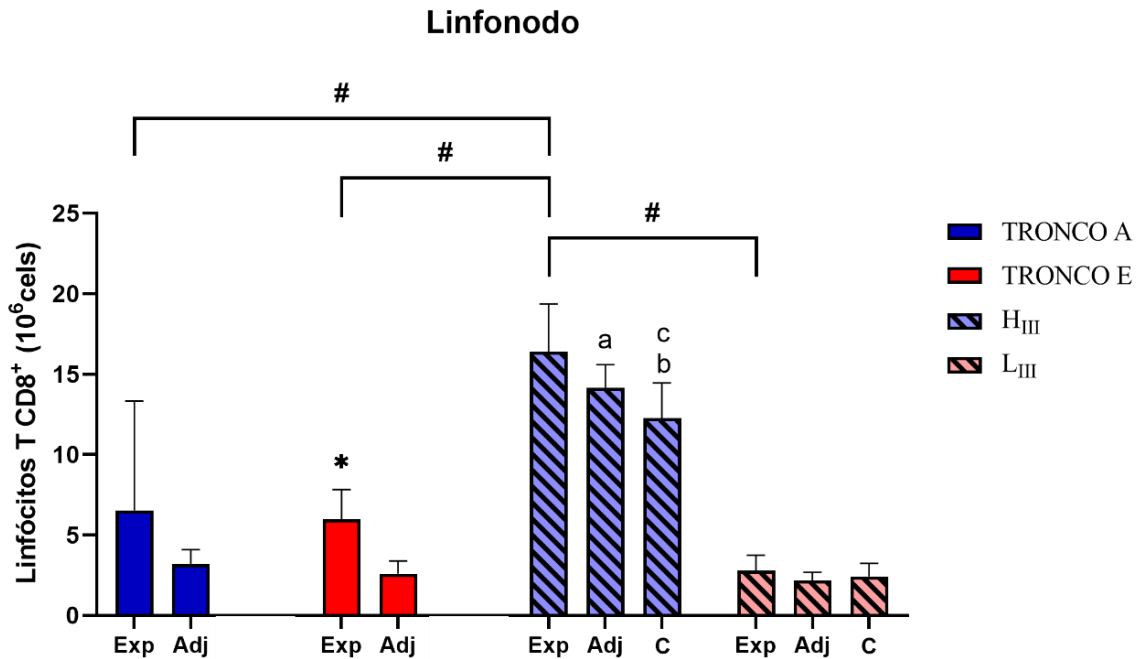
Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a frequência de células T CD4⁺ obtida por citometria de fluxo no baço dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, assim como grupos controles (C) H_{III} e L_{III}. Para as amostras paramétricas, foi realizado o teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey para mais de 3 grupos e o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). *p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais e adjuvantes); #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais); ^cp<0,05 (comparação entre o grupo controle em relação aos outros grupos da mesma linhagem).

Linfócitos T citotóxicos. Foram quantificadas as células T CD8⁺ no linfonodo e baço de camundongos heterogênicos e isogênicos, após 35 dias da última imunização.

Pudemos observar um aumento significativo de células nos grupos experimentais H_{III} ($16,40 \pm 2,96$) em relação aos experimentais do Tronco A ($6,53 \pm 6,79$) ($p=0,0001$), Tronco E ($5,96 \pm 1,85$) e L_{III} ($2,78 \pm 0,95$). O mesmo padrão pode ser encontrado entre os grupos que receberam apenas adjuvantes com aumento da frequência de células CD8⁺ nos animais da linhagem H_{III} ($14,13 \pm 1,45$) comparado ao Tronco A ($3,2 \pm 0,88$), Tronco E ($2,6 \pm 0,79$) e L_{III} ($2,17 \pm 0,50$). Nos animais do Tronco E obtivemos um aumento no grupo experimental em relação ao seu grupo adjuvante. E no grupo controle H_{III} quando comparado com o grupo controle L_{III} tem aumento da frequência celular (Figura 12).

Figura 12 - Frequência de células T CD8⁺ no linfonodo de camundongos isogênicos e heterogênicos

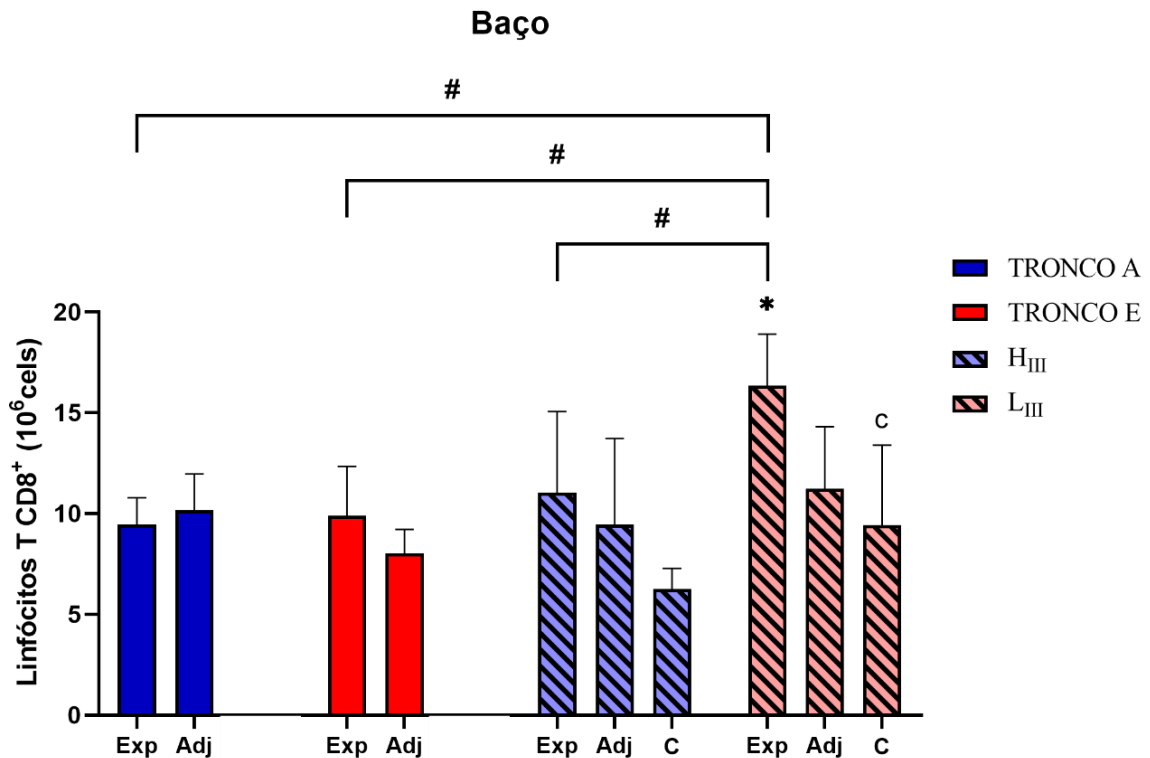


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a frequência de linfócitos T CD8⁺ obtida por citometria de fluxo no linfonodo dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, assim como grupos controles (C) H_{III} e L_{III}. Para as amostras paramétricas foi realizado o teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey para mais de 3 grupos e o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). *p<0,05 (comparação entre os animais experimentais e adjuvantes); #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais); ^ap<0,05 (comparação entre os grupos adjuvantes); ^bp<0,05 (comparação entre os grupos controle); ^cp<0,05 (comparação entre o grupo controle em relação aos outros grupos da mesma linhagem).

Quando analisamos os linfócitos T citotóxicos no baço, um aumento significativo ocorreu no grupo experimental L_{III} (16,33 ± 2,57) comparado aos grupos experimentais do Tronco A (9,45 ± 1,33), Tronco E (9,88 ± 2,46) e H_{III} (11,05 ± 4,0). Pode-se notar também que no grupo experimental L_{III} há um aumento significante na frequência de células CD8⁺ vs grupo adjuvante L_{III} (11,23 ± 3,09). Não foram detectadas diferenças significantes entre os grupos adjuvantes, mas entre os grupos controle sim, com aumento de células no grupo L_{III} comparado ao H_{III} (Figura 13).

Figura 13 - Frequência de linfócitos T CD8⁺ no baço de camundongos isogênicos e heterogênicos



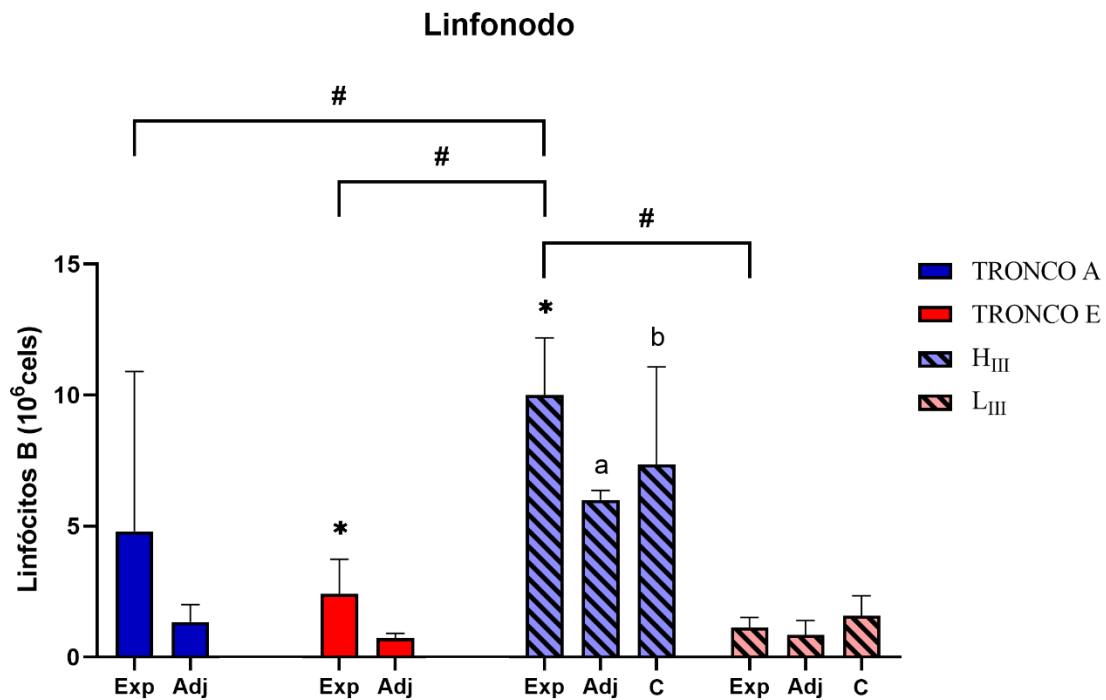
Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a frequência de linfócitos T CD8⁺ obtida por citometria de fluxo no baço dos grupos experimentais (Exp) e adjuvante (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, assim como grupos controles (C) H_{III} e L_{III}. Para as amostras paramétricas foi realizado o teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey para mais de 3 grupos e o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). *p<0,05 (comparação entre os animais experimentais e adjuvantes); #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais); ^cp<0,05 (comparação do grupo controle em relação ao grupo experimental da mesma linhagem).

4.3 Linfócitos B presentes no linfonodo e baço

Linfócitos B. Na avaliação de células B analisada pela frequência das células B220⁺ observamos que ocorreu no linfonodo um aumento significativo no grupo experimental H_{III} (10 ± 2,18) comparado aos grupos experimentais do Tronco A (4,8 ± 6,1), Tronco E (2,41 ± 1,31) e L_{III} (1,13 ± 0,38). Observou-se também aumento de células B nos grupos experimentais vs adjuvantes das linhagens H_{III} e do Tronco E. Entre os grupos adjuvantes há aumento significativa de células B220⁺ na linhagem H_{III} (6,0 ± 0,36) em relação a todas as outras. E entre os grupos controles há aumento de células no grupo H_{III} em relação ao L_{III} (Figura 14).

Figura 14 - Frequência de células B220⁺ no linfonodo de camundongos isogênicos e heterogênicos

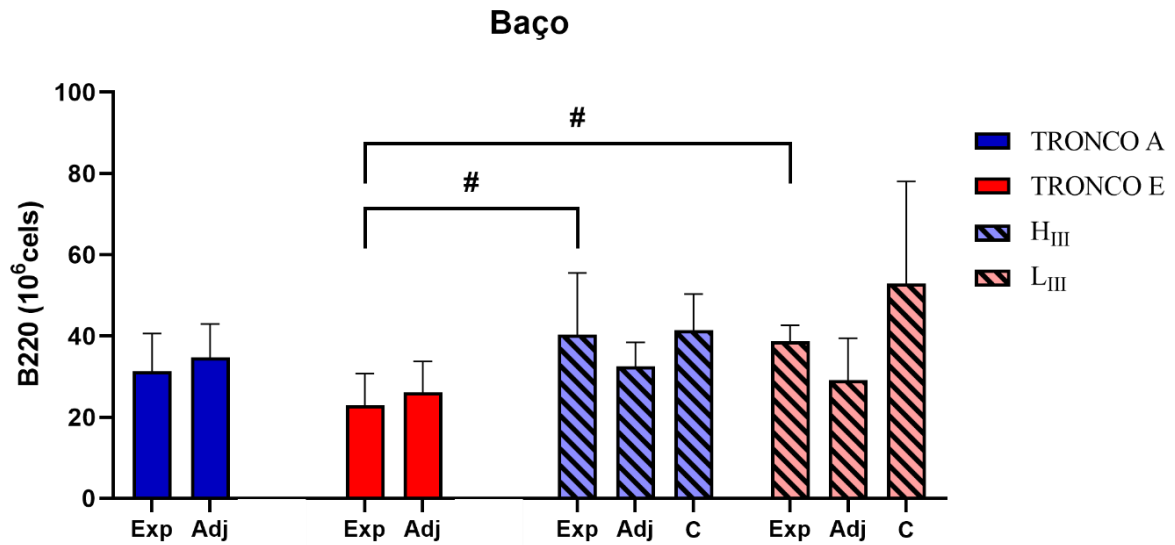


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a frequência linfócitos B (B220⁺) obtida por citometria de fluxo no linfonodo dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, assim como grupos controles (C) H_{III} e L_{III}. Para as amostras paramétricas foi realizado o teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey para mais de 3 grupos e o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). *p<0,05 (comparação entre os animais experimentais e adjuvantes); #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais); ^ap<0,05 (comparação entre os grupos adjuvantes); ^bp<0,05 (comparação entre os grupos controle).

Analisando as células esplênicas foi encontrada diminuição significativa de linfócitos B no grupo Tronco E ($22,95 \pm 7,79$) comparado com os grupos H_{III} experimental ($40,27 \pm 15,23$) e L_{III} experimental ($38,68 \pm 3,92$). Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos experimentais em relação aos grupos adjuvantes da mesma linhagem. (Figura 15).

Figura 15 - Frequência de células B220⁺ no baço de camundongos isogênicos e heterogênicos

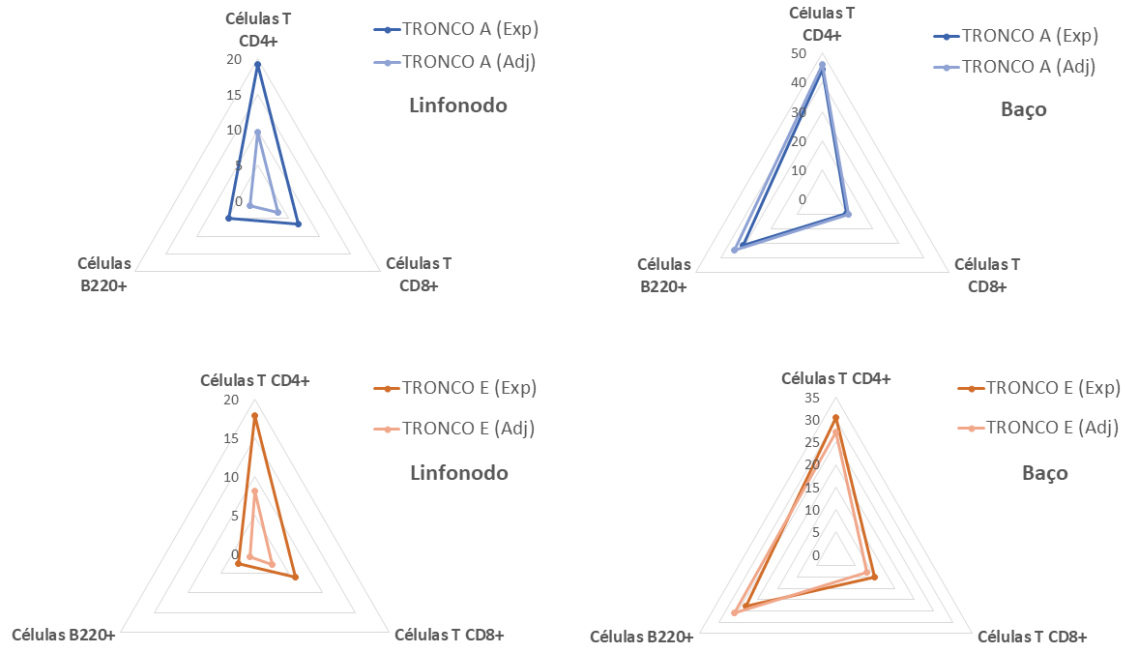


Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a frequência de linfócitos B (B220⁺) obtida por citometria de fluxo no baço dos grupos experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, assim como grupos controles (C) H_{III} e L_{III}. Para as amostras paramétricas foi realizado o teste one-way ANOVA e pós teste de Tukey para mais de 3 grupos e o teste t de Student para 2 grupos (resultado expresso em média e desvio padrão). #p<0,05 (comparação entre os grupos experimentais).

Para análise conjunta de todas as células presentes os gráficos de radares abaixo representam como age a média da frequência de linfócitos T e B em cada órgão de cada grupo de animais heterogênicos e isogênicos (experimentais e adjuvantes) por citometria de fluxo, indicando uma maior quantidade de células T e B totais no baço em relação ao linfonodo em todos os grupos e tendência a maior frequência linfócitos T CD4⁺ comparada a linfócitos T CD8⁺ e linfócitos B tanto no linfonodo quanto no baço, com mesmo padrão em todos os grupos (Figuras 16 e 17).

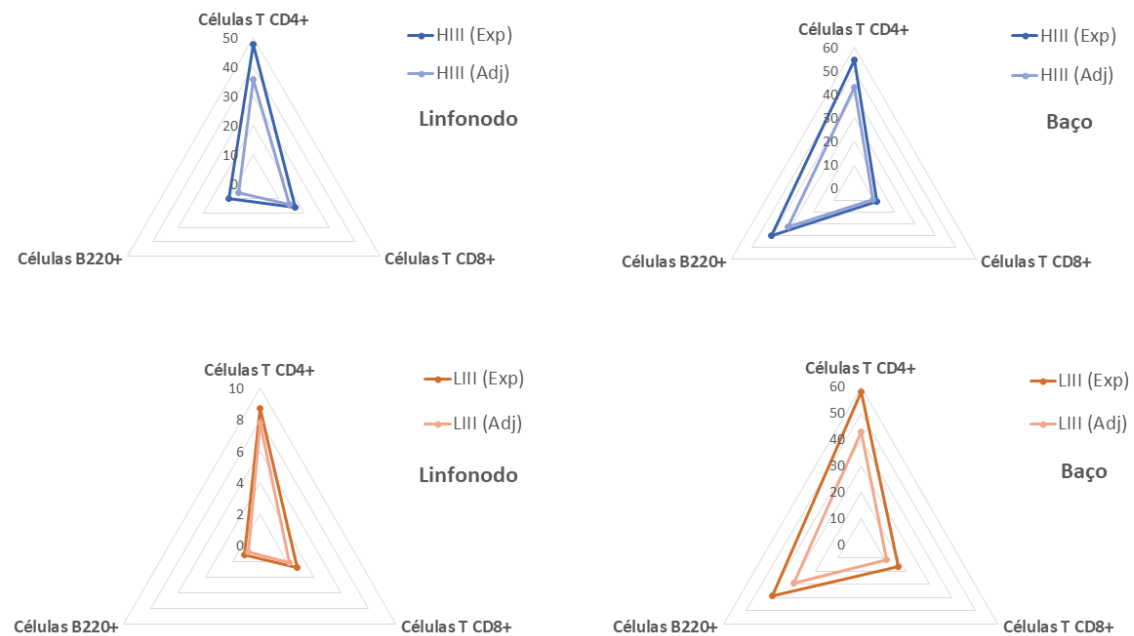
Figura 16 - Gráficos de radar dos linfócitos T e B em camundongos isogênicos



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a média da frequência das células T e B totais no linfonodo e baço dos animais experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) das linhagens Tronco A e Tronco E.

Figura 17 - Gráficos de radar dos Linfócitos T e B em camundongos heterogênicos



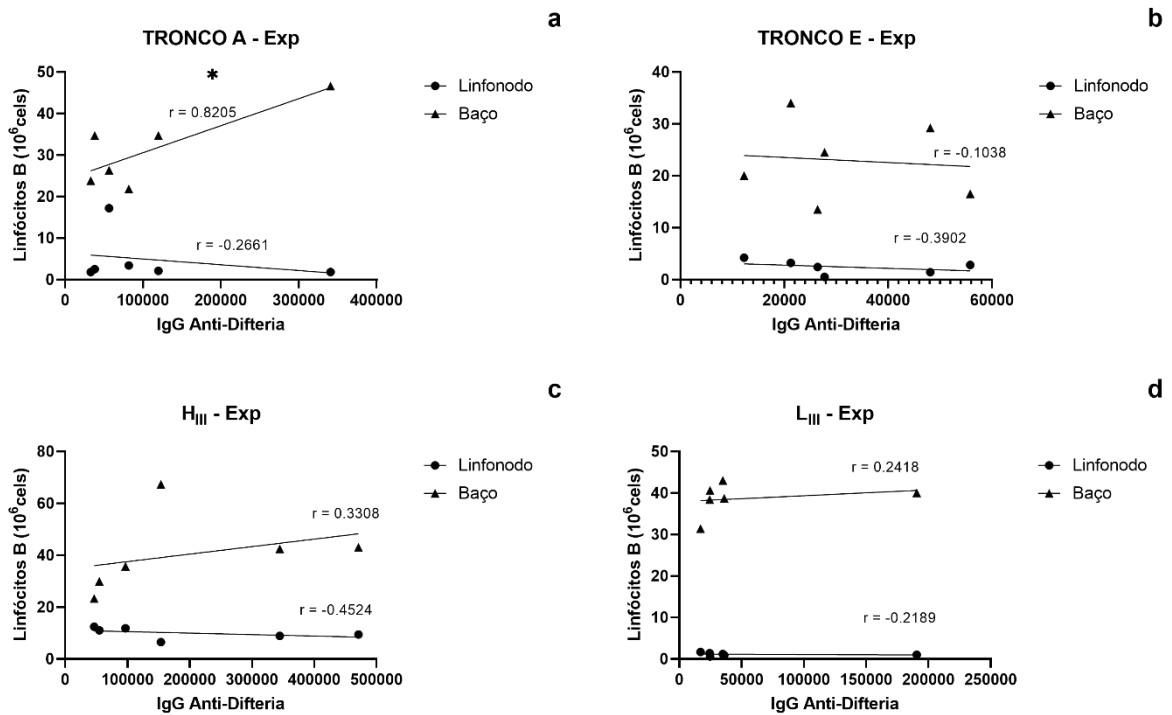
Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a média da frequência de células T e B totais no linfonodo e baço dos animais experimentais (Exp) e adjuvantes (Adj) dos grupos H_{III} e L_{III}.

Quando analisados os gráficos de correlação entre a produção de anticorpos IgG anti-difteria e a frequência de linfócitos B nos órgãos linfoides dos grupos experimentais das

linhagens Tronco A, Tronco E, H_{III} e L_{III}, apenas no Tronco A há correlação positiva significativa segundo o valor de r no baço (Figura 18).

Figura 18 - Correlação entre anticorpos IgG anti-difteria e a frequência de células B no linfonodo e baço de camundongos isogênicos e heterogênicos



Fonte: próprio autor, 2023.

Legenda: Os gráficos representam a correlação da produção de anticorpos IgG anti-difteria com a frequência de Linfócitos B nos órgãos linfóides dos animais experimentais (Exp) das linhagens **a)** Tronco A; **b)** Tronco E; **c)** H_{III} e **d)** L_{III}. *p=0,00332.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, as respostas humoral e celular à AD foram avaliadas a fim de comparação, de acordo com cada linhagem de camundongos machos e fêmeas selecionados por sua alta (H_{III}) ou baixa (L_{III}) resposta de anticorpos (heterogênica e isogênica).

Para vacinas bem-sucedidas, a vacinação primária provoca imunidade protetora e memória, esta fornece uma resposta imune rápida e forte na reexposição e proteção de longo prazo, mesmo em indivíduos com níveis indetectáveis ou baixos de anticorpos (AMANNA; SLIFKA, 2011).

Trezena e colaboradores (2002) observaram uma diferença na RS entre camundongos H_{III} e L_{III} heterogênicos determinada pela maior produção de anticorpos contra os antígenos somáticos e flagelar de *S. typhimurium* inativada pela linhagem H_{III} em relação aos animais L_{III}.

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa foi analisado o efeito adjuvante da sílica mesoporosa (SBA-15) na resposta imune humoral antidiftérica, avaliando-se a produção de anticorpos IgG por camundongos H_{III} e L_{III} após imunização combinada das anatoxinas de difteria e tétano. Foi observado que a concentração de anticorpos foi mais estimulada em H_{III} do que nos animais da linhagem L_{III} (TREZENA et al., 2022).

Níveis de anticorpos totais foram também determinados por ensaio de microaglutinação, em camundongos que receberam duas injeções intraperitoneais de *S. typhimurium* inativadas, a RS contra antígenos flagelares evidenciaram maior concentração de anticorpos pela linhagem H_{III}, tanto em animais machos como em fêmeas, não sendo detectada nenhuma diferença significativa entre os sexos nos títulos de anticorpos (DE SOUZA et al., 2004).

Camundongos heterogêneos das linhagens H_{III} e L_{III} foram utilizados para estudo de coagulação com uma imunização primária com o extrato de cerdas de *Lonomia* e posterior imunização secundária, nos soros testados por ELISA, foi encontrada maior concentração de IgG produzida por H_{III} em relação a L_{III}, sem correlação com inflamação aguda também avaliada nesses animais (RAMOS et al., 2004).

Esses resultados corroboram com o encontrado em nossos estudos, onde observou-se que a concentração de anticorpos na RS dos grupos dos animais imunizados estava significativamente aumentada tanto nos animais isogênicos do Tronco A comparado ao Tronco E quanto nos heterogênicos H_{III} comparado ao Tronco E e L_{III}. No entanto, essas diferenças significativas foram vistas apenas em camundongos fêmeas, quando comparados apenas os machos as concentrações de anticorpos entre as linhagens foram semelhantes.

Em estudo de mapeamento de associação genômica, camundongos fêmeas de 28 linhagens endogâmicas diferentes foram imunizados intramuscular com 3 doses da vacina tríplice bacteriana acelular DTP (tríplice bacteriana acelular difteria-tétano-coqueluche) com adjuvante $Al(OH)_3$ (Infanrix) e os títulos de anticorpos IgG contra a AD medidos com 2 e 12 semanas após a última dose, observa-se que todas as cepas desenvolveram títulos robustos de anticorpos para os antígenos da vacina (MOSLEY et al., 2017).

A diferença significativa no aumento da concentração de anticorpos IgG (IgG1 e IgG2a) em camundongos heterogêneos H_{III} em relação L_{III} também foi observada em estudo de Vieira de Moraes e colaboradores (2006), utilizando um modelo de uveíte autoimune onde avaliaram a resposta contra inter-fotorreceptores de ligação ao retinóide, uma glicoproteína que induz falha dos mecanismos que mantêm o estado de tolerância imunológica no olho.

Corroborando com nossos estudos onde foram vistos que na resposta imune humoral encontrada nos animais isogênicos e heterogênicos da RP e RS o mesmo perfil de títulos aumentados de IgG total anti-diftéricos foram obtidos nos animais experimentais em relação aos grupos adjuvantes e controle na mesma linhagem, demonstrando então eficácia da imunização. Foram observadas diferenças significantes na concentração de anticorpos quando comparadas as três respostas entre si (RP vs soro normal; RS vs soro normal; RS vs RP) dos animais experimentais dentro de cada linhagem, com aumento gradativo na cinética da concentração de IgG total anti-difteria entre resposta prévia, RP e RS.

Em outro trabalho, que avaliou camundongos que receberam o toxoíde diftérico, foi mostrado níveis aumentados de anticorpo antitoxina e o aumento de ativação de células plasmáticas nos linfonodos dos animais imunizados quando comparados com os controles (HAKGÜDENER, 1976).

Mostramos aqui resultados semelhante ao trabalho citado pois, quando avaliamos a resposta celular de células B ($B220^+$) o mesmo perfil foi encontrado nos linfonodos dos animais isogênicos e heterogênicos onde observamos que houve aumento da frequência celular nos animais experimentais em relação aos que receberam apenas o adjuvante da mesma linhagem.

O adjuvante mais prevalente em vacinas humanas licenciadas é também um dos mais antigos adjuvantes conhecidos, o $Al(OH)_3$, a sua função na imunização depende de muitas vias, como inflamação no local da injeção ou nos linfonodos, ativando vias de detecção imune inata (sinalização de receptor de células B, complemento, células apresentadoras de antígenos e produção de quimiocinas e citocina), quando ligado ao antígeno, implicam em resposta de célula B, os nanocristais de alumínio são importantes na apresentação dos antígenos (MOYER et al., 2020).

Assim, desde muito tempo a vantagem de se utilizar alumínio como adjuvante com diferentes tipos de antígeno vem sendo mostrada, em camundongos são observadas relações lineares positivas entre a dose de alumínio usado como adjuvante imunológico e o título de anticorpos anti-ovoalbumina (VAZ; KANE; LYNCH, 1981).

Em estudo feito em 1990, por Yamaya e colaboradores, foi observado um título significativo de anticorpos IgG e IgE por método de hemaglutinação passiva, após a imunização subcutânea secundária com AD adsorvida em alúmen comparado com a imunização com o toxóide sem adjuvante que resultou num título baixo de anticorpos com nível moderado de produção de IgE e níveis indetectáveis de síntese de IgG.

No estudo de Grasse e colaboradores (2018), camundongos jovens foram vacinados *via intramuscular* com vacinas multivalentes disponíveis comercialmente contendo AD adsorvida em sais de alumínio de acordo com o esquema de vacinação que simulou vacinação primária em crianças com três doses em 9 semanas e uma dose reforço 9 meses depois, observou-se que o grupo que recebeu apenas as vacinas com o antígeno e alúmen apresentou um aumento no título de anticorpos séricos (IgG) gradativo após as 3 doses e também após o *booster*. Na avaliação das células do baço e linfonodo 7 dias após a segunda e terceira dose com reestímulo *in vitro* com AD, foi vista a presença de células T CD4⁺.

Corroborando com nossos estudos, onde foi observado que nos grupos experimentais (onde o alúmen foi usado como adjuvante juntamente com a AD) das linhagens isogênicas e heterogênicas as concentrações obtidas de anticorpos estavam significativamente aumentadas em relação a concentração dos grupos que receberam apenas o adjuvante, assim como a frequência de células T CD4⁺ de animais experimentais que estavam significativamente aumentadas na linhagem H_{III} e Tronco E no linfonodo e L_{III} no baço.

Na indução de uma imunidade humoral protetora por vacinação, as células B devem ser ativadas, entrar nos centros germinativos para sofrer a maturação de afinidade de seus receptores de antígeno e então se diferenciar em células plasmáticas de vida longa que secretam anticorpos constitutivamente ou células B de memória que participam de uma resposta de recordação na reexposição ao patógeno. Os adjuvantes ajudam a impulsionar esses mecanismos imunológicos, moldando a proteção da vacina (MOYER; ZMOLEK; IRVINE, 2016).

Uma das funções das células B maduras é a secreção de anticorpos, no entanto os mecanismos de regulação dos níveis séricos de anticorpos ainda estão sendo estudados. Demircik; Buch e Waisman (2013), utilizando camundongos C57BL/6 iDTR (expressão mediada por Cre do receptor da toxina diftérica em células B - CD19-Cre) sensíveis à depleção de células B maduras e células plasmáticas após injeção com toxina diftérica, mostraram que

houve uma correlação da depleção de células B e plasmáticas com uma redução transitória no total de anticorpos específicos de antígenos no soro.

Por outro lado, na pesquisa de DiLillo e colaboradores (2008), o título de imunoglobulinas séricas e os números de células plasmáticas secretoras de anticorpos na medula óssea não foram afetados pela depleção mediada por anticorpos anti-CD20 de células B.

Resultados esses que corroboram com os obtidos nesse estudo onde não foi encontrada uma correlação significativa entre a produção de anticorpos IgG anti-difteria e a frequência de linfócitos B nos órgãos linfoides dos grupos experimentais das linhagens, H_{III}, L_{III} e Tronco E. Com exceção do baço dos animais do Tronco A onde pudemos observar uma correlação positiva significativa.

A produção das linhagens dotadas de resposta máxima ou mínima de anticorpos por reprodução seletiva provou ser útil em estudos de interações hospedeiro-infecção. Já foi citado anteriormente que as diferenças nas respostas de anticorpos entre as linhagens heterogênicas H_{III} e L_{III} não se restringem apenas ao imunógeno específico utilizado na seleção, mas respondem a vários outros antígenos complexos, com divergência no fenótipo de carcinogênese cutânea e artrite induzida por pristane (VORRARO et al., 2014). Análises genéticas dessas linhagens indicaram que de 5 a 10 loci de traços quantitativos (QTLs) de acúmulo de alelos regulam o fenótipo de produção de anticorpos, três importantes estão presentes nos cromossomos 3, 8 e 9 (DE SOUZA et al., 2004).

No estudo feito por Vassão e colaboradores (2003) onde analisaram o soro de camundongos H_{III} e L_{III} heterogêneos imunizados com o vírus vivo da hepatite murina 3 (MHV3) ou MHVA59 foi detectado uma secreção preferencial de IgG2a (resposta tipo Th1) e após imunização com o vírus inativado uvMHV3 uma produção de IgG1 (resposta tipo Th2). Quando comparados aos camundongos L_{III}, os camundongos H_{III} foram capazes de produzir níveis séricos totais de anticorpos IgG mais altos nos animais imunizados com as diferentes cepas, confirmando maior capacidade da linhagem H_{III} de responder a um estímulo antigênico, entretanto sem imunização, nas mesmas condições ambientais pré-existentes foi visto que os camundongos H_{III} expressaram um nível sérico de anticorpos menor do que os camundongos L_{III}.

Em nosso estudo, no soro normal sem estímulo imunizante a concentração de anticorpos observada foi semelhante entre os grupos e linhagens sem diferença estatística significativa, não corroborando com o estudo anterior.

Avaliando a imunidade celular dos animais que receberam MHV3 onde camundongos heterogêneos H_{III} e L_{III} imunizados tiveram as suas células de linfonodos estimuladas *in vitro* com uvMHV3 inativado, apenas as células dos animais L_{III} foram capazes de proliferar e sintetizar quantidades significativas de IL-2, entretanto a proliferação e síntese de IL-2 foram inibidas em animais H_{III} e L_{III} por tratamento com anticorpo monoclonal (mAb) contra linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, o que demonstra a presença de resposta celular nesse órgão contra o vírus em ambas as linhagens. Esse estudo demonstra também diferença significativa na proliferação das células T não estimuladas, que foi maior nos camundongos L_{III} em relação aos H_{III}, o que pode refletir o estado de ativação "*in vivo*" no órgão de animais em estado normal (VASSÃO et al., 1995).

Os resultados encontrados na literatura da resposta celular ao antígeno MHV3 são diferentes dos nossos resultados de resposta celular específica contra o antígeno da difteria no linfonodo, onde observou-se que a linhagem heterogênica H_{III} apresentou aumento significativo no número de células T CD4⁺ e CD8⁺ em relação aos animais do Tronco A, Tronco E e L_{III}. Esse mesmo aumento pode ser observado na frequência celular de células T CD4⁺ e CD8⁺ nos linfonodos dos animais H_{III} controle em relação aos animais L_{III}, indicando que essa possa ser uma diferença basal entre as linhagens.

Alguns estudos sugerem que uma regulação diferente de subconjunto de células T pelas diferentes estimulações de antígenos poderia ser a causa da diferença na produção de anticorpo pelas linhagens da seleção III, como pode ser visto nos estudos a seguir.

Reis e colaboradores (1992) avaliaram a presença de linfócitos T CD4⁺, T CD8⁺ e B no linfonodo de camundongos heterogêneos H_{III} e L_{III}, analisadas por citometria de fluxo e mostraram que essas células estão presentes em frequências semelhantes nas duas linhagens, sendo igualmente suscetíveis à depleção *in vivo* de células T CD4⁺ por tratamento com mAb GK 1-5. Na análise de proliferação de células T e produção de IL-2 as células estimuladas com vários antígenos *in vitro* demonstram que a proliferação T específica foi menor em linfonodos dos animais L_{III} embora sua produção de IL-2 tenha sido semelhante à das células T da linhagem H_{III}. A depleção de células T CD4⁺ interferiu na resposta imune humoral (IgG) avaliada 6, 9 e 13 dias pós imunização com antígenos T dependentes onde ocorreu a inibição na produção de anticorpos em ambas as linhagens.

Comparando com os resultados apresentados nesse trabalho pode-se observar que na resposta imune humoral os animais imunizados com diversos antígenos T dependentes obtiveram títulos aumentados de anticorpos IgG na linhagem H_{III}, corroborando com nossos resultados onde foi observado o mesmo padrão de animais experimentais H_{III} e Tronco A com

maior concentração de anticorpos em relação aos grupos L_{III} e Tronco E experimentais. No entanto, em relação as respostas celulares obtidas não corroboram com esse estudo, onde a frequência celular T e B no linfonodo diferiu significativamente nos grupos experimentais com aumento da frequência na linhagem H_{III} em relação a L_{III}, Tronco A e Tronco E, o mesmo perfil ocorre quando comparados os grupos adjuvantes entre si. Nos animais controles sem imunização foi encontrado aumento significativo da frequência dessas células em H_{III} comparada a linhagem L_{III}.

Os resultados acima sugerem uma amplificação de células T CD4⁺ nos animais H_{III} sob estimulação antigênica, entretanto já em animais controles sem imunização foi observada a presença maior de células T auxiliares em H_{III} comparado a animais L_{III}. Foi descrito por Biozzi e colaboradores (1980) que uma taxa de multiplicação mais alta de células B em camundongos *High* em comparação com camundongos *Low* está correlacionada com uma meia-vida de antígenos mais longa, podendo ocorrer amplificação dessas células com aumento do reconhecimento e absorção, explicando uma possível interação de apresentação de antígenos com respostas de células T *in vivo*.

Nesse estudo a resposta celular analisada no baço dos animais imunizados com antígenos de difteria foram observadas frequências semelhantes de células B entre grupos experimentais e controles H_{III} e L_{III}. Por outro lado, as células T (CD4⁺ e CD8⁺) encontraram-se aumentadas nos animais da linhagem L_{III} em comparação com as demais.

Desse modo, conseguimos observar diferentes perfis de resposta humoral e celular no linfonodo e no baço nas diferentes linhagens de camundongos em resposta as imunizações realizadas com a AD. Essas respostas podem ser moduladas por diversos efeitos genéticos multifatoriais e ambientais e o seu mecanismo assim como os perfis de repostas podem interagir entre si, sendo necessários mais estudos com esse modelo experimental onde seja possível visualizar marcadores imunológicos de ativação e citocinas específicas que determinem os perfis de resposta adaptativa nas linhagens em questão.

6 CONCLUSÕES

A imunização do modelo experimental utilizado neste estudo com duas doses de AD e/ou $Al(OH)_3$ de acordo com cada grupo (experimental e adjuvante) estimulou diferentes perfis de resposta nas linhagens heterogênicas parentais e isogênicas a fim de comparação da resposta humoral e celular dos camundongos geneticamente selecionados para diferente capacidade de produção de anticorpo.

Na resposta humoral todas as linhagens mantiveram o seu perfil com maior concentração na produção de anticorpos pelos animais experimentais em relação ao grupo apenas com adjuvante com destaque para concentração aumentada de anticorpos IgG nos animais imunizados com AD da linhagem heterogênica H_{III} em relação às demais vista na RS. A resposta secundária dos animais dessa linhagem também apresentou aumento da concentração de IgG quando comparada com à RP e soro normal.

Em relação ao perfil de resposta celular a frequência de linfócitos T e B ocorreu de forma diferente quando analisamos os linfonodos e o baço. Os animais H_{III} imunizados com AD mostraram no linfonodo um aumento da frequência de células B, TCD4⁺ e TCD8⁺ em relação às outras linhagens avaliadas. No baço o perfil de células B foi semelhante entre todas as linhagens, no entanto, a linhagem L_{III} imunizada apresentou maior frequência de células TCD4⁺ e TCD8⁺.

Assim, é muito relevante o estudo do mecanismo de modulação da resposta imune nessas linhagens que possuem significado biológico, importante para o entendimento de efeitos genéticos multiespecíficos frente a determinados antígenos, referentes a várias doenças complexas, sendo necessário estudos aprofundados de como atuam as respostas imunológicas integradas sob o controle gênico. Os perfis encontrados podem ser extrapolados às diferentes populações existentes.

REFERÊNCIAS¹

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (org.). **Imunologia Celular e Molecular**. Tradução: Anderson de Sá Nunes e Soraya Imon de Oliveira. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2019. 1568 p.
- AMANNA, I. J.; SLIFKA, M. K. Contributions of humoral and cellular immunity to vaccine-induced protection in humans. **Virology**, Special Reviews Issue, New York, v. 411, n. 2, p. 206–215, 15 mar. 2011.
- BIOZZI, G. *et al.* Genetics of immunoresponsiveness to natural antigens in the mouse. **Curr Top Microbiol Immunol**, Heidelberg, v. 85, p. 31-98, 1979.
- BIOZZI, G. *et al.* Effect of genetic modification of immune responsiveness on anti-infection and anti-tumor resistance In: **Genetic Control of host resistance to infection and malignancy**. Allan R. Liss. Ins. p. 3-18, 1985.
- BIOZZI, G. *et al.* Genetic selections for relevant immunological functions. **Immunology**, Oxford, v. 80, p. 432-457, 1980.
- CAVAILLON, J. M. Historical links between toxinology and immunology. **Pathog Dis**, Malden, v. 76, n. 3, p. fty019, 1 abr. 2018.
- DE SOUZA, C. M. *et al.* Quantitative trait loci in chromosomes 3, 8, and 9 regulate antibody production against *Salmonella* flagellar antigens in the mouse. **Mamm Genome**, New York, v. 15, n. 8, p. 630-636, aug. 2004.
- DEMIRCIK, F.; BUCH, T.; WAISMAN, A. Efficient B cell depletion via diphtheria toxin in CD19-Cre/iDTR mice. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 3, p. e60643, 27 mar. 2013. DOI 10.1371/journal.pone.0060643. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0060643>. Acesso em: 01 nov. 2022.
- DILILLO, D. J. *et al.* Maintenance of long-lived plasma cells and serological memory despite mature and memory B cell depletion during CD20 immunotherapy in mice. **J Immunol**, Baltimore Philadelphia, v. 180, n. 1, p. 361-371, 1 jan. 2008.
- DORIA, G. *et al.* Genetic control of immune responsiveness, aging and tumor incidence. **Mech Ageing Dev**, Lausanne, v. 96, n. 1-3, p. 1-13, jun. 1997.
- FALCONER, D.S. (org.). **Introducción a la genética cuantitativa**. 1 ed. México: CECSA, 1970. 430 p.
- GENNARI, M. *et al.* Effect of silica on the genetic regulation of antibody responsiveness. **Ann Inst Pasteur Immunol**, Amsterdam, v. 138, n. 3, p. may. /jun. 359-70, 1987.

¹ ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: Informação e documentação - referências - elaboração. Rio de Janeiro: ABNT, 2018.

GLENNY, A. T.; HOPKINS, B. E. Diphtheria toxoid as an immunising agent. **Br J Exp Pathol**, London, v. 4, n. 5, p. 283, oct. 1923.

GRASSE, M. *et al.* GM-CSF improves the immune response to the diphtheria-component in a multivalent vaccine. **Vaccine**, Guildford, v. 36, n. 31, p. 4672-4680, 25 jul. 2018.

GUILHEN, F. B. *et al.* Characterization of production processes for tetanus and diphtheria anatoxins. **Biologicals**, London; San Diego, v. 42, n. 2, p. 91-100, mar. 2014.

HAKGÜDENER, Y. Immunological response of mice to diphtheria toxoid. **Mikrobiyol Bul** Ankarav, v. 10, n. 2, p. 149-160, feb. 1976.

IBAÑEZ, O. M. *et al.* Low antibody responsiveness is found to be associated with resistance to chemical skin tumorigenesis in several lines of Biozzi mice. **Cancer Lett**, Amsterdam, v. 136, n. 2, p. 153-158, 1 mar. 1999.

Instituto Butantan. **Bula do medicamento vacina adsorvida difteria e tétano adulto (dT)**; 2021. Disponível em: https://butantan.gov.br/assets/arquivos/soros-e-vacinas/DT%20adulto_bula_1660766822498.pdf. Acesso em: 08 dez. 2022.

JENSEN, J. R. *et al.* Involvement of antibody production quantitative trait *loci* in the susceptibility to pristane-induced arthritis in the mouse. **Genes Immun**, Houndmills, v. 7, n. 1, p. 44-50, jan. 2006.

JENSEN, J. R. *et al.* Low antibody producer mice are highly susceptible to pristane-induced arthritis: a model to approach antibody production *loci* in inflammatory autoimmune disease. **Rev Soc Bras Med Trop**, Rio De Janeiro Brasil, v. 34, n.III, p. 188-188, 2001.

MOSLEY, Y. Y. C. *et al.* Genome-wide association mapping of the antibody response to Diphtheria, Tetanus and acellular Pertussis vaccine in mice. **J Infect Dis**, Chicago, v. 215, n. 3, p. 466-474, 1 feb. 2017.

MOYER, T. J. *et al.* Engineered immunogen binding to alum adjuvant enhances humoral immunity. **Nat Med**, New York, v. 26, n. 3, p. 430-440, mar. 2020.

MOYER, T. J.; ZMOLEK, A.C.; IRVINE, D.J. Beyond antigens and adjuvants: formulating future vaccines. **J Clin Invest**, New Haven, v. 126, n. 3, p. 799-808, 1 mar. 2016.

MURPHY, J. R. *Corynebacterium diphtheriae*. In: BARON, S (org.). **Medical Microbiology 4th edition**. Galveston: University of Texas Medical Branch at Galveston, 1996. Cap. 32.

PARK, W. H.; SCHRODER, M. C. Diphtheria toxin-antitoxin and toxoid: a comparison. **Am J Public Health Nations Health**, New York, v. 22, n. 1, p. 7-16, jan. 1932.

PLOTKIN, S. A. Vaccines: Correlates of vaccine-induced immunity. **Clin Infect Dis**, Chicago, v. 47, n. 3, p. 401-409, 1 aug. 2008.

RAJABI, F.; JABALAMELI, N.; REZAEI, N. The Concept of Immunogenetics. In: The Immunogenetics of Dermatologic Diseases. **Adv Exp Med Biol**, New York, v. 1367, p. 1-17, 2022.

- RAMOS, A. T. *et al.* Effects of *Lonomia obliqua* (lepidoptera saturniidae) toxin on clotting, inflammatory and antibody responsiveness in genetically selected lines of mice. **Toxicon**, Oxford; New York, v. 43, n. 7, p. 761-768, 1 jun. 2004.
- RASMUSSEN, M. K. *et al.* Assessing the efficiency of SBA-15 as a nanocarrier for diphtheria anatoxin. **Microporous Mesoporous Mater**, Amsterdam; New York, v. 312, p. 110763, jan. 2021.
- REIS, M. H. *et al.* T-helper functions in lines of mice selected for high or low antibody production (Selection III): modulation by anti-CD4⁺ monoclonal antibody. **Immunology**, Oxford, v. 75, n. 1, p. 80, jan. 1992.
- ROSSATO, C. *et al.* Early peritoneal CC chemokine production correlates with divergent inflammatory phenotypes and susceptibility to experimental arthritis in mice. **J Immunol Res**, Cairo v. 2019, feb. 2019.
- SANT'ANNA, O. A. *et al.* Genetic parameters of the polygenic regulation of antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *salmonellae*. **J Immunogenet**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 191-205, jun. 1982.
- SIEGRIST, C. A. Vaccine immunology. **Vaccines**, Edinburgh, v. 5, n. 1, p. 17-36, 2008.
- SIQUEIRA, M. *et al.* Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 6, n. 4, p. 241-249, apr. 1976.
- SIQUEIRA, M. *et al.* Effect of genetic modification of antibody responsiveness on resistance to *Toxoplasma gondii* infection. **Infect Immun**, Bethesda, v. 48, n. 2, p. 298-302, may. 1985.
- SIQUEIRA, M. *et al.* Nonspecific genetic regulation of antibody responsiveness in the mouse. **Eur J Immunol**, Weinheim, v. 7, n. 4, p. 195-203, apr. 1977.
- SIMONSEN, O. *et al.* Revaccination of adults against diphtheria I: Responses and reactions to different doses of diphtheria toxoid in 30–70-year-old persons with low serum antitoxin levels. **Acta Pathol Microbiol Immunol Scand C**, Copenhagen, v. 94, n. 1-6, p. 213-218, oct. 1986.
- SOUZA, C. M. *et al.* Quantitative trait loci in chromosomes 3, 8, and 9 regulate antibody production against *Salmonella* flagellar antigens in the mouse. **Mamm Genome**, New York, v. 15, n. 8, p. 630-636, aug. 2004.
- TREZENA, A. G. *et al.* Adjuvant effect of mesoporous silica SBA-15 on anti-diphtheria and anti-tetanus humoral immune response. **Biologicals**, London; San Diego v. 80, p. 18-26, oct./nov. 2022.
- TREZENA, A. G. *et al.* Co-localization of quantitative trait *loci* regulating resistance to *Salmonella typhimurium* infection and specific antibody production phenotypes. **Microbes Infect**, Paris; New York, v. 4, n. 14, p. 1409-1415, nov. 2002.

VASSAO, R. C. *et al.* Specific T-cell response correlates with resistance of genetic heterogeneous mouse populations to mouse hepatitis virus 3 infection. **Arch Virol**, Wien; New York, v. 140, n. 7, p. 1235-1245, 1995.

VASSÃO, R. C. *et al.* Antibody responsiveness during immunization and challenge of genetically modified antibody responder mice with murine hepatitis virus 3. **Immunobiology**, Stuttgart, v. 207, n. 4, p. 275-283, 2003.

VAZ, N. M.; KANE, R. E.; LYNCH, J. M. On the adjuvant effect of aluminum hydroxide for mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 1, p. 93-98, jan./mar. 1981.

VIEIRA DE MORAES, L. *et al.* The anti-IRBP IgG1 and IgG2a response does not correlate with susceptibility to experimental autoimmune uveitis. **Braz J Med Biol Res**, São Paulo, v. 39, p. 773-783, jun. 2006.

VORRARO, F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* infection in genetically selected mouse lines: genetic linkage with quantitative trait locus controlling antibody response. **Mediators Inflamm**, Oxford, v. 2014, 13 aug. 2014.

YAMAYA, S. I. *et al.* Preparation of a diphtheria toxin-pullulan conjugate that elicits good IgG antibody production with poor IgE synthesis. **Vaccine**, Guildford, v. 8, n. 1, p. 65-69, 8 feb.1990.