



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

**Doutoramento:**

Ciências Biomédicas

**Nome do Aluno:**

Joana Duarte Nunes Duarte

**Tema da Tese:**

Reprogramming the Immune System with Anti-CD4 Monoclonal Antibodies.

**Área:**

Ciências Biomédicas

**Especialidade:**

Imunologia

**Data da Defesa:**

16/02/2011

**Classificação:**

Aprovado com Distinção e Louvor por Unanimidade

**Júri:**

Presidiu o Presidente do Conselho Científico da FMUL, Professor Doutor Rui Manuel Martins Victorino e estiveram presentes os vogais Doutores: Rui Manuel Martins Victorino, e estiveram presentes os vogais Professores Doutores Lennart Mars, da Universidade de Toulouse II, França, Jocelyne Demengeot, do Instituto Gulbenkian de Ciência, João Pedro Monteiro e Louro Machado de Simas, Luís Ricardo Simões da Silva Graça, Bruno Miguel de Carvalho e Silva Santos e João Eurico Cortez Cabral da Fonseca, todos da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa.



**PROVAS ACADÉMICAS**  
NA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE LISBOA  
INSTITUTO DE FORMAÇÃO AVANÇADA

---

### Resumo

A tolerância imunitária é o estado em que o sistema imunitário não responde agressivamente contra um determinado conjunto de antígenos, permanecendo competente para proteger o organismo de invasores patogénicos. Geralmente, o sistema imunitário é tolerante aos nossos próprios antígenos (auto-antígenos), a antígenos alimentares (tolerância oral) e a muitas outras substâncias externas às quais estamos regularmente expostos (por exemplo pollens e outros potenciais alérgenos). No entanto, sob determinadas condições (ambientais ou genéticas) pode haver uma quebra desse estado de tolerância a determinados antígenos, originando patologias como doenças autoimunes ou alérgicas. As células T reguladoras (Tregs) são elementos fulcrais na manutenção da tolerância periférica, desempenhando um papel crucial na prevenção de reacções autoimunes, bem como respostas de hipersensibilidade.

Os mecanismos moleculares que caracterizam a supressão mediada por Tregs são ainda pouco claros, e a investigação dos mesmos é uma prioridade, pois pode revelar alvos importantes para intervenção terapêutica. Estudos em ratinhos revelaram que a utilização de anticorpos monoclonais, dirigidos para moléculas chave expressas em linfócitos, levaram à indução de tolerância a longo prazo, após um período terapêutico reduzido. Este conceito ficou conhecido como reprogramação do sistema imunitário ou indução de tolerância terapêutica. Estudos em transplantação demonstraram que o anticorpo não depletante anti-CD4 leva a tolerância a longo prazo, através da indução de Tregs. Aqui descrevo a minha investigação sobre o impacto de anti-CD4 como terapêutica em diferentes doenças imuno-mediadas, com o objectivo de reprogramar o sistema imunitário induzindo tolerância.

Primeiro, estudei a indução de tolerância em modelos de animais de doenças autoimunes, onde a tolerância a auto-antígenos foi de alguma forma afectada. Aproveitámos a existência de modelos animais bem estabelecidos, tanto de artrite autoimune como de esclerose múltipla, que se sabem ser mediados por células Th1 e Th17, e portanto fazem do CD4 um bom alvo terapêutico. O tratamento com anti-CD4 foi bem sucedido em ambos os modelos, prevenindo o desenvolvimento de ambas as doenças, e impedindo a progressão das mesmas quando estabelecidas. Investigámos o mecanismo que caracterizava a protecção por anti-CD4, e percebemos que este baseia-se maioritariamente em re-estabelecer o equilíbrio entre as células efectoras e as células reguladoras, favorecendo a tolerância. Em artrite autoimune este efeito verificou-se a nível local, na zona de inflamação (sinóvia), onde as células Th17 estavam claramente reduzidas, enquanto as Tregs eram significativamente superiores àquelas dos animais tratados. O estudo de encefalomielite autoimune experimental (EAE) permitiu-nos localizar as células T específicas para o antígeno, e consequentemente estudar o impacto do anti-CD4 em células naïve e pré-activadas. O anti-CD4 inibiu a proliferação e diferenciação das células T naïve para células efectoras produtoras de citocinas pro-inflamatórias (como IL-17 e IFN- $\gamma$ ), com uma acumulação progressiva de células T reguladoras a longo prazo, que demonstrámos ser importantes na manutenção da tolerância adquirida. Além disso, a terapia com anti-CD4 afecta as células pré-activadas de forma diferente, induzindo a apoptose das mesmas, mais uma vez favorecendo o raio de células efectoras/células reguladoras no sentido da tolerância. De relevância, a tolerância induzida é específica para o antígeno presente na fase do tratamento, permitindo aos animais tolerantes permanecerem competentes para desenvolver uma resposta protectora contra um antígeno diferente, como no caso da resolução de uma infecção viral.

Uma vez estabelecida a eficácia da tolerância induzida pelo anti-CD4 em doenças mediadas por células Th1 e Th17, avalei o impacto desta mesma terapia num modelo de doença grave mediado por células Th2. Para isto, utilizámos um modelo animal bem estabelecido de choque anafilático induzido por amendoins, em ratinhos C3H/HeJ. O tratamento com anti-CD4 durante a fase de exposição a extracto de amendoim induziu a protecção perante nova sensibilização a amendoim, inibindo o desenvolvimento de manifestações de doença anafilática. Esta protecção revelou-se mais uma vez específica para o antígeno em questão, permitindo que o sistema imunitário respondesse normalmente na presença de um antígeno

diferente, inclusivamente, através da produção de IgE e citocinas do tipo Th2. A tolerância induzida pareceu ser dependente de Tregs, uma vez que os animais tratados com anti-CD4 exibiram níveis significativamente elevados de Foxp3, e aquando da depleção de células CD25+ durante o tratamento com anti-CD4, não foi possível induzir o estado de tolerância.

Em conclusão, os resultados obtidos nesta tese sugerem que anticorpos monoclonais anti-CD4 têm um potencial terapêutico abrangente, para tratamento de patologias mediadas pelos diferentes subtipos de células T CD4, sejam doenças autoimunes ou alérgicas.